

PCT
R

BT

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
INVENTARIO

Delegatura de Propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

10-160832

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-160832-00000-0000

Fecha: 2010-12-22 11:55:12 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra: 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 100

21. EXPEDIENTE No. _____

54. TÍTULO

CLORANFENICOL ACETILTRANSFERASA (CAT) PROTEINA

SOMATOSTATINA DE FUSION DEFECTUOSA Y USOS DE ESTA

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL _____

71. SOLICITANTE

BRAASCH BIOTECH LLC.

DOMICILIO

GARRETSON, DAKOTA DEL SUR, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

74. APODERADO

LUZ CLEMENCIA DE PAEZ

C.C. 35.456.344 de Usaquén

22. BOGOTÁ, D. C., _____

Roberto C
29-01-2011



PETITORIO

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-160832- -00000-0000

Fecha: 2010-12-22 11:55:12 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONAL
Act. 411 PRESENTACION Folios: 100

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

SOLICITUD DE:

- 1

☒ Patente de Invención.

☒ Capítulo I.
- ☐ Patente de Modelo de Utilidad.

☐ Capítulo II.

2
SOLICITANTE
(71)

Nombre: **BRAASCH BIOTECH LLC.**
sociedad constituida y existente bajo las
leyes del Estado de Dakota del Sur,
Estados Unidos de América.

Dirección: 421 Rose Avenue,
Garretson,
Dakota del Sur 57030,
Estados Unidos de América

Domicilio: Garretson,
Dakota del Sur,
Estados Unidos de América

IDENTIFICACIÓN

C.C.

☐

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual

Número

3
REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: LUZ CLEMENCIA DE PÁEZ
Dirección: Carrera 4ª. No. 72-35
Teléfono: 347 36 11
Fax: 211 86 50
E-mail: clientes@cavelier.com
Domicilio: Bogotá, Colombia.

IDENTIFICACIÓN

C.C.

☒

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual

Número

35.456.344

T.P

23.555

4
INVENTOR (ES)
(72)

1. Andrew R. MENDELSON

Braasch Biotech LLC,
1230 Bordeaux Drive,
Sunnyvale,
California 94089,
Estados Unidos de América
2. Keith N. HAFFER

421 Rose Drive,
Garretson,
Dakota del Sur 57030,
Estados Unidos de América
3. James LARRICK

Braasch Biotech LLC,
1230 Bordeaux Drive,
Sunnyvale,
California 94089,
Estados Unidos de América

5
PCT (86)
Solicitud Internacional No. PCT/US2008/068195 Fecha: 25 de junio de 2008
Publicación Internacional No. WO 2009/157926 A1 Fecha: 30 de diciembre de 2009

6
Título (54)
CLORANFENICOL ACETILTRANSFERASA (CAT) PROTEÍNA SOMATOSTATINA DE FUSIÓN DEFECTUOSA Y USOS DE ESTA

7
Clasificación Internacional (51) A61K 038/031

8 Prioridad SI ☐ NO ☒	(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
	_____	_____	_____

9

Comprobante de pago No.: 10-104,293**Fecha:** 7 de diciembre de 2010**Comprobante de pago No.:** 10-104,317**Fecha:** 7 de diciembre de 2010**Comprobante de pago No.:** 10-108,539**Fecha:** 20 de diciembre de 2010**Comprobante de pago No.:** 10-108,582**Fecha:** 20 de diciembre de 2010

10

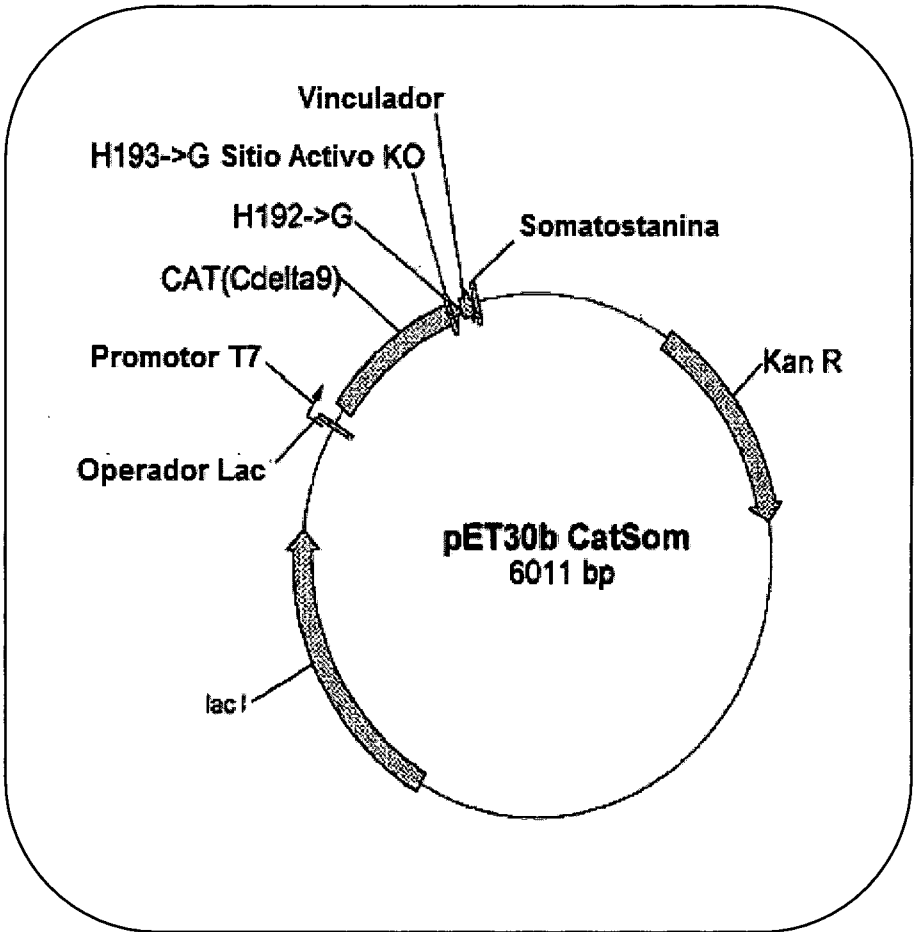
Anexos:

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por \$ 554.000.oo.
- ☒ Comprobante de pago por 4 reivindicaciones adicionales después de la décima reivindicación por \$104.000.oo.
- ☐ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☐ Poderes, si fuere el caso.
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones.
- ☒ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ Traducción del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- ☒ Arte final 12x12
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☒ Otros: VER HOJA DE DOCUMENTOS ANEXOS

3

11

FIGURA CARACTERÍSTICA



12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: LUZ CLEMENCIA DE PÁEZ

FIRMA: Luz Clemencia De Páez
C.C. 35.456.344 de Usaquén T.P. 23.555

ASA

4

DOCUMENTOS ANEXOS

1. ☒ Publicación Internacional WO 2009/157926 A1

Descripción:

Páginas 22 en el idioma original

Páginas 35 en español

Reivindicaciones: Número (s) 14

Figuras: Número (s) 3

2. ☒ **Forma PCT/ISA/210.** Informe de Búsqueda Internacional.

3. ☒ **Forma PCT/IB/306.** Notificación de la inscripción del cambio en la dirección de la Sociedad Solicitante y de los inventores.

4. ☒ Extracto de publicación.

**NO SE REALIZARON MODIFICACIONES EN LA
FASE INTERNACIONAL**

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
30 December 2009 (30.12.2009)

(10) International Publication Number
WO 2009/157926 A1

(51) International Patent Classification:

A61K 38/31 (2006.01) C12P 21/02 (2006.01)
C07K 14/655 (2006.01) A61K 39/385 (2006.01)

(21) International Application Number:

PCT/US2008/068195

(22) International Filing Date:

25 June 2008 (25.06.2008)

(25) Filing Language:

English

(26) Publication Language:

English

(71) Applicant (for all designated States except US):
BRAASCH BIOTECH LLC [US/US]; 621 N. Main Avenue, Garretson, SD 57030 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): **MENDELSON, Andrew R.** [US/US]; 2462 Wyandotte Street, Mountain View, CA 94043 (US). **HAFFER, Keith N.** [US/US]; 621 N. Main Avenue, Garretson, SD 57030 (US). **LARRICK, James** [US/US]; 2462 Wyandotte Street, Mountain View, CA 94043 (US).

(74) Agents: **SWANSON, Barry J.** et al.; Swanson & Bratschun, L.L.C., 8210 SouthPark Terrace, Littleton, CO 80120 (US).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[Continued on next page]

(54) Title: **CHLORAMPHENICOL ACETYL TRANSFERASE (CAT)-DEFECTIVE SOMATOSTATIN FUSION PROTEIN AND USES THEREOF**

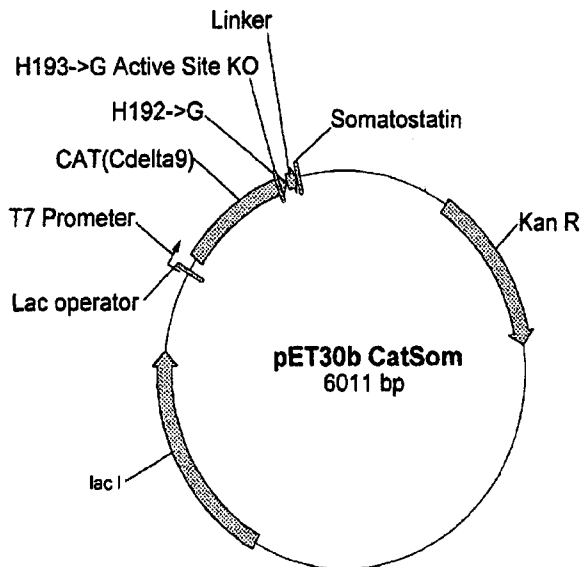


Fig. 1

(57) Abstract: Chimeric somatostatin-based polypeptides, polynucleotides used to encode the polypeptides, the methods for isolating and producing the polypeptides and the uses thereof are provided. In addition, low cost adjuvants for enhanced immunogenic response are provided. Vaccinations that include both chimeric somatostatin-based polypeptides and novel adjuvants are included, useful in facilitating farm animal productivity.

WO 2009/157926 A1

6

WO 2009/157926 A1



Published:

— *with international search report (Art. 21(3))*

**CHLORAMPHENICOL ACETYL TRANSFERASE (CAT)-DEFECTIVE
SOMATOSTATIN FUSION PROTEIN AND USES THEREOF**

TECHNICAL FIELD

[0001] The present invention relates to chimeric somatostatin-based polypeptides, polynucleotides used to encode the polypeptides, the means for isolating and producing the polypeptides, and to the uses thereof. The present invention also relates to novel adjuvants and immunization compositions for enhanced immunogenicity of, for example, chimeric somatostatin-based polypeptides of the invention as well as to other like antigens.

BACKGROUND OF THE INVENTION

[0002] Somatostatin (also known as growth hormone inhibiting hormone or GHIH) is a peptide hormone produced in the hypothalamus as well as certain portions of the digestive system. Somatostatin is generally involved in regulation of the endocrine system via interactions with G-protein-coupled somatostatin receptors. This somatostatin-based signaling cascade leads to a number of actions spread throughout the body.

[0003] Relevant to aspects of the present invention, somatostatin is known to inhibit the release of growth hormone and thyroid stimulating hormone from the anterior pituitary. (Patel YC and Srikant CB, Somatostatin and its receptors Adv Mol Cell Endocrinol, 1999. 3 43-73). Other hormones inhibited by somatostatin include insulin, glucagon, secretin, gastrin, pepsin, maletin, etc. (Patel YC and Srikant CB Somatostatin and its receptors Adv Mol Cell Endocrinol, 1999. 3 43-73). The ability of somatostatin to regulate so many factors/hormones necessary for growth and utilization of food has made somatostatin a central target for controlling animal growth in the animal husbandry field, *i.e.*, inhibiting somatostatin results in increased levels of growth hormone being present in a target animal and thereby results in animals with enhanced capacity to produce milk, to provide greater amounts of meat, etc.

[0004] In particular, immunization of animals to somatostatin has been recognized as a means of neutralizing somatostatin in a target animal and thereby removing somatostatin's normal inhibitory effects on various aspects of the animal's productivity, *e.g.*, milk production in a dairy cow. Reichlin S., ed., 1987, Somatostatin, Basic and Clinical Status, Plenum Press, New York (pp 3-50, 121-136, 146-156, 169-182, 221-228, 267-274) Spencer G.S., 1985, Hormonal

systems regulating growth, review, Livestock Production Science, 12, 31-46. Importantly, these somatostatin-based immunization procedures avoid the direct use of anabolic hormones, e.g., growth hormone, and the like, in the animal and allow for small changes in the concentration of the endogenous anabolic factors and thereby ecologically pure food products.

[0005] Somatostatin is known to have a relatively short half-life in the blood. In order to enhance the immunologic effects of somatostatin, immunization protocols have been developed to enhance the proteins half-life by conjugating somatostatin to target carrier proteins. These conjugated somatostatin proteins are designed to have increased half-life and increased antigenicity in the blood and therefore provide enhanced benefits (especially in light of the cost of preparing somatostatin). For example, chimeric somatostatin proteins are disclosed in U.S. Patent No. 6,316,004, (and corresponding European Patent EP0645454) where various conjugated somatostatin-containing proteins are shown to have increased antigenicity and function with regard to productivity of farm animals as compared to other conventional immunization or anabolic hormone-based procedures.

[0006] However, lower dose, higher antigenicity based immunization compositions and procedures are needed to improve overall productivity and timeliness in the animal husbandry field. The present invention is directed toward providing these more antigenic and functionally active somatostatin-based immunization compounds, compositions and procedures.

[0007] Against this backdrop the following disclosure is provided.

SUMMARY OF THE INVENTION

[0008] The present invention provides novel polypeptides, and the polynucleotides that encode them, having enhanced immunogenicity of somatostatin. Polypeptides of the invention include somatostatin-14 fused to a substantially inactivated chloramphenicol acetyl transferase protein via a functionally optimized linker. The chimeric polypeptides of the invention provide highly effective and low cost materials for use in the animal husbandry field, as is described in more detail below. Embodiments of the invention include the amino acid and nucleic acid sequences as defined in SEQ ID NOs: 1-14.

[0009] The present invention also provides production and purification procedures for making the chimeric polypeptides of the invention in an endotoxin free and highly functional state. Endotoxin free polypeptides provide a substantial and unexpected advantage for use in

certain target animals, where small amounts of endotoxin, typically thought advantageous for eliciting an immunogenic response, actually lead to significant functional disadvantage. This is particularly the case when polypeptides of the invention are used to immunize United States bred and raised dairy cows. In addition, because the chimeric polypeptides of the invention show enhanced function as compared to conventional materials, smaller and lower number of doses are used to immunize target animals. This decrease in required amounts also provides a resultant reduction of endotoxin in vaccines of the invention. The combination of endotoxin free isolation and smaller use amount of the chimeric polypeptides of the invention allows for substantially endotoxin free vaccines to be used herein.

[0010] The invention also provides adjuvant compositions having enhanced function and safety as compared to conventional adjuvant materials. Adjuvants herein do not contain animal-derived materials and are free of most known chemical carcinogens, e.g., benzene and other like materials. Adjuvant compositions herein have proven to be unexpectedly effective at eliciting immune response when combined with target antigens.

[0011] The invention further provides vaccines containing the chimeric polypeptides of the invention with adjuvant compositions of the invention. Vaccines herein are used for inducing immune responses in vaccinated mammals and avian, for example, target farm animals. Illustrative farm animals for use herein include: dairy cows, pigs, sheep, goats, turkeys, rabbits, and bull calves. In some aspects the polypeptides of the invention are prepared and purified with low or no associated endotoxin. These vaccines have been optimized to elicit safe and enhanced immunogenic reactions in the target animal.

[0012] The invention further includes methods for vaccinating target mammals and avians using the vaccines of the invention. Illustrative methods are provided for vaccination of dairy cows to enhance milk production in a safe (for both animal and end-user), cost-effective and highly useful manner. Other illustrative methods include vaccination of piglets, sheep, turkeys, goats, rabbits or bull calves to enhance meat (and particularly lean meat) production in a target animal in a safe and cost-effective manner.

[0013] These and various other features and advantages of the invention will be apparent from a reading of the following detailed description and a review of the appended claims

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

[0014] Figure 1 is an illustrative schematic of a pET30b CatSom plasmid in accordance with embodiments of the present invention. The plasmid includes a Kanamycin resistance marker, a Lac operator, T7 promoter, CAT coding sequence all in accordance with embodiments of the invention, a linker region in accordance with the invention herein and a somatostatin encoding region in accordance with the invention are also included.

[0015] Figure 2 is an illustrative stained SDS-PAGE showing a 28KD band corresponding to the predicted size of a codon-optimized, CAT-defective somatostatin polypeptide of the invention. Lane 1 is LB + IPTG, reduced, Lane 2 is LB, reduced, Lane 3 is LB + IPTG and Lane 4 is LB.

[0016] Figure 3A and 3B are tables showing milk production in liters per day of vaccinated (using vaccines as described in the Examples) and control dairy cattle (BSY). Each cow had a specific number identification as shown in each table.

IDENTIFICATION OF SEQUENCES AND SEQUENCE IDENTIFIERS

[0017] SEQ ID NO: 1 AGCKNFFWKFTFTSC

[0018] SEQ ID NO 1a GCTGGCTGCAAGAATTTCTTCTGGAAGACTTTCACA
TCCTGT

[0019] SEQ ID NO: 2 (His192->Gly, His193->Gly):

Atggagaaaaaatcactggatataccaccgttgatatatcccaatggcatcgtaaagaacattttagggcatttcagtcagttgctcaatgta
cctataaccagaccgttcagctggatattacggcctttttaaagaccgtaaagaaaaataagcacaagtttatccggcctttattcacattctg
cccgcctgatgaatgctcatccggaattccgtatggcaatgaaagacggtagctggtgatafgggatagtggtcaccctgttacaccgtttt
ccatgagcaaaactgaaacgttttcacgctctgagtggaataaccacgacgatttccggcagtttctacacatatattcgcaagatgtggcgtgtt
acggtgaaaacctggcctatttccctaaagggtttattgagaatatgttttcgtctcagccaatccctgggtgagtttcaccagtttgatttaaac
gtggccaatatggacaacttcttcgccccgttttaccatgggcaaatattatacgcaaggcgacaagggtgctgatgccgtggcgattcag
gttgggtggtgccgtttgtgatggcttccatgtcggccgtatgcttaatgaactgcagcag

[0020] SEQ ID NO: 3: (His192->Gly, His193->Gly):

Mekkitgyttvdisqwhrkehfeafqsvaqtynqtvql ditaflktvknkhkfy pafihilarlmnahpefrmamkdgelviwds
vhpcytfvheqtetfsslwseyhddfrqflhiysqdvacygenlayfpkgfienmffvsanpwsvtsfdlnvanmdnffapvftmg
kyytqgdkvlmplaiqvvgavcdghvgrmlnelqq

[0021] SEQ ID NO: 4 (His193->Gly)

Atggagaaaaaatcactggatataccaccgttgatatacccgaatggcatcgtaaagaacatttgaggcatttcagtcagttgctcaatgta
cctataaccagaccgttcagctggatattacggccttttaagaccgtaaagaaaaataagcacaagtttatccggcctttattcacattcttg
cccgctgatgaatgctcatccggaattccgtatggcaatgaaagacgggtgagctggatggtgataggatagttcaccctgttacaccgttt
ccatgagcaaaactgaaacgttttcacgctctggagtgaataccacgacgatttccggcagtttctacacatatattcgcaagatgtggcgtgtt
acggtgaaaacctggcctatttccctaaagggtttattgagaatatgttttcgtctcagccaatccctgggtgagtttcaccagtttgatttaaac
gtggccaatatggacaacttctcgccccgtttcaccatgggcaaatattatagcaaggcgacaagggtgctgatgccgctggcgattcag
gttcattggtgccgtttgtgatggcttccatgtcggccgtatgcttaataactgcagcag

[0022] SEQ ID NO:5 (1 His193->Ala)

Atggagaaaaaatcactggatataccaccgttgatatacccgaatggcatcgtaaagaacatttgaggcatttcagtcagttgctcaatgta
cctataaccagaccgttcagctggatattacggccttttaagaccgtaaagaaaaataagcacaagtttatccggcctttattcacattcttg
cccgctgatgaatgctcatccggaattccgtatggcaatgaaagacgggtgagctggatggtgataggatagttcaccctgttacaccgttt
ccatgagcaaaactgaaacgttttcacgctctggagtgaataccacgacgatttccggcagtttctacacatatattcgcaagatgtggcgtgtt
acggtgaaaacctggcctatttccctaaagggtttattgagaatatgttttcgtctcagccaatccctgggtgagtttcaccagtttgatttaaac
gtggccaatatggacaacttctcgccccgtttcaccatgggcaaatattatagcaaggcgacaagggtgctgatgccgctggcgattcag
gttcattgctgccgtttgtgatggcttccatgtcggccgtatgcttaataactgcagcag

[0023] SEQ ID NO:6 (1 His+CAT wt)

Atggagaaaaaatcactggatataccaccgttgatatacccgaatggcatcgtaaagaacatttgaggcatttcagtcagttgctcaatgta
cctataaccagaccgttcagctggatattacggccttttaagaccgtaaagaaaaataagcacaagtttatccggcctttattcacattcttg
cccgctgatgaatgctcatccggaattccgtatggcaatgaaagacgggtgagctggatggtgataggatagttcaccctgttacaccgttt
ccatgagcaaaactgaaacgttttcacgctctggagtgaataccacgacgatttccggcagtttctacacatatattcgcaagatgtggcgtgtt
acggtgaaaacctggcctatttccctaaagggtttattgagaatatgttttcgtctcagccaatccctgggtgagtttcaccagtttgatttaaac
gtggccaatatggacaacttctcgccccgtttcaccatgggcaaatattatagcaaggcgacaagggtgctgatgccgctggcgattcag
gttcattggtgccgtttgtgatggcttccatgtcggcagaatgcttaataactgcagcag

72

[0024] SEQ ID NO: 7 (one H->G):

Mekkitgyttvdisqwhrkehfeafqsvaqtynqtvqlditaflktvknkhkfyfapihilarlmnahpefrmamkdgelviwds
vhpcytfheqtetfsslwseyhddfrqflhiysqdvacygenlayfpgkfienmffvsanpwvsfslnvanmdnffapvftmg
kyytqgdkvimplaiqvhgavcdgfhvgrmlnelqq

[0025] SEQ ID NO: 8: (H->A)

Mekkitgyttvdisqwhrkehfeafqsvaqtynqtvqlditaflktvknkhkfyfapihilarlmnahpefrmamkdgelviwds
vhpcytfheqtetfsslwseyhddfrqflhiysqdvacygenlayfpgkfienmffvsanpwvsfslnvanmdnffapvftmg
kyytqgdkvimplaiqvhaavcdgfhvgrmlnelqq

[0026] SEQ ID NO: 9

tgggaactgcaccgttctgtgccacgcccgccctcgccacgtccggaattcatg

[0027] SEQ ID NO: 10

welhrsgprprprpefm

[0028] SEQ ID NO: 11

welhrsgp(rp)nefm where $n > 1$

[0029] SEQ ID NO: 12

Atggagaaaaaatcactggatataccaccgttgatatacceaatggcatcgtaaagaacattttgaggcatttcagtcagttgctcaatgta
cctataaccagaccgttcagctggatattacggccttttaaaagaccgtaaagaaaaataagcacaagttttatccggcctttattcacattctg
cccgcctgatgaatgctcatccggaattccgtatggcaatgaaagacggtagctggtgatatgggatagtgttcaccctgttacaccgtttt
ccatgagcaaaactgaaacgttttcacgctctggagtggaataaccacgacgatttccggcagtttctacacatatattcgcaagatgtggcgtgtt
acgggtgaaaacctggcctatttccctaaagggtttattgagaatatgttttcgtctcagccaatccctgggtgagtttcaccagtttgatttaaac
gtggccaatatggacaacttcttcgccccgttttcacatgggcaaatattatacgcaaggcgacaaggtgctgatgccgtggcgattcag
gttggtggtgccgtttgtgatggcttcatgtcgccgctatgcttaataactgcagcagtgagggaactgcaccgttctgtccacgccgcgc
cctcgccacgtccggaattcatggcggctgcaagaacttctttggaaaacctttacgagctgc

[0030] SEQ ID NO: 13

mekkitgyttvdisqwhrkehfeafqsvaqtynqtvqliditaflktvkkknkhkfyafihilarlmnahpefrmamkdgelviwds
hpcytvfheqtetfsslwseyhddfrqflhiysqdvacygenlayfpkgfienmffvsanpwvsfstdlnvanmdnffapvftmgk
yytqgdkvlmplaiqvvgavcdgfhvgrmlnelqqwelhrsgprprprpefmagcknffwktftsc

[0031] SEQ ID NO: 14

mekkitgyttvdisqwhrkehfeafqsvaqtynqtvqliditaflktvkkknkhkfyafihilarlmnahpefrmamkdgelviwds
hpcytvfheqtetfsslwseyhddfrqflhiysqdvacygenlayfpkgfienmffvsanpwvsfstdlnvanmdnffapvftmgk
yytqgdkvlmplaiqvvhavcdgfhvgrmlnelqqwelhrsgprprprpefmagcknffwktftsc

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

[0032] Embodiments of the present invention provide chimeric polypeptides, and nucleic acid constructs that encode the same, having enhanced immunogenicity of somatostatin.

Embodiments herein include methods for preparing the chimeric protein as well as methods for using the chimeric protein to increase certain productivity of target farm animals, and especially for increasing milk production in dairy cows and meat production of cattle, pigs, sheep, rabbits, goats, bull calves, etc.

[0033] Embodiments of the present invention also include novel adjuvants for use with the chimeric proteins of the invention for enhanced immunogenicity in a target animal, enhanced safety for the target animal being vaccinated and enhanced safety for a user of the target animal, *i.e.*, consumer of the vaccinated animal or consumer of a product from the vaccinated animal.

[0034] In one aspect, the invention provides chimeric somatostatin protein designed for enhanced immunogenicity of somatostatin. Chimeric somatostatin protein embodiments include an amino acid sequence of somatostatin-14 linked by a linker sequence to a substantially inactivated chloramphenicol acetyl transferase (CAT) truncated protein. In some cases the linker (also referred to herein as a spacer) has been optimized to enhance production of the chimeric polypeptide in target host cells. In other cases, methods are provided for producing and isolating these enhanced amounts of chimeric protein in a substantially endotoxin free state.

[0035] In another aspect, the invention provides novel adjuvant compositions (which do not contain any animal derived proteins or chemicals, like benzene) and vaccines that incorporate chimeric somatostatin proteins of the invention. Embodiments include unexpectedly effective

adjuvant/chimeric somatostatin protein (typically substantially endotoxin free), *i.e.*, novel vaccines, compositions for inducing antigenicity in vaccinated target farm animals. In some embodiments the target farm animal is a dairy cow, bull calve, pig, goat, etc. Note that although the adjuvants of the present invention are described in combination with the chimeric somatostatin proteins herein, it is envisioned that the inventive adjuvants herein could be used with other vaccines and in a variety of target animals, e.g., humans, pigs, dogs, cats, etc.

[0036] In other aspects, methods are provided for vaccinating target farm animals using as few as one dose of this novel vaccine to obtain enhanced productivity, and in particular, enhanced milk production in dairy cows and other like farm animals. These improved dose procedures (fewer number of vaccinations and smaller concentration of chimeric somatostatin) provide for time effectiveness and lower costs, which when extended to the dairy industry represents a significant advancement in farm animal productivity. Also, the methods herein avoid use of recombinant growth hormone therapy which are a concern within the health care industry, *i.e.*, both to the target farm animal, the end user and the environment where excretion of recombinant growth hormone is released into the ground water supply.

[0037] **Definitions**

[0038] The following definitions are provided to facilitate understanding of certain terms used frequently herein and are not meant to limit the scope of the present disclosure.

[0039] The term "amino acid" refers to any of the twenty naturally occurring amino acids as well as any modified amino acid sequences. Modifications may include natural processes such as posttranslational processing, or may include chemical modifications which are known in the art. Modifications include but are not limited to: phosphorylation, ubiquitination, acetylation, amidation, glycosylation, covalent attachment of flavin, ADP-ribosylation, cross-linking, iodination, methylation, and the like.

[0040] The terms "chimeric polypeptide" or fusion protein refer to a first polypeptide having attached a second, heterologous polypeptide, such that the first and second polypeptides are expressed in frame. Often the two polypeptides can be attached via a linker or spacer segment to optimize expression and function of the chimeric polypeptide(s) of the invention.

[0041] The term "endotoxin" refers to toxins associated in the cell walls of gram negative bacteria. In some cases the toxins are lipopolysaccharide components of bacterial membranes. components of outer membrane of gram negative bacteria cell walls.

[0042] The term "host cell" or "host cells" refers to cells established in *ex vivo* culture. It is a characteristic of host cells discussed herein that they be capable of expressing the chimeric proteins of the invention. Examples of suitable host cells useful for aspects of the invention include, but are not limited to, bacterial, yeast, insect and mammalian cells. Specific examples of such cells include SF9 insect cells (Summers and Smith, 1987, Texas Agriculture Experiment Station Bulletin, p1555), *E. Coli* cells (BL21(DE3), Novagen), yeast (*Pichia Pastoris*, Invitrogen) and human liver cells (Hep G2 (ATCC HB8065).

[0043] The term "nucleic acid sequence" refers to the order of sequence of deoxyribonucleotides along a strand of deoxyribonucleic acid. The order of these deoxyribonucleotides determines the order of the amino acids along a polypeptide chain. The deoxyribonucleotide sequence codes for the amino acid sequence.

[0044] The terms "protein," "peptide," and "polypeptide" are used interchangeably to denote an amino acid polymer or a set of two or more interacting or bound amino acid polymers.

[0045] The term "substantially" refers to a "great extent," for example, substantially removed means that at least 75%, more typically at least 80%, 85%, 90%, 95% and most typically 96%, 97%, 98%, 99% of the target material is removed; substantially inactive means at least 75%, more typically 80%, 85%, 90%, 95% and most typically 96% 97%, 98%, 99% of an enzyme is inactivated. As such a substantially inactive CAT enzyme is one that has 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 96%, 97%, 98%, 99% or 100% of its activity removed. (CAT activity can be determined using known functional assays, for example binding of n-Butyryl Coenzyme A to radiolabelled chloramphenicol and subsequent measurement by Liquid Scintillation Counting (LCS); by determining the amount of radioactive label transferred from [¹⁴C]acetyl CoA to chloramphenicol by thin layer chromatography (see Molecular Cloning: A Laboratory Model, 3rd ed., J Sambrook and DW Russell, 2001. Cold Spring Harbor Press] or other known or like assays).

[0046] The term "vector" is used in reference to nucleic acid molecules that transfer DNA segment(s) from one cell to another cell. The term "vehicle" is sometimes used interchangeably with vector. Two common types of vectors are plasmids and viral vectors.

[0047] Somatostatin

[0048] A number of studies have shown that animals immunized with somatostatin have an average daily gain of 10-20%, an appetite reduced by 9% and an 11% increase in the efficiency of food utilization. Animals immunized with somatostatin, and also their offspring, have correct proportions, and the distribution of the weight of the animals between the muscles, bones and fat is the same as in control animals (see Reichlin, 1987). Therefore, somatostatin immunization provides a useful and safe way of enhancing a target animal's productivity. This is particularly the case when compared with use of recombinant growth hormone, which use has raised concerns over hormone in milk or meat from treated animals or for the safety of the animals themselves or for build-up of the hormone in the ecosystem, particularly the ground water supply.

[0049] Somatostatin-14 is a biologically active tetradecapeptide produced in the hypothalamus and gastrointestinal tract. The amino acid sequence of the tetradecapeptide is AGCKNFFWKFTFTSC (SEQ ID NO: 1). The sequence of somatostatin-14 is highly conserved among mammals (Lin XW et al. Evolution of neuroendocrine peptide systems: gonadotropin-releasing hormone and somatostatin. Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol. 1998 119(3):375-88.) The tetradecapeptide is encoded by a nucleic acid sequence GCTGGCTGCAAGAATTTCTTCTGGAAGACTTTACATCCTGT (SEQ ID NO: 1a) (note that other nucleic acid sequences can be used to code SEQ ID NO:1, however, SEQ ID NO: 1a is provided for illustrative purposes).

[0050] Somatostatin-14 is known to have a strong inhibitory effect on a large number of hormones involved in the growth and utilization of food in animals. As previously described in US Patent No. 6,316,004 (incorporated herein by reference for all uses), somatostatin-14 and chimeric versions of somatostatin can be used in immunization of animals for increase in daily weight and, where appropriate, milk production. These immunization procedures were performed with conventional adjuvants and did not utilize the somatostatin-based materials of this invention. Note that treatment of target animals with anti-somatostatin antibodies has proven to be overly costly and functionally non-dramatic, thereby eliminating direct antibody treatment as non-practical. Muromtsev G.S., et al., 1990, Basics of agricultural biotechnology, Agropromizdat, Moscow, pp 102-106. One aspect of the present invention is based on the

concept that the anti-somatostatin antibodies formed by compositions and methods described herein attenuate but do not completely eliminate the mostly inhibitory actions of somatostatin in the target animal. This process produces a natural and proportional increase in growth and productivity in immunized target animals.

[0051] As such, aspects of the present invention facilitate somatostatin based immunization by providing highly immunogenic materials for use in immunizing target animals. These somatostatin based immunization compounds have been optimized for expression and antigenicity. In some embodiments, somatostatin-14 is expressed as a codon-optimized, CAT-deficient somatostatin chimeric polypeptide. These materials provide an unexpected improvement over other immunization based vaccines.

[0052] **Novel Codon-Optimized, CAT-Deficient Somatostatin Constructs**

[0053] One aspect of the invention provides isolated nucleic acid molecules that encode chimeric proteins having optimized somatostatin immunogenic activity. In particular, embodiments of the invention include novel nucleic acid constructs that encode CAT fusion proteins having immunogenic activity for somatostatin. These polypeptides have been identified for optimal functional activity in immunization procedures.

[0054] In one embodiment, a construct having a schematic as shown in Figure 1 is provided to encode the chimeric polypeptides of the invention. Nucleic acid constructs of the invention generally encode an inactive CAT enzyme without 10 C-terminal amino acids and includes one or two histidine replaced amino acids. Substantial inactivation of CAT avoids adverse reactions to CAT in the injected target animal (and thereby avoidance of CAT resistance). Note that chloramphenicol is a commonly used antibiotic in the cattle industry and resistance to chloramphenicol in cattle would be adverse to the safety of animals vaccinated using materials of the invention. As such, constructs having an inactivated CAT have the immunogenicity of CAT without the adverse side-effects of resistance in vaccinated animals (a problematic safety issue for the animals).

[0055] The CAT enzyme is inactivated by removing the imidazole group of His193 (His195 in the canonical CAT_{III} variant, see Lewendon et al below). In another embodiment the CAT enzyme is inactivated by removing the imidazole groups of both His 193 and nearby His192 (respectively His195 and His194 for CAT_{III}). Removal of the essential His193 (His195

in CAT_{III}) imidazole group from the active site of CAT and replacement with a alanine, glycine or other like amino acid results in substantial inactivation of the CAT enzyme (Lewendon A et al. (1994). Replacement of catalytic histidine-195 of chloramphenicol acetyl transferase: evidence for a general base role for glutamate. Biochemistry. 33(7):1944-50.). Finally, embodiments herein can also include CAT enzyme inactivation through removal of the imidazole group of His192 alone (His 194 for CAT_{III}). As for His193, replacement can be with an alanine, glycine or other like amino acid.

[0056] In some aspects, the one or more replaced histidine amino acids are encoded by nucleic acids located at position numbers 574-576 and 577-579 of SEQ ID NO: 2 (corresponding to amino acid numbers 192 and 193 in SEQ ID NO:3). In some embodiments the nucleic acid sequences of the invention include SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 and SEQ ID NO:6. Chimeric proteins of the invention that include the histidine replaced constructs herein provide highly immunogenic proteins with little or no CAT activity, a significant improvement over the existing art. The substantially inactivated CAT enzyme embodiments are attached to a somatostatin polypeptide of the invention. This attachment can be made directly or with a linker (as described more fully below).

[0057] Inactivation of the target sites (His192 and/or His193) can be accomplished via any number of known procedures to those skilled in the art including site-directed mutagenesis and synthetic gene assembly. In one embodiment, the nucleic acid sequence that encodes histidine 193 is modified to encode an alanine, glycine or other like amino acid. In another embodiment, the nucleic acid sequences that encodes histidine 192 is modified to encode alanine, glycine or other like amino acids. Typical combination replacements for the 192 and 193 chimeric polypeptide include: alanine, alanine; alanine, glycine; glycine, alanine; and glycine, glycine.

[0058] Embodiments of the present invention also include the amino acid sequences for CAT deficient polypeptides of the invention, including amino acid sequence having SEQ ID NO: 7, 8 and 3 (corresponding to his → gly at 193, his→ala at 193, and his→ gly at both 192 and 193).

[0059] As shown in Figure 1, the substantially non-active CAT enzyme can be linked to somatostatin-14 via a variable length spacer. The spacer being required to insure presentation of the encoded somatostatin on a global surface. Spacer embodiments herein provide for optimal

protease resistance and for optimal epitope exposure and inclusion in chimeric polypeptides of the invention have shown unexpected improvement over constructs not having the linker sequence(s) of the present invention.

[0060] Spacer embodiments, therefore, have been optimized in length and composition to ensure CAT-defective somatostatin expression in various microorganisms, and in particular in *E. Coli*. Original constructs as described in US Patent No. 6,316,004, included a spacer having rare *E. Coli* codons and required the co-expression of rare tRNAs from a second or helper plasmid. Spacer embodiments herein remove these rare *E. Coli* codons and thereby remove the need for a second helper plasmid, an improvement over previous technology.

[0061] In typical embodiments, the spacer has a nucleic acid sequence of `tggaactgcaccgttctgtccacgcccgcgcctcgcccacgtccggaattcatg` (SEQ ID NO:9). One example of a spacer of the invention has an amino acid sequence of `welhrsgprprprpefm` (SEQ ID NO:10). A typical amino acid sequence for a spacer of the invention is `welhrsgp(rp)nefm` where $n > 1$ (SEQ ID NO:11). As noted above, these novel spaces sequences provide for enhanced protease resistance (thereby allowing for increased production as compared to constructs disclosed in U.S. Patent No. 6,316,004) and optimal somatostatin-14 exposure. The combination of somatostatin-14 attached to a substantially inactivated CAT enzyme (histidine replaced constructs) by an optimally configured linker showed unexpected and surprising improvement over other conventional materials when used to immunize target animals for enhanced productivity.

[0062] Although not as optimal in function, other linker sequences of variable length can be used to attach the somatostatin-14 to the substantially inactive CAT enzyme. In addition, it is envisioned that a direct fusion of the somatostatin-14 to the substantially inactive CAT enzyme could also be used herein, and is considered to be within the scope of the present invention.

[0063] Vectors and Host Cells

[0064] The present invention also relates to vectors comprising the polynucleotide molecules of the invention, as well as host cells transformed with such vectors. Any of the polynucleotide molecules of the invention may be joined to a vector, which generally include a selectable marker and origin of replication, for the propagation host of interest. Host cells are genetically engineered to include these vectors and thereby express the polypeptides of the invention. Generally, vectors herein include polynucleotides molecules of the invention

operably linked to suitable transcriptional or translational regulatory sequences, such as those for microbial or viral host cells. Examples of regulatory sequences include transcriptional promoters, operators, or enhancers, mRNA ribosomal binding sites, and appropriate sequences which control transcription and translation. Nucleotide sequences are operably linked when the regulatory sequences herein functionally relate to the chimeric polypeptide encoding polynucleotides of the invention.

[0065] Typical vehicles include plasmids, yeast shuttle vectors, baculovirus, inactivated adenovirus, and the like. In one embodiment the vehicle is a modified pET30b CatSom plasmid (see Figure 1). Target host cells for use herein include bacterial host, e.g., *E. Coli*., yeast, SF-9 insect cells, mammalian cells, plant cells, and the like.

[0066] In one embodiment, the regulatory sequences include a T7lac, CAT, Trp, or T5 promoter for expression of the chimeric polypeptides of the invention in *E. coli* or other like microbes. These regulatory sequences are known in the art and are used under appropriate and known conditions.

[0067] Where generically modified green plant cells are utilized for expression, systems as developed by Planet Biotechnology and others can be utilized.

[0068] Various plasmids of the invention have been constructed for expression of chimeric polypeptides of the invention through utilization of target regulatory sequences. Illustrative plasmids can include a T7lac promoter (see Figure 1).

[0069] Host cells for expression of target chimeric polypeptides include prokaryotes, yeast and higher eukaryotic cells. Illustrative prokaryotic hosts include bacteria of the genera *Escherichia*, *Bacillus*, and *Salmonella* as well as the genera *Pseudomonas* and *Streptomyces*. In typical embodiments the host cell is of the genera *Escherichia* and can be *Escherichia Coli* (*E. Coli*).

[0070] As shown in the Examples below, constructs of the invention provide for optimal CAT deficient somatostatin expression under a variety of conditions. These constructs are particularly efficient for expression in prokaryotic hosts and in particular bacteria of the genera *Escherichia*. Note as well that various plant expression systems can also be used in the context of the present invention, typically using *Agrobacterium trameficies*.

[0071] Endotoxin Free Fusion Protein Purification

[0072] Aspects of the present invention include use of endotoxin free, codon-optimized, CAT-deficient somatostatin for use in vaccination of animals, and in particular for vaccination of farm animals, which in some cases are United States bred dairy cows. Endotoxin free materials are particularly important for cattle bred and raised in the United States (see for example, Drackley, JK 2004. Physiological adaptations in transition dairy cows. Pp 74-87 in Proc. Minnesota Dairy Herd Health Conf., St Paul, MN. University of Minnesota, St. Paul).

[0073] In one embodiment, the chimeric immunogenic somatostatin-comprising proteins of the invention are prepared by transforming target cells with appropriate somatostatin-containing vehicles. As noted above, vehicles for use herein include known plasmid and vector systems suitable for expression in selected target cells.

[0074] In an aspect of the invention, chimeric immunogenic somatostatin-comprising proteins are expressed in target host cells. Chimeric protein expression is performed using target regulatory sequences. In some aspects the chimeric polypeptides have been optimized (especially with regard to spacer sequences disclosed herein) for expression in *E. Coli*.

[0075] Chimeric protein can then be purified in accordance with known protein purification technologies, including, for example, lysozyme lysis, differential centrifugation of inclusion bodies, sieve chromatography and the like. Refolding procedures can be conducted in guanidine chloride and urea at alkaline pH followed by dialysis and lyophilization.

[0076] In one embodiment, *E. coli* cells are transformed using the codon-optimized, CAT-deficient somatostatin containing plasmid – pET30b CatSom; the pET30b CatSom having appropriate *E. Coli* base regulatory sequences for expression. In some cases, fermentation of approximately ten liters of these cells provides at least 500 grams and in some cases 600 grams of total biomass, yielding about 4 – 6 grams of total protein. It is estimated from silver and coomassie blue staining that up to half of the protein can be chimeric protein (see Example 2 and Figure 2).

[0077] In some embodiments herein, chimeric protein of the invention is purified from transformed host cells in a substantially endotoxin free state. Realization that endotoxin, and in particular multiple exposures to endotoxin, in some animals, and in particular dairy cows, results in substantially compromised animals (mastitis and endotoxin shock in dairy cows bred and raised in the United States) was an unexpected and surprising result that the present inventors

obtained. This realization resulted in an attempt to remove or lower the endotoxin dose amount or number of exposures in dairy cow vaccinations. Note that this endotoxin based effect is much less realized in cows bred and raised in Russia and other countries as the dairy cattle are descendent from a different strain of cow. Holstein Association, 1 Holstein Place, Brattleboro, Vermont 05302-0808. This finding in United States dairy cows is generally contrary to the expectation that a vaccine should include some low amount of endotoxin to help maximize an animals' immune response, as is the case for dairy cows when vaccinated with somatostatin in some other European markets (see US Patent No. 6, 316,004).

[0078] As such, some embodiments herein are directed at production of substantially endotoxin free chimeric proteins for use in vaccines, and especially for use in vaccines used in the cattle industry and used in the cattle industry within the United States. In certain embodiments the endotoxin levels are at or below 1 EU/ml and in other embodiments the endotoxin levels are substantially eliminated, *i.e.*, the chimeric polypeptides of the invention are substantially endotoxin free.

[0079] In one embodiment, recovered IB from lysed host cells is washed multiple times using a wash solution devoid of endotoxin, *i.e.*, endotoxin free water or solution. The recovered IP pellet can optionally be washed until endotoxin levels are below approximately 1 EU/ml (endotoxin tests can be performed using one or more known assays, including commercially available test kits from MP Biochemicals, Charles River, etc.). In some embodiments the wash solution is endotoxin free and includes one or more proteolytic protein inhibitor(s), *e.g.*, phenylmethanesulphonylfluoride (PMSF), 4-(2-aminoethyl)-benzenesulphonyl fluoride (AEBSF), etc. In some embodiments the wash solution is phosphate buffered saline (PBS) having an inhibitory effective amount of PMSF, AEBSF or a combination of both PMSF and AEBSF.

[0080] In some aspects, substantially endotoxin free pellets can be treated with a protein unfolding solution at pH 12.5 containing urea and refolded in a protein refolding solution containing a reduced molarity of urea with arginine, glycerol and/or sucrose. Purified chimeric protein concentration is modified to be between 1 and 3 mg/ml and typically about 1.4 to 1.8 mg/ml. In some cases, substantially endotoxin free chimeric protein is provided to vaccine formulations at about 1.5 to 5 mg/2ml dose and more typically from 2.0 to 3.5 mg/2 ml dose.

[0081] Other endotoxin removal procedures are envisioned to be within the scope of the present invention and can include, for example, commercially available ion-exchange endotoxin removal columns, hydrophobic columns, etc (see for example Mustang E or G Columns (Millipore)).

[0082] Enhanced Immune Response Adjuvant

[0083] Embodiments of the invention provide new adjuvants for enhanced induction of humoral immunity. These adjuvants provide a significant improvement over conventional materials for the induction of a humoral response. Adjuvants herein can be used with numerous vaccines, but are shown in the Examples in use with polypeptides of the invention for vaccination in dairy cows, pigs or bull calves.

[0084] Importantly, all components of adjuvants herein are of non-animal origin, thereby eliminating potential cross-contamination of vaccinated animals from potentially contaminated adjuvant components. For example, embodiments herein can utilize animal origin free Tween 80. This is particularly important when the target animal is a dairy cow, due to concerns over bovine spongiform encephalopathy (BSE) or other like bovine ailments. Note that these concerns are equally appropriate for human treatment where non-animal origin adjuvant provide significant safety benefits. Additionally, adjuvant embodiments herein are free of benzene and other like carcinogenic compounds. These embodiments provide a safety benefit not available in most conventional adjuvant compounds. For example, embodiments herein can utilize Carbopol® 974P or benzene free polycyclic acid.

[0085] In one embodiment, the immunological adjuvant comprises an oil-in-water emulsion in combination with selected antigens admixed within an emulsion premix.

[0086] Illustrative oil-in-water emulsions for use herein include combinations of mineral oil, Tween 80, Span 85 and target polymers (benzene-free Polyacrylic acid). In some cases the target polymer is selected from the group consisting of Carbomer Homopolymer Type B. Typical oil-water emulsions comprise from about 8-10% mineral oil (v/v), 0.003 to 0.004% Tween 80 (v/v), 0.007 to 0.008 Span 85 (v/v) and 0.04 to 0.06% polymer (w/v).

[0087] Illustrative emulsion premixes of the invention are composed of a high molecular weight polymer, surfactant, and emulsifier in at approximate 50% oil-aqueous base. High molecular weight polymers for use herein include acrylic acids crosslinked with allyl ethers

of pentaerythritol. In some cases the high molecular weight polymers have a Brookfield RVT viscosity of between about 29,000 and 40,000, for example, Carbopol® 974P (Noveon, Inc).

[0088] Method For Obtaining Optimized Immune Response In Dairy Cows or Other Target Farm Animals

[0089] In accordance with compositions and methods of the present invention, the immunogenic compositions described herein (endotoxin free, codon-optimized, CAT-deficient somatostatin constructs) are combined with novel adjuvants, as described above, to provide vaccines of the invention. In one embodiment, endotoxin free, codon-optimized, CAT deficient somatostatin constructs at a total dose of 2.98 mg/2ml (of which from 5% to 25% is adjuvant (v/v), more typically from 10% to 20% is adjuvant and most typically about 20% is adjuvant) is administered. Note that other conventional adjuvants are envisioned to be within the scope of the invention and can be used with the codon-optimized, CAT-deficient somatostatin constructs of the invention, however, optimal results have been shown when the novel adjuvants herein are used in this capacity.

[0090] The purpose of the novel somatostatin constructs and adjuvant is to increase the productivity of a target animal, typically a farm animal, and more typically a dairy cow, bull calve, sheep, pig, or goat.

[0091] The preparation is injected intramuscularly or subcutaneously, preferably fewer than 12 times, more preferably fewer than 6 times, and in some cases as few as only one time. When more than one injection is required in a target animal, an interval of 14 to 28 days is typical before the next injection. As noted above, embodiments herein avoid the use of recombinant hormone treatment to target animals, a major benefit in the animal husbandry field (recombinant growth hormone has been associated with early onset of puberty in girls and various environmental concerns that the manure from treated cattle can adversely effect both surface and groundwater environments).

[0092] Sterile compositions of the invention can be administered by subcutaneous or intramuscular routes. In typical cases the site of administration is the target animal's neck or tail, although other sites may be utilized. Note that a site should be used such that an adverse reaction does not impede the animal's ability to move, eat, drink, etc.

25

[0093] As noted above, vaccines herein, typically in an endotoxin free state, using the novel adjuvants described herein, provide a significant improvement in meat and milk production of dairy cows, cattle, pigs, etc. These treatments, however, are not accompanied by an increase in feed consumption.

EXAMPLES

[0094] The following examples are provided for illustrative purposes only and are not intended to limit the scope of the invention.

Example 1: Construction of CAT-defective Somatostatin Fusion Protein

[0095] The present example illustrates the production of a CAT-defective somatostatin fusion protein in accordance with embodiments of the present invention. Site-directed mutagenesis was performed on plasmid pET30b-Cat-Som to replace His192 and His193 with glycine residues (after modification: Gly192 and Gly193). Inactivation of the His193 (and His192) residues eliminates the capacity of the CAT enzyme to accept protons, thereby providing complete inactivation of the CAT.

[0096] The spacer in the same pET30b-Cat-Som (having the His replacement(s)) was codon-optimized for expression by E. coli in the absence of co-expressed tRNA molecules.

[0097] The modified CAT-defective somatostatin nucleic acid construct is shown as SEQ ID NO: 12. The CAT-defective somatostatin fusion protein sequence is disclosed as SEQ ID NO: 13, being compared to an unmodified CAT-somatostatin fusion protein (SEQ ID NO: 14).

Example 2: CAT-defective Somatostatin Fusion Protein Can Be Expressed At High Levels

[0098] The codon-optimized CAT-defective somatostatin construct as described in Example 1 was used to express the fusion protein in BL21(DE3) cells. Transformed cells were grown in LB and induced with 0.4 mM IPTG for approximately three hours. One milliliter of cells from a density of OD 0.7 culture were pelleted, and heated at 70°C for ten minutes in 100µl SDS sample buffer. A sample of 40µl of cell extract was loaded per lane for SDS PAGE.

[0099] As shown in Figure 2, a 28 KD band corresponding to the predicted size of a codon-optimized, CAT-defective somatostatin fusion protein was visible in lanes 1 (LB + IPTG, reduced) and 3 (LB + IPTG) after induction with IPTG. No expression is seen in control lanes 2

26

(LB, reduced) and 4 (LB). As expected, there was no difference in fusion protein size when run under standard or reducing conditions.

Example 3: Endotoxin Free, Codon-Optimized CAT-Deficient Somatostatin Containing Vaccine

[00100] An illustrative vaccine in accordance with the present invention:

- a. JH 14 (Adjuvant) 24 ml
 - mineral oil – 50% (v/v)
 - Tween 80 – 0.1694% (v/v)
 - Span 85 – 0.1915% (v/v)
 - Carbopol 974NP - 0.125% (w/v)
- b. Refolded Protein of the invention 95.6 ml
(2.96 mg/ml) – see Example 2
- c. Phosphate Buffered Saline 35.6 ml
- d. Antibacterial/Antifungal 0.36 mo
120 ml

[00101] Example 4: Endotoxin Free Chimeric Peptides/Adjuvants Provide Increased Milk Production

- [00102] A random pool of dairy cows (Holstein Crosses – US bred and raised) was identified, each was 31 to 65 days post-calving (3rd through 5th lactation). Each cow was examined and determined to be in optimal health by a veterinarian.
- [00103] The average cow weight in the study was from about 1,000 to 1,200 lbs. Six lactating cows were treated with 1.96 mg/ chimeric protein/2 ml dose in JH14. Alternatively, 9 lactating cows were provided with a conventional rBST treatment. Treatments and milk production study was conducted at a large scale, intense milk production dairy.
- [00104] Vaccinations were conducted at day 0 . Anti-SST serum antibodies and IGF-1 serum levels tested at 4 weeks, , Milk production and identification of general health of animals were conducted on a regular schedule.
- [00105] Six cows that were vaccinated using inventive compositions described herein had a normal appearance, with no endotoxin reaction or food withdrawal. All six cows had a positive

serologic response to SST with a mean titer of 1:14. Milk production of the six cows was obtained with only one vaccination (see Fig. 3A), showing a mean yield increase of 23.7%.

[00106] Nine cows treated using conventional rBST injections at 0 and 14 days with an overall mean increase in milk productivity of 2% (see Fig. 3B).

[00107] The data in this Example shows the drastic improvement in effectiveness for using the endotoxin free constructs in combination with inventive adjuvants in dairy cows. These results are dramatically improved toward the animal's health and productiveness as compared to cows rejected two times with rBST.

[00108] Example 5: Endotoxin Free Chimeric Peptides/Adjuvants Provide Increased Meat Production In Piglets of Treated Sows

[00109] A random pool of sows will be identified, each being at least 35-36 days prior to farrowing. Each sow will be examined and determined to be in optimal health by a veterinarian. Pregnant sows will be immunized two times using vaccines of the invention (see Example 3), once at 35-36 days prior to delivery, and once at 8 days prior to delivery. A control group of pregnant sows will be maintained for comparison purposes (no vaccinations or vaccination with sterile saline).

[00110] Delivered piglets from the vaccinated group will have greater survivability and be of a greater average size. It is the increase in piglet size that enhances the percent survivability, as larger piglets are less likely to be pushed away from the sow's teat. Treated and control piglets will be weighed at day 21, day 30 and day 75. Vaccinations of the present invention will increase the piglet daily weight by an average of 35 % over the course of the 75 day period.

[00111] Importantly, piglet survivability and weight are increased through use of the vaccines of the present invention in the absence of recombinant growth hormone. This is a significant improvement over recombinant hormone therapy.

2A

[00112] Example 6: Endotoxin Free Chimeric Peptide/Adjuvants Provide Increased Meat Production in Treated Bull Calves

[00113] A random pool of bull calves, one to three months of age, will be identified, and injected with compositions of the invention. Weight increase over a period of approximately ten months will be monitored and compared to a control group, the control group being treated the same in every sense as the injected group except for the vaccine injections of the invention. Each bull calf will be examined and determined to be in optimal health by a veterinarian over the course of the treatments.

[00114] Injections herein for the vaccinated group are performed at zero weeks, 4 weeks and 8 (three total vaccinations). Vaccinations will be provided subcutaneously or intramuscularly to the neck using 18-21 gauge cc needle. Booster injections were also provided (4 boosts, three boosts or no boosts). Vaccination injections included 2 mg/2ml of the chimeric polypeptide. The chimeric polypeptide was prepared as described herein having both histidine residues in CAT replaced with glycine amino acids of the invention and a optimized linker as described by SEQ ID NO: 3.

[00115] Vaccinated bull calves and control calves are each weighed to take an initial weight. It is expected that vaccinated animals herein will show a 15 to 40% weight increase over control animals. This increase in average weight for treated bull calves shows a significant advantage over no treatment.

[00116] Importantly, harvested meat from treated bull calves does not contain recombinant growth hormone.

[00117] While the invention has been particularly shown and described with reference to a number of embodiments, it would be understood by those skilled in the art that changes in the form and details may be made to the various embodiments disclosed herein without departing from the spirit and scope of the invention and that the various embodiments disclosed herein are not intended to act as limitations on the scope of the claims.

CLAIMS

What is claimed is:

1. A chimeric polypeptide having the immunogenicity of somatostatin, comprising: an amino acid sequence of somatostatin-14 linked to a substantially inactive and truncated chloramphenicol acetyl transferase polypeptide wherein the somatostatin-14 is linked to the inactive chloramphenicol acetyl transferase by a spacer, the spacer optimized for optimal expression of the chimeric polypeptide in a target host cell and wherein the inactive chloramphenicol has at least histidine residue 193 replaced with an alanine, glycine or other like amino acid.
2. The chimeric polypeptide of claim 1 wherein the spacer has an amino acid sequence of SEQ ID NO: 10 or SEQ ID NO: 11.
3. The chimeric polypeptide of claim 1 wherein the substantially inactive and truncated chloramphenicol acetyl transferase polypeptide has an amino acid sequence of SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 7 or SEQ ID NO 8.
4. The chimeric polypeptide of claim 1 having an amino acid sequence with at least 99% sequence identity with the amino acid sequence of SEQ ID NO: 12.
5. The chimeric polypeptide of claim 1 having an amino acid sequence of SEQ ID NO: 12.
6. An immunogenic composition comprising the chimeric polypeptide of claim 1 together with a pharmaceutically suitable adjuvant in an amount effective to elicit an immune response.
7. An immunological adjuvant comprising an oil-in-water emulsion admixed with an emulsion premix wherein the oil-in-water emulsion comprises mineral oil, Tween 80, Span 85 and one or more polymers.

30

8. The adjuvant of claim 7 wherein the emulsion premix comprises a high molecular weight polymer, a surfactant, and an emulsifier in an oil-aqueous base.
9. The adjuvant of claim 7 further comprising pre-selected antigens wherein the antigens are native, recombinant or synthetic polypeptides, polysaccharides and glycoproteins..
10. An immunogenic composition comprising the chimeric polypeptide of claim 1 together with the adjuvant if claim 8.
11. A method for increasing milk production in dairy cows comprising:
vaccinating a dairy cow with one or more doses of the composition of claim 6; and
allowing for at least ten days during which a dairy cow's milk production will increase as compared to the same cow's milk production in the absence of the vaccination.
12. The method of claim 11 wherein the dairy cow is vaccinated with only one dose of the composition of claim 6.
13. A method for increasing milk production in dairy cows comprising:
vaccinating a dairy cow with one or more doses of the composition of claim 10; and
allowing for at least ten days during which a dairy cow's milk production will increase as compared to the same cow's milk production in the absence of the vaccination.
14. A method for increasing lean meat production in farm live-stock comprising;
vaccinating the farm live-stock

31

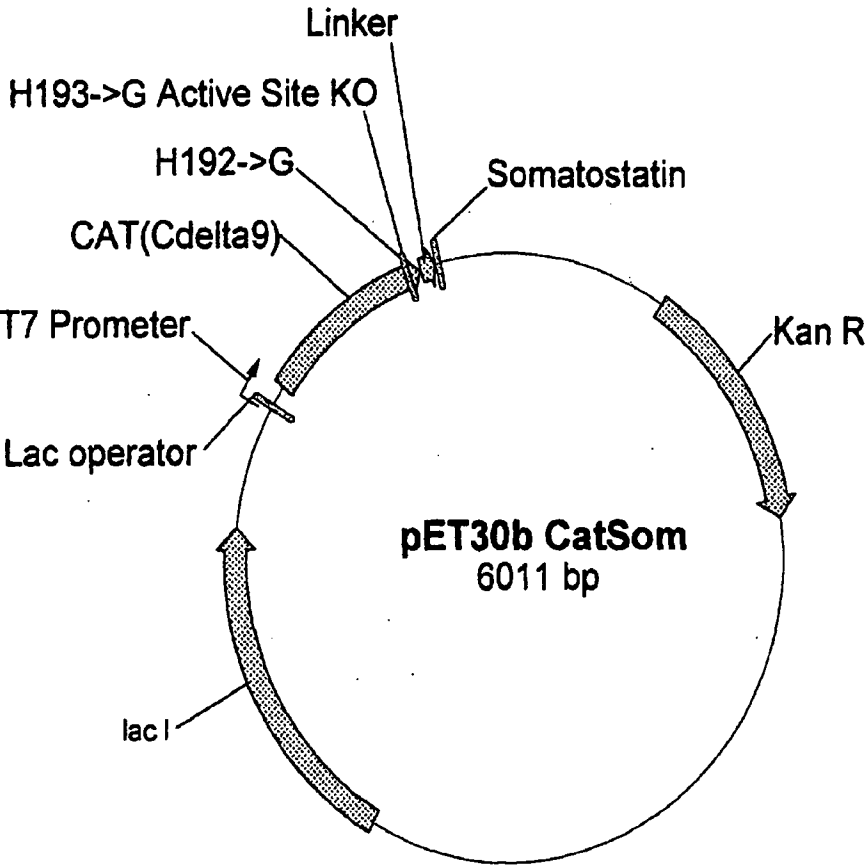


Fig. 1

32

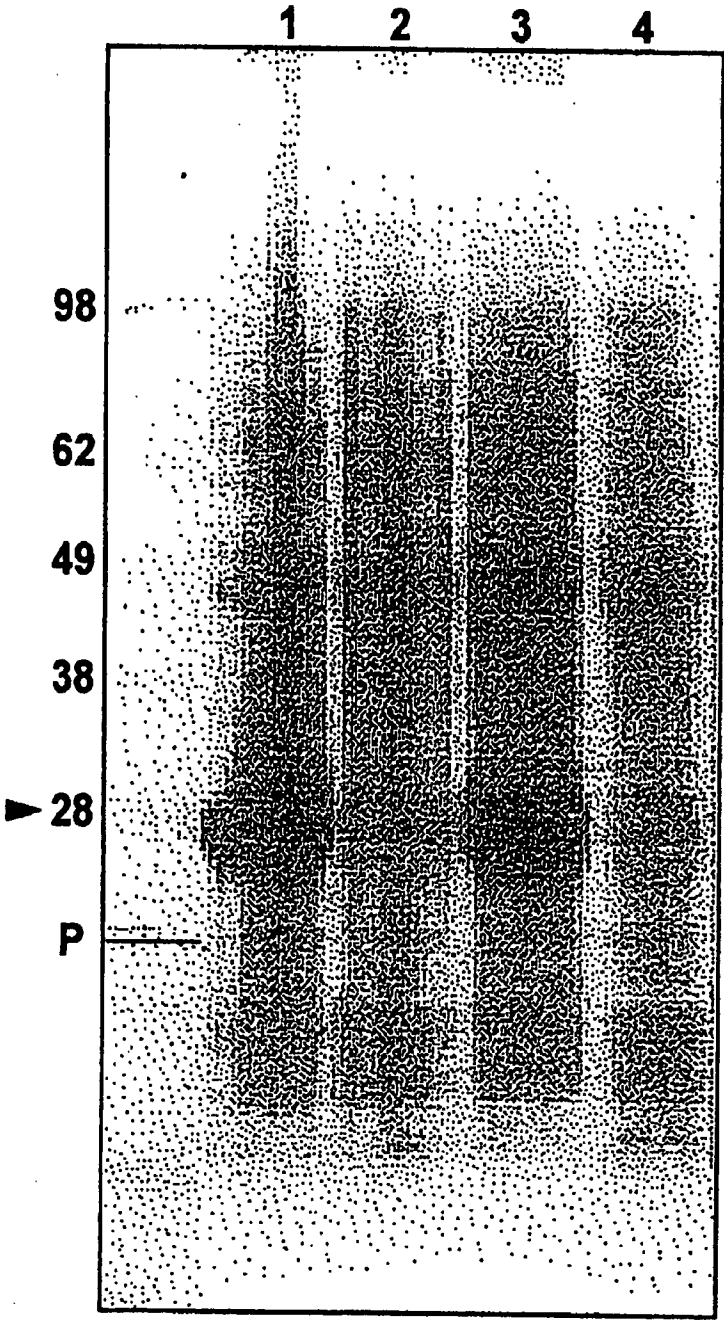


Fig. 2

33

Cow#	MY D10	MY D15	Increase Yield	% Increase
3381	30	34	+4 Lbs	13%
4222	32	40	+ 8 Lbs	25%
5961	40	55	+15 Lbs	38%
6141	20	29	+9 Lbs	45%
6142	30	35	+5 Lbs	17%
6540	24	25	+ 1 Lbs	4%
Mean	29.33	36.33	+7.0 Lbs	23.7%

CHIMERIC POLYPEPTIDE
TREATED

Fig. 3A

34

Cow #	Pre-Treatment (lbs)	Post-Treatment Period (Mean lbs)	% Change
983	56.3	55.7	-1%
3361	27.7	33.2	20%
4222	34.5	36.8	7%
5961	42.3	44.8	6%
6141	29.8	25.3	-15%
6142	34.5	27	-22%
6490	30.5	33.3	9%
6540	11	23.8	8%
6556	13.8	14.5	5%
Mean	32.4	32.7	2%

BST

Fig. 3B

Titulo: CLORANFENICOL ACETILTRANSFERASA (CAT)
 PROTEÍNA SOMATOSTATINA DE FUSIÓN DEFECTUOSA Y USOS DE ESTA

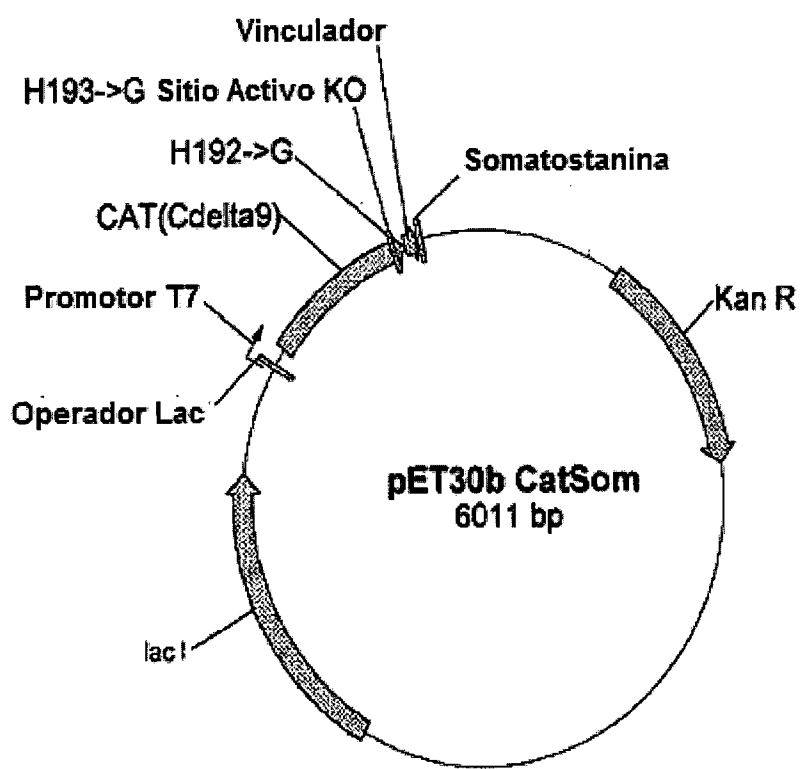


FIGURA 1

Resumen: polipéptidos basados en somatostatina quimérica, polinucleótidos usados para codificar los polipéptidos, los métodos para aislar y producir los polipéptidos y usos de estos se proveen. De manera adicional, adyuvantes de bajo costo para respuesta inmunogénica mejorada se proveen. Vacunas que incluyen ambos, polipéptidos basados en somatostatina quimérica y nuevos adyuvantes son incluidos, útiles en la producción de animales de granja.

**CLORANFENICOL ACETILTRANSFERASA (CAT) -
PROTEÍNA SOMATOSTATINA DE FUSIÓN DEFECTUOSA Y USOS DE ESTA**

CAMPO TÉCNICO

[0001] La presente invención se relaciona con polipéptidos basados en somatostatina quimérica usados para codificar los polipéptidos, los medios para aislamiento y producción de polipéptidos, y para los usos de estos. La presente invención también está relacionada con nuevos adyuvantes y composiciones de inmunización para inmunogenicidad mejorada de, por ejemplo, polipéptidos basados en somatostatina quimérica de la invención así como con otros como antígenos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0002] Somatostatina (también conocida como hormona del crecimiento que inhibe la hormona o GHIH) es una hormona péptida producida en el hipotálamo también como ciertas porciones del sistema digestivo. La somatostatina esta generalmente involucrada en la regulación del sistema endocrino a través de interacciones con receptores acoplados a proteína G de somatostatina. Esta cascada de señalización basada en somatostatina conduce a un número de acciones repartidas a través del cuerpo.

[0003] Relevante para aspectos de la presente invención, la somatostatina es conocida por inhibir la liberación de la hormona del crecimiento y tiroides estimulando la hormona desde la pituitaria interior. (Patel YC y Srikant CB, Somatostatina y sus receptores Adv Mol Cell Endocrinol, 1999. 3 43-73).

37

Otras hormonas inhibidas por la somatostatina incluyen insulina, glucagón, secretina, gastrina, pepsina, maletin, etc. (Patel YC y Srikant CB, Somatostatina y sus receptores Adv Mol Cell Endocrinol, 1999. 3 43-73). La habilidad de de la somatostatina para regular tantos factores/hormonas necesarios para el crecimiento y utilización de alimento han hecho de la somatostatina un objetivo central para el control del crecimiento animal en el campo de la ganadería, *por ejemplo*, inhibición de resultados de la somatostatina en niveles incrementados de la hormona del crecimiento estando presente en un animal objetivo y de este modo resultados en animales con capacidad mejorada para producir leche, para proveer mayores cantidades de carne, etc.

[0004] En particular, la inmunización de animales para la somatostatina se ha reconocido como un medio de neutralización de la somatostatina en un animal objetivo y de esta manera removiendo los efectos de la inhibición normal de la somatostatina en varios aspectos de la productividad del animal, *por ejemplo*, producción de leche en una vaca lechera. Reichlin S., ed. 1987, Somatostatina, Basic and Clinical Status, Plenum Press, New York (pp 3-50, 121-136, 146-156, 169-182, 221-228, 267-274) Spencer G.S., 1985, Sistemas hormonales regulando el crecimiento, análisis, Livestock Production Science, 12, 31-46. De manera importante, estos procedimientos de inmunización basados en somatostatina evitan el uso directo de hormonas anabólicas, *por ejemplo*, hormona del crecimiento, y *por el estilo*, en el animal y aplica para pequeños cambios en la concentración de los factores anabólicos endógenos y de esta forma productos alimenticios puros.

[0005] La somatostatina es conocida por tener una vida media relativamente corta en la sangre. Para mejorar los efectos inmunológicos de la somatostatina, se han desarrollado protocolos de inmunización para mejorar la vida media de las

proteínas conjugando somatostatina con proteínas portadoras objetivo. Estas proteínas de somatostatina conjugadas están diseñadas para tener una vida media incrementada y antigenicidad incrementada en la sangre y por lo tanto proveer beneficios mejorados (especialmente a la vista del costo de preparar la somatostatina). Por ejemplo, proteínas de somatostatina quiméricas son expuestas en la Patente U.S. No. 6, 316, 004, (y la correspondiente Patente Europea EP0645454) donde varias proteínas conteniendo somatostatina conjugada se muestran que tienen antigenicidad y función incrementada con relación a la producción de animales de granja en comparación con otros procedimientos convencionales de inmunización o anabólicos basados en hormonas.

[0006] Sin embargo, una dosis más baja, composiciones de inmunización basadas en una antigenicidad más alta y procedimientos son necesitados para mejorar la productividad general y la oportunidad en el campo de la ganadería. La presente invención es dirigida hacia el suministro de estos más antigénicos y funcionalmente activos compuestos de inmunización basados en somatostatina, composiciones y procedimientos.

[0007] Contra este telón de fondo la siguiente exposición se provee.

RESUMEN DE LA INVENCION

[0008] La presente invención provee nuevos polipéptidos, y los polinucleótidos que los codifican, presentando una inmunogenicidad mejorada de somatostatina. Los polipéptidos de la invención incluyen una somatostatina-14 fusionada a una proteína cloranfenicol acetiltransferasa sustancialmente inactivada a través de un vinculador funcionalmente optimizado. Los polipéptidos quiméricos de la

invención proveen una alta efectividad y un bajo costo de materiales para uso en el campo ganadero, como se describe en más detalle abajo. Las representaciones de la invención incluyen las secuencias del aminoácido y el ácido nucleico como se define en el ID DE SECUENCIA NOs: 1-14.

[0009] La presente invención también provee procedimientos de producción y purificación para hacer los polipéptidos quiméricos de la invención en un estado de endotoxina libre y altamente funcional. Los polipéptidos de endotoxina libre proveen una ventaja sustancial e inesperada para uso en ciertos animales objetivo, donde pequeñas cantidades de endotoxina, típicamente consideradas ventajosas para provocar una respuesta inmunológica, realmente conducen a una desventaja funcional significativa. Este es particularmente el caso cuando polipéptidos de la invención son usados para inmunizar vacas lecheras criadas en Estados Unidos. Adicionalmente, porque los polipéptidos quiméricos de la invención muestran una función mejorada si se compara con materiales convencionales, números de dosis más pequeñas y menores son usadas para inmunizar animales objetivo. Esta disminución en cantidades requeridas también provee una reducción resultante de endotoxina en vacunas de la invención. La combinación de endotoxina libre, aislamiento y cantidades de uso más pequeñas de los polipéptidos quiméricos de la invención permiten sustancialmente vacunas de endotoxina libre para ser usadas aquí.

[0010] La invención también provee composiciones adyuvantes que poseen una función mejorada y seguridad si se compara con materiales adyuvantes convencionales. Los adyuvantes aquí no contienen materiales derivados de animales y se encuentran libres de los carcinógenos químicos más conocidos, por ejemplo, benceno y similares. Las composiciones adyuvantes aquí han probado

ser de manera inesperada efectivas en la generación de una respuesta inmunológica cuando se combina con antígenos objetivo.

[0011] La invención además provee vacunas que contienen los polipéptidos quiméricos de la invención con composiciones adyuvantes de la invención. Las vacunas aquí son usadas para inducir respuestas inmunes en animales y aviares vacunados, por ejemplo, animales de granja objetivo. Animales de granja ilustrativos para uso aquí incluyen: vacas lecheras, cerdos, ovejas, cabras, pavos, conejos y terneros. En algunos aspectos los polipéptidos de la invención están preparados y purificados con baja o no asociada endotoxina. Estas vacunas han sido optimizadas para provocar reacciones inmunológicas seguras y mejoradas en el animal objetivo.

[0012] La invención además incluye métodos para la vacuna de animales y aviares objetivo usando las vacunas de la invención. Métodos ilustrativos son provistos para vacuna de vacas lecheras para mejorar la producción lechera en una manera segura (para el animal y el usuario final), rentable y altamente útil. Otros métodos ilustrativos incluyen la vacuna de lechones, ovejas, pavos, cabras, conejos y terneros para mejorar la producción de carne (y particularmente carne magra) en un animal objetivo en una manera segura y rentable.

[0013] Estas y otras características y ventajas varias de la invención serán aparentes de una lectura de la siguiente descripción detallada y de una revisión de las solicitudes adjuntas.

DESCRIPCIÓN BREVE DE LOS DIAGRAMAS

41

[0014] La FIGURA 1 es un esquema ilustrativo de un plásmido pET30b CatSom de acuerdo con representaciones de la presente invención. El plásmido incluye un marcador de resistencia de Kanamicina, un operador Lac, un promotor T7, una secuencia de codificación CAT todo en concordancia con las representaciones de la invención, una región de vinculación de acuerdo con la invención aquí y una región de codificación de somatostatina de acuerdo con la invención son aquí incluidos.

[0015] La FIGURA 2 es un SDS-PAGE manchado ilustrativo que muestra una banda 28KD que corresponde a el tamaño predicho de un codón optimizado, CAT – polipéptido de somatostatina defectuoso de la invención. Banda 1 es LB+IPTG, reducido, Banda 2 es LB, reducido, Banda 3 es LB+IPTG y Banda 4 es LB.

[0016] La FIGURA 3A y 3B son tablas que muestran la producción de leche en litros por día de ganado (BSY) vacunado (usando vacunas como se describe en el Ejemplo) y de control. Cada vaca tuvo un número de identificación específico como se muestra en cada una de las tablas.

IDENTIFICACIÓN DE SECUENCIAS E IDENTIFICADORES DE SECUENCIA

[0017] ID de Secuencia No. 1 AGCKNFFWKTFTSC

[0018] ID de Secuencia No. 1a

GCTGGCTGCAAGAATTTCTTCTGGAAGACTTTCACA TCCTGT

✓12

[0019] ID de Secuencia No. 2: (His192->Gly, His193->Gly):

Atggagaaaaaaatcactggatataccaccgttgatatacccaatggcatcgtaaagaacatttgaggcatttcagtcagttgctcaatgta
cctataaccagaccgttcagctggatattacggcctttttaagaccgtaaagaaaaataagcacaagtttatccggcctttattcacattcttg
cccgctgatgaatgctcatccggaattccgtatggcaatgaaagacggtagctggtgatatgggatagtggtcaccctgttacaccgtttt
ccatgagcaaaactgaaacgttttcacgctctggagtgaataccacgacgatttccggcagtttctacacatatattcgcaagatgtggcgtgtt
acggtgaaaacctggcctatttccctaaagggtttattgagaatatgttttcgtctcagccaatccctgggtgagtttcaccagtttgatttaaac
gtggccaatatggacaacttcttcgccccgttttcaccatgggcaaatattatagcaaggcgacaagggtgctgatgccgctggcgattcag
gttggtggtgccgtttgtgatggcttccatgtcggccgtatgcttaatgaactgcagcag

[0020] ID de Secuencia No: 3: (His192->Gly, His193->Gly):

Mekkitgyttvdisqwhrkehfeafqsvaqtynqtvqlidatflktvknkhkfyfapfihilarlmnahpefrmamkdgelviwds
vhpcytfheqtetfsslwseyhddfrqflhiysqdvacygenlayfpgkfienmffvsanpwvsvtsfdlnvanmdnffapvfimg
kyytqgdkvlmplaiqvvgavcdghvgrnlnelqq

[0021] ID de Secuencia No: 4 (His193->Gly)

Atggagaaaaaaatcactggatataccaccgttgatatacccaatggcatcgtaaagaacatttgaggcatttcagtcagttgctcaatgta
cctataaccagaccgttcagctggatattacggcctttttaagaccgtaaagaaaaataagcacaagtttatccggcctttattcacattcttg
cccgctgatgaatgctcatccggaattccgtatggcaatgaaagacggtagctggtgatatgggatagtggtcaccctgttacaccgtttt
ccatgagcaaaactgaaacgttttcacgctctggagtgaataccacgacgatttccggcagtttctacacatatattcgcaaga(gtggcgtgtt
acggtgaaaacctggcctatttccctaaagggtttattgagaatatgttttcgtctcagccaatccctgggtgagtttcaccagtttgatttaaac
gtggccaatatggacaacttcttcgccccgttttcaccatgggcaaatattatagcaaggcgacaagggtgctgatgccgctggcgattcag
gttcatggtgccgtttgtgatggcttccatgtcggccgtatgcttaatgaactgcagcag

[0022] ID de Secuencia No: 5 (1 His193->Ala)

Atggagaaaaaaatcactggatataccaccgttgatatacccaatggcatcgtaaagaacatttgaggcatttcagtcagttgctcaatgta
cctataaccagaccgttcagctggatattacggcctttttaagaccgtaaagaaaaataagcacaagtttatccggcctttattcacattcttg
cccgctgatgaatgctcatccggaattccgtatggcaatgaaagacggtagctggtgatatgggatagtggtcaccctgttacaccgtttt
ccatgagcaaaactgaaacgttttcacgctctggagtgaataccacgacgatttccggcagtttctacacatatattcgcaagatgtggcgtgtt
acggtgaaaacctggcctatttccctaaagggtttattgagaatatgttttcgtctcagccaatccctgggtgagtttcaccagtttgatttaaac
gtggccaatatggacaacttcttcgccccgttttcaccatgggcaaatattatagcaaggcgacaagggtgctgatgccgctggcgattcag
gttcatgctgccgtttgtgatggcttccatgtcggccgtatgcttaatgaactgcagcag

[0023] ID de Secuencia No: 6 (1 His+CAT wt)

Atggagaaaaaatcactggatataccaccgttgatafatcccaatggcatcgtaaagaacattttgaggcatttcagtcagttgctcaatgta
cctataaccagaccgttcagctggatattacggcctttttaagaccgtaaagaaaaataagcacaagtttatccggcctttattcacattcttg
cccgctgatgaatgctcatccggaattccgtatggcaatgaaagacggtagctggatgatggatagttcacccttggtacaccgtttt
ccatgagcaaaactgaaacgttttcacgcctggagtgaataccacgacgatttccggcagtttctacacatatattcgcaagatgtggcgtgtt
acggtgaaaacctggcctatttccctaaagggttattgagaatagttttctctcagccaatccctgggtgagttcaccagttttgatttaaac
gtggccaataiggaacttcttcgccccgttttcaccatgggcaaatattatagcaaggcgacaagggtgctgatgccgctggcgattcag
gttcatgggtgccgtttgtgatggcttccatgtcggcagaatgcttaataactgcagcag

[0024] ID de Secuencia No: 7 (one H->G):

Mekkitgyttvdisqwhrkehfeafqsvaqtynqtvqlditaflktvknkhkfyapafihilarlmnahpefrmanmkgelviwds
vhpcytfheqtetfsslwseyhddfrqflhiysqdvacygenlayfpgkfienmffvsanpwvsfstdlnvanmdnffapvftmg
kyytqgdkvimplaiqvghavcdgfhvgrmlnelqq

[0025] ID de Secuencia No: 8 (H->A)

Mekkitgyttvdisqwhrkehfeafqsvaqtynqtvqlditaflktvknkhkfyapafihilarlmnahpefrmanmkgelviwds
vhpcytfheqtetfsslwseyhddfrqflhiysqdvacygenlayfpgkfienmffvsanpwvsfstdlnvanmdnffapvftmg
kyytqgdkvimplaiqvhaavcdgfhvgrmlnelqq

[0026] ID de Secuencia No: 9

tgggaactgcaccgttctgtgccacgcccgcgccctcgcccacgtccggaattcatg

[0027] ID de Secuencia No: 10

welhrsgprprprprpefm

[0028] ID de Secuencia No: 11

welhrsgp(rp)nefm donde $n > 1$

24

[0029] ID de Secuencia No: 12

Atggagaaaaaacactggatataccaccgttgatataccaatggcatcgtaaagaacatttgaggcatttcagtcagttgctcaatgta
cctataaccagaccgttcagctggatattacggccttttaagaccgtaagaaaaataagcacaagtttatccggcctttattcacattctg
cccgctgatgaatgctcatccggaattccgtatggcaatgaaagacggtagctggatgggagtagttcaccttggtacaccgttt
ccatgagcaaaactgaaacgtttcatcgctctggagtgaataccacgacgatttccggcagtttctacacatatattcgcaagatgtggcgtgtt
acggtgaaaacctggcctatttcctaaagggttattgagaatatgtttcgtctcagccaatccctgggtgagtttcaccagtttgatttaaac
gtggccaatatggacaacttcttcgccccgttttcaccatgggcaaatattatacgcaaggcgacaagggtgctgatccgctggcgattcag
gttgggtggtgccgtttgtgatggcttccatgtcggcgtatgcttaataactgcagcagtggggaactgcaccgttctgggccacgccgcgc
cctcgccacgtccggaattcatggcggctgcaagaacttcttttgaaaacctttacgagctgc

[0030] ID de Secuencia No: 13

mekkitgyttvdisqwhrkehfeafqsvaqtynqtvql ditaflktvkkknkhkfyapafihilarlmmahpefrmamkdgelviwdsv
hpcytfheqtetfsslwseyhddfrqflhiysqdvacygenlayfpkgfienmffvsanpwvsfstdlnvanmdnffapvftmgk
yytqgdkvimplaiqvvggavcdgfhvgrmlnelqqwelhrsgprprprpefinagcknffwktftsc

[0031] ID de Secuencia No: 14

mekkitgyttvdisqwhrkehfeafqsvaqtynqtvql ditaflktvkkknkhkfyapafihilarlmmahpefrmamkdgelviwdsv
hpcytfheqtetfsslwseyhddfrqflhiysqdvacygenlayfpkgfienmffvsanpwvsfstdlnvanmdnffapvftmgk
yytqgdkvimplaiqvhhavcdgfhvgrmlnelqqwelhrsgprprprpefinagcknffwktftsc

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0032] Las representaciones de la presente invención proveen polipéptidos quiméricos, y construcciones de ácidos nucleicos que codifican los mismos, teniendo inmunogenicidad mejorada de somatostatina. Las representaciones aquí incluyen métodos para la preparación de la proteína quimérica así como métodos para el uso de la proteína quimérica para incrementar cierta productividad de los animales de granja objetivo, y especialmente para incrementar la producción de leche y vacas lecheras y producción de carne de ganado, cerdos, ovejas, conejos, cabras, terneros, etc.

45

[0032] Las representaciones de la presente invención también incluyen nuevos adyuvantes para el uso con las proteínas quiméricas de la invención para inmunogenicidad mejorada en un animal objetivo, seguridad mejorada para el animal objetivo que está siendo vacunado y seguridad mejorada para un usuario del animal objetivo, *por ejemplo*, consumidor del animal vacunado o consumidor de un producto del animal vacunado.

[0034] En un aspecto, la invención provee una proteína de somatostatina quimérica diseñada para inmunogenicidad mejorada de somatostatina. Las representaciones de la proteína de somatostatina quimérica incluyen una secuencia de aminoácido de somatostatina-14 unida por una secuencia vinculador a una proteína troncada de cloranfenicol acetiltransferasa (CAT) sustancialmente inactivada. En algunos casos el vinculador (también referido aquí como un espaciador) ha sido optimizado para mejorar la producción del polipéptidos quimérico en las células huésped objetivo. En otros casos, métodos son proveídos para la producción y aislamiento de estas cantidades mejoradas de proteína quimérica en un estado sustancialmente endotoxina libre.

[0035] En otro aspecto, la invención proporciona nuevas composiciones adyuvantes (las cuales no contienen proteínas o químicos derivados de animales, como benceno) y vacunas que incorporan proteínas de somatostatina quimérica de la invención. Las representaciones incluyen de manera inesperada efectivas proteínas de somatostatina adyuvante/quimérica (típicamente sustancialmente endotoxina libre), *por ejemplo*, nuevas vacunas, composiciones para provocar antigenicidad en animales de granja objetivos vacunados. En algunas representaciones el animal de granja objetivo es una vaca lechera, ternero, cerdo, cabra, etc. Note que a pesar de que los adyuvantes de la presente invención están descritos en combinación con las proteínas quiméricas de somatostatina

46

aquí, se prevé que los adyuvantes de la invención puedan ser usados con otras vacunas y en una variedad de animales objetivo, *por ejemplo*, humanos, cerdos, perros, gatos, etc.

[0036] En otros aspectos, se proporcionan métodos para la vacuna de animales de granja objetivo usando tan poco como una dosis de esta nueva vacuna para obtener productividad mejorada, producción de leche mejorada en vacas lecheras y otros animales de granja. Estos procedimientos de dosis mejorados (más pocos números de vacunas y concentraciones más pequeñas de somatostatina quimérica) proporcionan efectividad de tiempo y costos más bajos, lo cual cuando se extiende a la industria de los lácteos representa un adelanto significativo en la productividad de animales de granja. También, los métodos expuestos aquí evitan el uso la terapia de la hormona del crecimiento recombinante los cual son de interés en la industria del cuidado de la salud, por ejemplo, para el animal de granja objetivo, el usuario final y el ambiente donde la excreción de la hormona del crecimiento recombinante es liberada en el suministro de agua subterránea.

[0037] Definiciones

[0038] las siguientes definiciones se proveen para facilitar el entendimiento de ciertos términos usados con frecuencia aquí y no pretender limitar el alcance de la presente exposición.

[0039] El término "aminoácido" se refiere a cualquiera de veinte aminoácidos naturales así como cualquier secuencia de aminoácido modificada. Las modificaciones pueden incluir procesos naturales como procesamiento postraduccion, o puede incluir modificaciones químicas que son conocidas en el

42

estado de la técnica. Las modificaciones incluyen pero no se limitan a: fosforilación, ubiquitinación, acetilación, amidación, glicosilación, unión covalente de flavina, ADP - ribosilación, entrecruzamiento, yodación, metilación, y por el estilo.

[0040] Los términos “polipéptido quimérico” o función de proteína se refieren a un primer polipéptido que tiene ligado un segundo, polipéptido heterólogo, de manera que el primero y segundo polipéptido están expresados en el marco. Con frecuencia los dos polipéptidos pueden estar ligados a través de un vinculador o segmento espaciador para optimizar la expresión y función de los polipéptidos quiméricos de la invención.

[0041] El término de “endotoxina” se refiere a toxinas asociadas en las paredes de las células de la bacteria gram positiva. En algunos casos las toxinas son componentes lipopolisacáridos de membranas bacteriales. Componentes de membrana exterior de paredes de células de bacteria gram positiva.

[0042] El término “célula huésped” o “células huésped” se refiere a células establecidas en cultivo *ex vivo*. Este es característico de células huésped discutidas aquí que son capaces de expresar las proteínas quiméricas de la invención. Ejemplos de células huésped útiles para aspectos de la invención incluyen, pero no se limitan a, células bacteriales, de levadura, de insectos y de mamíferos. Ejemplos específicos de tales células incluyen células de insectos SF9 (Summers and Smith, 1987, Texas Agriculture Experiment Station Bulletin (Boletín de la Estación Experimental de Agricultura de Texas), p 1555), células *E. Coli* (BL21 (DE3), Novagen), levadura (*Pichia Pastoris*, Invitrogen) y células de hígado humano (Hep G2 (ATCC HB8065)).

48

[0043] El término “secuencia de ácido nucleico” se refiere al orden de secuencia de desoxirribonucleótidos a lo largo de una línea de ácido de ácido desoxirribonucleico. El orden de estos desoxirribonucleótidos determina el orden de los ácidos aminos a lo largo de una cadena polipéptida. Los códigos de secuencias de desoxirribonucleótidos para la secuencia de ácido amino.

[0044] Los términos “proteína”, “péptido”, y “polipéptidos” son usados indistintamente para denotar un polímero de aminoácido o un grupo de dos o más interactuando o ligados a polímeros de ácido amino.

[0045] El término “sustancialmente” se refiere a “en gran medida”, por ejemplo, sustancialmente removido significa que al menos 75%, mas típicamente al menos 80%, 85%, 90%, 95% y mas típicamente 96%, 97%, 98%, 99% del material objetivo es removido; sustancialmente inactivo significa al menos 75%, mas típicamente 80%, 85%, 90%, 95% y mas típicamente 96%, 97%, 98%, 99% de una enzima esta inactivada. Como tal una enzima CAT sustancialmente inactiva es una que tiene 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de su actividad removida. (La actividad de CAT puede ser determinada usando ensayos funcionales conocidos, por ejemplo enlaces de n-butil coenzima A a cloranfenicol radiomarcado y medida subsecuente por Liquid Scintillation Counting (Conteo de centelleo líquido) - LCS); por determinación de la cantidad de marcador radioactivo transferido desde [¹⁴C]acetil CoA a cloranfenicol por cromatografía de capa delgada (ver Clonación Molecular: A Laboratory Model, 3rd ed., J Sambrook and DW Russel, 2001. Cold Spring Harbor Press) u otro conocido o ensayo del mismo modo].

[0046] El término “vector” es usado con referencia a moléculas de ácido nucleótido que transfieren segmento (s) de DNA de una célula a otra célula. El

49

término "vehículo" es usado algunas veces indistintamente con vector. Dos tipos comunes de vectores son vectores plásmidos y virales.

[0047] Somatostatina

[0048] Un numero de estudios han mostrado que animales inmunizados con somatostatina tienen un promedio de ganancia diaria del 10 al 20%, un apetito reducido por 9% y un 11% de incremento en la eficiencia de la utilización del alimento. Animales inmunizados con somatostatina, y también sus descendencias, tienen proporciones correctas, y la distribución del peso de los animales entre los músculos, huesos y grasa es la misma que en animales control (ver Reichlin, 1987). Por lo tanto, la inmunización con somatostatina proporciona una forma útil y segura de mejorar la productividad del animal objetivo. Este es particularmente el caso cuando se compara con el uso de la hormona del crecimiento recombinante, cuyo uso ha elevado las preocupaciones sobre la hormona en la leche o la carne de animales tratados o por la seguridad de los mismos animales o por la acumulación de la hormona en el ecosistema, particularmente en el suministro de agua subterránea.

[0049] Somatostatina-14 tetradecapéptido biológicamente activo producido en el hipotálamo y en el tracto gastrointestinal. La secuencia del aminoácido del tetradecapéptido es AGCKNFFWKTFTSC (ID DE SECUENCIA No.: 1). La secuencia de somatostatina-14 está altamente conservada entre los animales (Lin XW entre otros, Evolution of neuroendocrine peptide systems: gonadotropin-releasing hormone and somatostatin (Evolución de Sistemas péptidos de neuroendocrina: hormona de liberación de gonadotropina y somatostatina). Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol. 1998 119 (3): 375-88).

SD

El tetradecapéptido es decodificado por una secuencia de ácido nucleico GCTGGCTGCAAGAATTTCTTCTGGAAGACTTTTCACATCCTGT (ID DE SECUENCIA No.: 1a) (note que otras secuencias de ácido nucleico pueden ser usadas para codificar ID DE SECUENCIA No.: 1, sin embargo, ID DE SECUENCIA No.: 1a se provee con propósitos ilustrativos).

[0050] Somatostatina-14 es conocida por tener un fuerte efecto inhibitorio en un gran número de hormonas involucradas en el crecimiento y utilización de alimento en animales. Como se describió previamente en la Patente U.S. No. 6, 316, 004 (incorporadas aquí por referencia para todos los usos), somatostatina-14 y versiones quiméricas de somatostatina pueden ser usadas en inmunización de animales para un incremento en el peso diario y, donde sea apropiado, producción de leche.

Estos procedimientos de inmunización fueron realizados con adyuvantes convencionales y no utilizaron materiales basados en somatostatina de esta invención. Note que el tratamiento de animales objetivos con anticuerpos anti-somatostatina ha demostrado ser excesivamente costoso y funcionalmente no dramático, de tal modo eliminando el tratamiento de anticuerpo directo como no práctico. Muromtsev G.S., entre otros, 1990, Basics of agricultural biotechnology (Bases de la biotecnología agrícola), Agropromizdat, Moscow, pp 102-106. Un aspecto de la presente invención está basado en el concepto que los anticuerpos anti-somatostatina y los métodos descritos aquí atenúan pero no eliminan completamente la mayoría de las acciones inhibitorias de somatostatina en el animal objetivo. Este proceso produce un incremento natural y proporcional en el crecimiento y productividad en animales objetivo inmunizados.

51

[0051] Como tal, aspectos de la presente invención facilitan la inmunización basada en somatostatina proporcionando materiales altamente inmunogénicos para uso en la inmunización de animales objetivo. Estos compuestos de inmunización basados en somatostatina han sido optimizados para expresión y antigenicidad. En algunas representaciones, la somatostatina-14 es expresada como codón optimizado, CAT – polipéptidos quimérico de somatostatina deficiente. Estos materiales proporcionan un mejoramiento inesperado sobre otras vacunas basadas en inmunización.

[0052] Nuevo Codón Optimizado, CAT – Construcciones de Somatostatina Deficientes

[0053] Un aspecto de la invención provee moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican proteínas quiméricas que posee una actividad inmunogénica de somatostatina optimizada. En particular, representaciones de la invención incluyen nuevas construcciones de ácido nucleico que codifican proteínas de fusión CAT que tienen actividad inmunogénica por somatostatina. Estos polipéptidos han sido identificados para actividad funcional óptima en procedimientos de inmunización.

[0054] En una representación, una construcción que tiene un esquema como se muestra en la FIGURA 1 se provee para codificar los polipéptidos quiméricos de la invención. Construcciones de ácido nucleico de la invención generalmente codifican una enzima CAT inactiva sin ácidos amino 10C-terminal e incluyen uno o más ácidos amino de histidina sustituida. Una inactivación sustancial de CAT evita reacciones adversas para CAT en el animal objetivo inyectado (y por lo tanto se evita la resistencia de CAT). Note que el cloranfenicol es un antibiótico comúnmente usado en la industria ganadera y la resistencia al cloranfenicol en

ganado seria adverso para la seguridad de los animales vacunados usando los materiales de la invención. De esta manera, construcciones que tienen un CAT inactivado tienen la inmunogenicidad de CAT son los efectos adversos de resistencia en animales vacunados (un asunto de seguridad problemático para los animales).

[0055] La enzima CAT es inactivada a través de la remoción del grupo imidazol de His193 (His195 en la variante canónica CAT_{III}, ver Lewendon entre otros adelante). En otra representación la enzima CAT es inactivada a través de la remoción de los grupos imidazol de ambos His 193 y His 192 próximo (respectivamente His195 y His194 para CAT_{III}). La remoción del His193 esencial (His195 en CAT_{III}) grupo imidazol del sitio activo de CAT y el reemplazo con una alanina, glicina u otro como aminoácido resulta en una inactivación sustancial de la enzima CAT (Lewendon entre otros (1994). El reemplazo de histidina-195 catalítica de cloranfenicol acetiltransferasa: evidencia para un rol base general para glutamato. Biochemistry (Bioquímica). 33 (7): 1944-50.). Finalmente, las representaciones aquí pueden también incluir inactivación de la enzima CAT a través de la remoción del grupo imidazol de His192 solo (His 194 para CAT_{III}). En cuanto a His 193, el reemplazo puede ser con alanina, glicina u otro como ácido amino.

[0056] En algunos aspectos, los uno o más ácidos amino de histidina sustituidos son codificados por ácidos nucleicos localizados en posiciones de números 574-576 y 577-579 del ID DE SECUENCIA No.: 2 (correspondiente a números de aminoácido 192 y 193 en el ID DE SECUENCIA No.: 3). En algunas representaciones las secuencias de ácidos nucleótidos de la invención incluyen ID DE SECUENCIA No.:4, ID DE SECUENCIA No.:5 y ID DE SECUENCIA No.:6. Proteínas quiméricas de la invención que incluyen construcciones de histidina

sustituida aquí proporcionan proteínas altamente inmunogénicas con poca o no actividad CAT, un avance significativo sobre el estado de la técnica actual. Las representaciones de la enzima CAT sustancialmente inactivada están unidas con un polipéptido de somatostatina de la invención. Esta unión puede ser hecha directamente o con un vinculador (como se describe de mejor manera adelante).

[0057] La inactivación de los sitios objetivo (His 192 y/o His 193) puede ser conseguida a través de cualquier número de procedimientos desconocidos para aquellos con habilidades en la técnica incluyendo mutagénesis dirigida y montaje de gen sintético. En una representación, la secuencia de ácido nucleico que codifica histidina 193 es modificada para codificar una alanina, glicina u otro como ácido amino. En otra representación, las secuencias de ácido nucleicos que codifican histidina 192 son modificadas para codificar alanina, glicina u otra como ácidos amino. Reemplazos de combinación típicos para el polipéptido quimérico 192 y 193 incluyen: alanina, alanina; alanina, glicina; glicina, alanina; y glicina, glicina.

[0058] Representaciones de la presente invención también incluyen las secuencias de aminoácido para polipéptidos deficientes CAT de la invención, incluyendo secuencias de amino ácido que tienen ID DE SECUENCIA No. 7, 8 y 3 (correspondiente a his -□ gly a 193, his -□ala a 193, y his -□gly a ambos 192 y 193).

[0059] Como se muestra en la FIGURA 1, la enzima CAT sustancialmente no activa puede estar vinculada a somatostatina-14 a través de un espaciador de longitud variable. El espaciador es requerido para asegurar la presentación de la somatostatina codificada en una superficie global. Representaciones de espaciador aquí se proveen para resistencia a la proteasa óptima y para

54

exposición de epítipo óptima y la inclusión en polipéptidos quiméricos de la invención han mostrado un mejoramiento inesperado sobre construcciones que no tienen la (s) secuencia (s) de vinculador de la presente invención.

[0060] Las representaciones de espaciado, por lo tanto, han sido optimizadas en longitud y composición para asegurar la expresión de somatostatina defectuosa – CAT en varios microorganismos, y en particular en *E. Coli*. Construcciones originales como se describen en la Patente U.S. No. 6, 316, 004, incluido un espaciador que tiene codones *E. Coli* por comunes y la co - expresión requerida de tRNAs poco comunes de un segundo o plásmido ayudante.

[0061] En representaciones típicas, el espaciador tiene una secuencia de ácido nucleico de `tgaggaaactgcaccgttctgggtccacgcccgcgccctcgcccacgtccggaattcatg` (ID DE SECUENCIA No: 9). Un ejemplo de un espaciador de la invención tiene una secuencia de aminoácido de `welhrsgprprprpfe` (ID DE SECUENCIA No.: 10). Una secuencia de ácido de aminoácido típica para un espaciador de la invención es `welhrsgp(rp)nefm` donde $n \geq 1$ (ID DE SECUENCIA No: 11). Como se evidencia arriba, estas nuevas secuencias de espacios se proveen para resistencia a la proteasa (de tal modo permitiendo para producción incrementada como se compara con construcciones expuestas en la Patente U.S. No. 6, 316, 004) y exposición de somatostatina-14 óptima. La combinación de somatostatina-14 unida a la enzima CAT sustancialmente inactivada (construcciones de histidina sustituida) por un vinculador configurado óptimamente mostró mejoramiento inesperado y sorpresivo sobre otros materiales convencionales cuando se usa para inmunizar animales objetivos para productividad mejorada.

[0062] A pesar de no ser tan óptimas en función, otras secuencias de vinculador de longitud variable pueden ser usadas para unir la somatostatina-14 a la enzima

SS

CAT sustancialmente inactiva. Adicionalmente, se prevé que una fusión directa de la somatostatina-14 a la enzima CAT sustancialmente inactiva podría también usarse aquí, y se considera dentro del alcance de la presente invención.

[0063] Vectores y Células Huésped

[0064] La presente invención también se relaciona con vectores que comprenden las moléculas de polinucleótidos de la invención, también como a células huésped transformadas con tales vectores. Cualquiera de las moléculas de polinucleótidos de la invención puede ser unida a un vector, el cual generalmente incluye marcador seleccionable y origen de replicación, para el huésped de propagación de interés. Las células huésped son genéticamente creadas para incluir estos vectores y por lo tanto expresar los polímeros de la invención. Generalmente, los vectores aquí incluyen moléculas de polinucleótidos de la invención operativamente vinculados a apropiadas secuencias de regulación transcripcionales o traslacionales, tales como aquellas para células huésped microbiales o virales. Ejemplos de secuencias regulatorias incluyen promotores transcripcionales, operadores, o mejoradores, sitios de uniones ribosomales mRNA, y secuencias apropiadas con transcripción y traslación de control. Secuencias de nucleótidos están operativamente vinculadas cuando las secuencias regulatorias aquí están funcionalmente relacionadas con polinucleótidos de codificación del polipéptido quimérico de la invención.

[0065] Los vehículos típicos incluyen plásmidos, vectores de transporte de levadura, baculovirus, adenovirus inactivado, y similares. En una representación el vehículo es un plásmido CatSom pET30b modificado (ver FIGURA 1). Células huésped objetivo para uso aquí incluyen huésped bacterial, *por ejemplo*, *E. Coli.*,



levadura, células de insecto SF-9, células de mamíferos, células de plantas, y por el estilo.

[0066] En una representación, las secuencias regulatorias incluyen un promotor T7Lac, CAT, Trp, o T5 para expresión de los polipéptidos quiméricos de la invención en *E. coli* u otros como microbios. Estas secuencias de regulación son conocidas en el estado de la técnica y son usados bajo condiciones apropiadas y conocidas.

[0067] Donde generalmente células de plantas verdes modificadas son utilizadas para expresión, sistemas como los desarrollados por Planet Biotechnology y otros pueden ser utilizados.

[0068] Varios plásmidos de la invención han sido contruidos para expresión de polipéptidos quiméricos de la invención a través de la utilización de secuencias regulatorias objetivo.

Plásmidos ilustrativos pueden incluir un promotor T7Lac (ver FIGURA 1).

[0069] Células huésped para expresión de polipéptidos quiméricos incluyen procariotas, levadura y células eucariotas mayores. Huéspedes procariotas ilustrativos incluyen bacteria del género *Escherichia*, *Bacillus*, y *Salmonella* también como el género *Pseudomonas* y *Streptomyces*. En representaciones típicas la célula huésped es del género *Escherichia* y puede ser *Escherichia Coli* (*E. Coli*).

[0070] Como se muestra en los ejemplos adelante, las construcciones de la invención se proveen para una óptima expresión de somatostatina deficiente CAT bajo variedad de condiciones. Estas construcciones son particularmente eficientes

ST

para expresión en huéspedes procariotas y en la bacteria particular del género *Escherichia*. Note también que varios sistemas de expresión de plantas pueden ser usados en el contexto de la presente invención, típicamente usando *Agrobacterium tumefaciens*.

[0071] Purificación de la Proteína de Fusión de Endotoxina Libre

[0072] Aspectos de la presente invención incluyen el uso de endotoxina libre, codón optimizado, somatostatina deficiente – CAT para uso en la vacunación de animales, y en particular para vacunación de animales de granja, los cuales en algunos casos son vacas lecheras criadas en Estados Unidos. Materiales de endotoxina libre son particularmente importantes para ganado criado en Estados Unidos (ver por ejemplo, Drackley, JK 2004. Physiological Adaptations in transition dairy cows (Adaptaciones Fisiológicas en vacas lecheras en transición). Pp 74-87 in Proc. Minnesota Dairy Herd Health Conf., St Paul, MN. Universidad de Minnesota, St. Paul).

[0073] En una representación, las proteínas que comprenden somatostatina inmunológicas quiméricas de la invención son preparadas a través de la transformación de células objetivo con vehículos apropiados que contienen somatostatina. Como se noto anteriormente, vehículos para uso aquí incluyen plásmidos y sistemas de vectores conocidos apropiados para expresión en células objetivo seleccionadas.

[0074] En un aspecto de la invención, proteínas que comprenden somatostatina inmunológicas quiméricas están expresadas en células huésped objetivo. La expresión de proteína quimérica es ejecutada usando secuencias regulatorias objetivo. En algunos aspectos los polipéptidos quiméricos han sido optimizados

SA

(especialmente con relación a secuencias espaciador expuestas aquí) para expresión en *E. Coli*.

[0075] La proteína quimérica puede ser entonces purificada de acuerdo con técnicas de purificación de proteínas conocidas, que incluyen, por ejemplo, lisis lisozima, centrifugación diferencial de cuerpos de inclusión, cromatografía de tamiz y similares. Procedimientos de replegamiento pueden ser conducidos en cloruro de guanidina y urea a pH alcalino seguido por diálisis y liofilización.

[0076] En una representación, células *E. Coli* son transformadas usando el codón optimizado, plásmidos conteniendo somatostatina deficiente – CAT – pET30b CatSom; el pET30b CatSom que tiene apropiadas secuencias regulatorias de base *E. Coli* para expresión. En algunos casos, la fermentación de aproximadamente 10 litros de estas células proveen al menos 500 gramos y en algunos casos 600 gramos de biomasa total, produciendo cerca de 4 – 6 gramos de proteína total. Se estima por tinción con plateado y azul de Coomassie que hasta la mitad de la proteína puede ser proteína quimérica (ver Ejemplo 2 y FIGURA 2).

[0077] En algunas representaciones aquí, la proteína quimérica de la invención es purificada de células huésped transformadas en un estados sustancialmente de endotoxina libre. Realización de esta endotoxina, y en particular múltiples exposiciones a endotoxina, en algunos animales, y en particular vacas lecheras, resulta en animales sustancialmente comprometidos (conmoción de mastitis y endotoxina en vacas lecheras criadas en Estados Unidos) fue un resultado inesperado y sorpresivo que los presentes inventores obtuvieron. Esta realización resulto en un intento por remover o disminuir la cantidad en la dosis de endotoxina o numero de exposiciones en vacunas para vacas lecheras. Note que este efecto

59

basado en endotoxina es mucho menos realizado en vacas criadas en Rusia y otros países dado que el ganado lechero es descendiente de una raza diferente de vaca. Holstein Association, 1 Holstein Place, Brattleboro, Vermont 05302 – 0808. Este descubrimiento en vacas lecheras en Estados Unidos es generalmente contrario a lo esperado en cuanto a que una vacuna debe contener algunas cantidades bajas de endotoxina para ayudar a maximizar una respuesta inmune de los animales, como es el caso de vacas lecheras cuando se vacunan con somatostatina en algunos marcadores Europeos (ver Patente U.S. No. 6, 316, 004).

[0078] Como tal, algunas representaciones aquí están orientadas a la producción de proteínas quiméricas sustancialmente de endotoxina en vacunas, y especialmente para uso en vacunas usadas en la industria ganadera y usadas en la industria ganadera dentro de los Estados Unidos. En ciertas representaciones los niveles de endotoxina están en o por debajo de 1 EU/ml y en otras representaciones los niveles de endotoxina son sustancialmente eliminados, *por ejemplo*, los polipéptidos quiméricos de la invención son sustancialmente endotoxina libre.

[0079] En una representación, IB recuperado de células huésped lisadas es lavado múltiples veces usando una solución de lavado desprovista de endotoxina, *por ejemplo*, agua o solución de endotoxina libre. La píldora IP recuperada pueden de manera opcional ser lavada esta que los niveles de endotoxina este por debajo de aproximadamente 1 EU/ml (pruebas de endotoxina pueden ser realizadas usando uno o más ensayos conocidos, incluyendo kits de pruebas disponibles comercialmente de MP Biochemicals, Charles River, etc.). En algunas representaciones la solución de lavado es endotoxina libre e incluye uno o más inhibidor (res) de proteína proteolítico, *por ejemplo*, fenilmetanesulfonilfluoruro



(PMSF), 4-(2-aminoetilo)- bencenosulfonilo fluoruro (AEBSF), etc. En algunas representaciones la solución de lavado es fosfato regulado salino (PBS) que tiene una cantidad efectiva inhibitoria de PMSF, AEBSF o una combinación de ambos PMSF y AEBSF.

[0080] En algunos aspectos, píldoras de sustancialmente endotoxina libre pueden ser tratadas con una proteína de despliegue a pH 12.5 conteniendo urea y replegada en una solución de replegamiento de proteína que contiene una molaridad reducida de urea con arginina, glicerol y/o sacarosa. Una concentración de proteína quimérica purificada es modificada para estar entre 1 y 3 mg/ml y típicamente cerca de 1.4 a 1.8 mg/ml. En algunos casos, la proteína quimérica sustancialmente de endotoxina libre se provee para formulaciones de vacuna de dosis aprox. de 1.5 a 5 mg/2ml y mas típicamente dosis de 2.0 a 3.5 mg/2ml.

[0081] Otros procedimientos de remoción de endotoxina se prevén para estar dentro del alcance de la presente invención y pueden incluir, ejemplo, columnas de remoción de endotoxina de intercambio de ion disponibles comercialmente, columnas hidrofóbicas, etc (ver por ejemplo Mustang E o G Columns (Millipore)).

[0082] Adyuvante de Respuesta Inmune Mejorada

[0083] Representaciones de la invención proveen nuevos adyuvantes para inducción mejorada de inmunidad humoral. Estos adyuvantes proveen un mejoramiento representativo sobre materiales convencionales para la inducción de una respuesta humoral. Los adyuvantes aquí pueden ser usados con numerosas vacunas, pero son mostrados en los Ejemplos en uso con polipéptidos de la invención para vacunación en vacas lecheras, cerdos o terneros.

61

[0084] De forma importante, todos los componentes de adyuvantes aquí son de origen no animal, por lo tanto eliminan la contaminación potencial cruzada de animales vacunados de componentes adyuvantes potencialmente contaminados. Por ejemplo, representaciones aquí pueden utilizar Tween 80 libre de origen animal. Es particularmente importante cuando el animal objetivo es una vaca lechera, debido a preocupaciones sobre encefalopatía espongiforme bovina (BSE) u otros como enfermedades de la especie bovina. Note que estas preocupaciones son igualmente apropiadas para el tratamiento humano donde adyuvantes de origen no animal proveen beneficios de seguridad significativos. De manera adicional, representaciones de adyuvantes aquí están libres de benceno y otros como compuestos carcinogénicos. Estas representaciones proveen un beneficio de seguridad no disponible en la mayoría de los compuestos adyuvantes convencionales. Por ejemplo, representaciones aquí pueden utilizar Carbopol® 974P o ácido policíclico libre de benceno.

[0085] En una representación, el adyuvante inmunológico comprende una emulsión de aceite en agua en combinación con antígenos seleccionados mezclados dentro de una premezcla de emulsión.

[0086] Emulsiones de aceite en agua ilustrativas para uso aquí incluyen combinaciones de aceite mineral, Tween 80, Span 85 y polímeros objetivo (ácido poliacrílico de benceno libre). En algunos casos el polímero objetivo es seleccionado de un grupo que consiste de Carbómero Homopolímero Tipo B. Emulsiones típicas de aceite en agua comprenden desde aprox. 8 -10 % aceite mineral (v/v), 0.003 a 0.004 % Tween 80 (v/v), 0.007 a 0.008 Span 85 (v/v) y 0.04 a 0.06 % polímero (w/v).

[0087] Premezclas de emulsión ilustrativas de la invención están compuestas de un polímero de alto peso molecular, surfactante, y emulsificador en un aproximadamente 50 % de base de aceite acuoso. Polímeros de alto peso molecular para uso aquí incluyen ácidos acrílicos reticulados con éteres alílicos de pentaeritritol. En algunos casos los polímeros de alto peso molecular tienen viscosidad Brookfield RVT de entre 29,000 y 40,000, por ejemplo, Carbopol® 974P (Noveon, Inc).

[0088] Métodos para Obtener Respuesta Inmune Optimizada en Vacas Lecheras u Otros Animales de Granja Objetivo

[0089] De acuerdo con las composiciones y métodos de la presente invención, las composiciones inmunogénica descritas aquí (endotoxina libre, codón optimizado, construcciones de somatostatina deficiente - CAT) son combinadas con nuevos adyuvantes, como se describe arriba, para proveer vacunas de la invención. En una representación, endotoxina libre, codón optimizado, construcciones de somatostatina deficiente - CAT en una dosis total de 2.98 mg/2ml (del cual desde 5% hasta 25% es adyuvante (v/v), mas típicamente desde 10% hasta 20% es adyuvante y mas típicamente aprox.20% es adyuvante) es administrada. Note que otros adyuvantes convencionales se prevé están dentro del alcance de la invención y pueden ser usados con el codón optimizado, construcciones de somatostatina deficiente - CAT de la invención, sin embargo, resultados óptimos han sido mostrados cuando los nuevos adyuvantes aquí son usados en esta capacidad.

[0090] El propósito de las nuevas construcciones de somatostatina y adyuvantes es incrementar la productividad de una animal objetivo, típicamente un animal de granja, y más típicamente una vaca lechera, ternero, oveja, cerdo, o cabra.

[0091] La preparación es inyectada intramuscularmente o subcutáneamente, preferible menos de 12 veces, mas preferiblemente menos de 6 veces, y en algunos casos son poco como una sola vez. Cuando más de una eyección es requerida en el animal objetivo, es típico un intervalo de 14 a 28 días antes de la próxima inyección. Como se noto arriba, las representaciones aquí evitan el uso del tratamiento de la hormona recombinante para animales objetivo, un mayor beneficio en el campo de la ganadería (la hormona del crecimiento recombinante ha sido asociada con el inicio temprano de la pubertad en niñas y varias preocupaciones ambientales sobre que el estiércol de ganado tratado puede afectar de manera adversa ambos, la superficie y los ambientes de agua subterránea).

[0092] Composiciones estériles de la invención pueden ser administradas por ruta subcutánea o intramuscular. En casos típicos el sitio de administración es el cuello o cola del animal objetivo, aunque otros sitios pueden ser utilizados. Note que un sitio puede ser usado de manera que una reacción adversa no impida al animal moverse, comer, tomar, etc.

[0093] Como se noto arriba, las vacunas aquí, típicamente en un estado de endotoxina libre, usando los nuevos adyuvantes descritos aquí, proveen un mejoramiento significativo en la producción de carne y leche de vacas lecheras, ganado, cerdos, etc. Estos tratamientos, sin embargo, no están acompañados por un incremento en el consumo de alimento.

EJEMPLOS

[0094] Los siguientes ejemplos son provistos para propósitos ilustrativos solamente y no intentan limitar el alcance de la invención.

Ejemplo 1: Construcción de la Proteína de Fusión de Somatostatina defectuosa - CAT

[0095] El presente ejemplo ilustra la producción de una proteína de fusión de somatostatina defectuosa – CAT de acuerdo con representaciones de la presente invención. Mutagénesis dirigida en sitio fue realizada en plásmido pET30b-Cat-Som para reemplazar His 192 y His 193 con residuos de glicina (después de modificación: Gly 192 y Gly 193). Inactivación de los residuos de His 193 (y His 192) eliminan la capacidad de la enzima CAT para aceptar protones, así proporcionando inactivación completa del CAT.

[0096] El espaciador en el mismo pET30b-Cat-Som (que tiene sustitución (es) de His) fue codón optimizado para expresión por E. Coli en la ausencia de moléculas tRNA co-expresadas.

[0097] La construcción de ácido nucleico de somatostatina defectuosa – CAT se muestra como un ID DE SECUENCIA NO: 12. La secuencia de proteína de fusión de somatostatina defectuosa – CAT se expresa como ID DE SECUENCIA NO: 13, siendo comparada con una proteína de fusión de somatostatina – CAT no modificada (ID DE SECUENCIA NO: 14).

Ejemplo 2: Proteína de Fusión de Somatostatina Defectuosa – CAT Puede Ser Expresada en Niveles Altos

[0098] La construcción de somatostatina defectuosa – CAT de codón optimizado como se describe en el ejemplo 1 se uso para expresar la proteína de fusión en células BL21 (DE3). Células transformadas crecieron en LB e inducidas con 0.4 mM IPTG por aproximadamente tres horas. Un milímetro de células de una densidad de cultivo OD 0.7 fueron granulados, y calentados a 70 °C por 10 minutos en 100 µl SDS de un regulador simple. Una muestra de 40 µl de extracto de célula fue cargado por línea para SDS PAGE.

[0099] Como se muestra en la FIGURA 2, una banda de 28 KD que corresponde a el tamaño predecible de un codón optimizado, una proteína de fusión de somatostatina defectuosa – CAT fue visible en líneas 1 (LB+IPTG, reducido) y 3 (LB+IPTG) después de inducción con IPTG. No se vio expresión en líneas de control 2 (LB, reducida) y 4 (LB). Como se esperaba, no se presento diferencia en el tamaño de la proteína de fusión cuando se corrió bajo condiciones estándar y de reducción.

Ejemplo 3: Endotoxina Libre, Somatostatina Deficiente – CAT de Codón Optimizado que contiene vacuna

[00100] Una vacuna ilustrativa de acuerdo con la presente invención:

a. JH 14 (Adyuvante)

Aceite mineral – 50% (v/v)

Tween 80 - 0.1694% (v/v)

Span 85 – 0.1915% (v/v)

Carbopol 974NP – 1.125% (w/v)

b. Proteína Replegada de la Invención 95.6 ml

(2.96 mg/ml) – ver Ejemplo 2

c. Fosfato regulado Salino 35.6 ml

d. Antibacterial / antifúngico

[00101] Ejemplo 4: Péptidos/Adyuvantes Quiméricos de Endotoxina Libre

Proveen Producción de Leche Incrementada

[00102] Un grupo de vacas lechera aleatorio (Cruces Holstein – Criados en USA) fue identificado, cada uno fue de 31 a 65 días pos parto (Tercero hasta el quinto de lactancia). Cada vaca fue examinada y determinada como en optima condición de salud por un veterinario.

[00103] El peso promedio de vaca en el estudio fue desde aprox. 1,000 a 1,200 lbs. Seis vacas en lactancia fueron tratadas con una dosis de 1.96 mg/ proteína quimérica /2ml en JH14. Alternativamente, nueve vacas en lactancia fueron tratadas con un rBST convencional. Estudio de tratamientos y producción de leche fue llevado a cabo a una gran escala, producción de lácteos intensa.

[00104] vacunaciones se llevaron a cabo en el día 0. Niveles de anticuerpos en suero Anti – SST y suero IGF-1 se midieron en la semana 4, producción de leche e identificación de condiciones de salud general de los animales se realizaron en un esquema regular.

67

[00105] Seis vacas que fueron vacunadas usando las composiciones inventivas descritas aquí presentaron una apariencia normal, sin reacción a la endotoxina o retirada de alimento. Otras seis vacas presentaron una respuesta serológica positiva a SST con un titer promedio de 1:14. La producción de leche de las seis vacas se obtuvo con solo una vacuna (ver FIGURA 3A), mostrando un incremento de producción promedio de 23.7%.

[00106] Nueve vacas tratadas usando inyecciones de rBST convencional a 0 y 14 días con un incremento promedio general en producción de leche de 2% (ver FIGURA 3B).

[00107] La información en este Ejemplo muestra el drástico mejoramiento en la efectividad para el uso de construcciones de endotoxina libre en combinación adyuvantes inventivos en vacas lecheras. Estos resultados son dramáticamente mejorados hacia la salud del animal y la productividad cuando se compara con vacas inyectadas dos veces con rBST.

[00108] Ejemplo 5: Péptidos/adyuvantes Quiméricos de Endotoxina libre Proporcionan Producción de Carne Incrementada en Lechones de Cerdas Tratadas

[00109] Un grupo de cerdas aleatorio será identificado, cada uno estando al menos de 35 – 36 días anterior al parto. Cada cerda será examinada y determinada como en perfecto estado de salud por un veterinario. Cerdas preñadas serán inmunizadas dos veces usando vacunas de la invención (ver FIGURA 3), una vez a los 25-36 días antes del parto, y una vez 8 días antes del parto. Un grupo de control de cerdas preñadas será mantenido para propósitos de comparación (no vacunas o vacunación con salina estéril).

[00110] Los lechones recién parido del grupo vacunado tendrán mayor posibilidad de vivir y un tamaño promedio mayor. Es el incremento en el tamaño del lechón el que mejora el porcentaje de supervivencia, dado que lechones mas grandes son menos probables de ser empujados lejos de la tetilla de la cerda. Lechones tratados y de control serán pesados a los 21, 30 y 75 días. Vacunas de la presente invención incrementaran el peso diario del lechón en un promedio de 35% sobre el curso del periodo del día 75.

[00111] De manera importante, la sobrevivencia y peso del lechón son incrementados a través del uso de las vacunas de la presente invención y la ausencia de la hormona del crecimiento recombinante. Este es un avance significativo sobre la terapia de hormona recombinante.

[00112] Ejemplo 6: Péptidos/Adyuvantes Quiméricos de Endotoxina Libre Proveen Producción de Carne Incrementada en Terneros Tratados

[00113] Un grupo de terneros aleatorio, de uno a tres meses de edad, será identificado, e inyectado con composiciones de la invención. El incremento de peso sobre un periodo de aproximadamente diez meses será monitoreado y comparado con un grupo de control, el grupo de control está siendo tratado igual en cada sentido como el grupo inyectado excepto por las inyecciones de vacuna de la invención. Cada ternero será examinado y determinado como con perfecto estado de salud por un veterinario sobre el curso de los tratamientos.

[00114] Las inyecciones aquí para el grupo vacunado son realizadas a la semana 0, semana 4 y semana 8 (tres vacunas en total). Las vacunas se proporcionaran de manera subcutánea o intramuscular en el cuello usando agujas

69

de calibre 18-21 cc. Inyecciones de refuerzo también fueron proporcionadas (4 impulsadores, tres impulsadores o no impulsadores). Las inyección de vacuna incluyeron 2 mg/2ml del polipéptido quimérico. El polipéptidos quimérico fue preparado como se describió aquí conteniendo residuos de histidina en CAT sustituido con ácidos amino glicina de la invención y un vinculador optimizado como se describió en el ID DE SECUENCIA NO: 3.

[00115] Terneros vacunados y terneros de control son cada uno pesados para tomar el peso inicial. Se espera que los animales vacunados aquí mostraran un de 15 a 40% de incremento en peso sobre los animales de control. Este incremento en el peso promedio para terneros tratados muestra un promedio representativo sobre los no tratados.

[00116] De manera importante, carnes resultantes de terneros tratados no contienen la hormona del crecimiento recombinante.

[00117] Mientras que la invención ha sido particularmente mostrada y descrita con referencia al número de representaciones, sería entendible para aquellos con habilidades en la técnica que cambios en la forma y detalles podría ser hechos a varias representaciones expuestas aquí sin partir del espíritu y alcance de la invención y que las representaciones varias expuestas aquí no pretenden actuar como limitaciones en el alcance de las solicitudes.



REIVINDICACIONES

Lo que se reivindica es:

1. Un polipéptidos quimérico que posea la inmunogenicidad de somatostatina, que comprende: una secuencia de aminoácido de somatostatina-14 vinculada a un polipéptido cloranfenicol acetiltransferasa sustancialmente inactivo y truncado donde la somatostatina-14 esté vinculada al cloranfenicol acetiltransferasa inactivo por un espaciador, el espaciador optimizado para una expresión optima del polipéptidos quimérico en una célula huésped objetivo y donde el cloranfenicol inactivo tiene al menos residuo de histidina 193 sustituida con una alanina, glicina u otro como ácido amino.
2. El polipéptido quimérico de la reivindicación 1 donde el espaciador tiene una secuencia de aminoácido de ID DE SECUENCIA NO: 10 o ID DE SECUENCIA NO: 11.
3. El polipéptido quimérico de la reivindicación 1 donde el polipéptido cloranfenicol acetiltransferasa sustancialmente inactivo y truncado tiene una secuencia de aminoácido de ID DE SECUENCIA NO: 3, ID DE SECUENCIA NO: 7 o ID DE SECUENCIA NO: 8.
4. El polipéptido quimérico de la reivindicación 1 que tiene una secuencia de aminoácido con al menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácido de ID DE SECUENCIA NO: 12.

31

5. El polipéptido quimérico de la reivindicación 1 que tienen una secuencia de aminoácido de ID DE SECUENCIA NO: 12.
6. Una composición inmunogénica que comprende el polipéptido quimérico de la reivindicación 1 junto con adyuvante apropiado farmacéuticamente en una cantidad efectiva para obtener una respuesta inmune.
7. Un adyuvante inmunológico que comprende una emulsión de aceite en agua mezclada con una premezcla de emulsión donde la emulsión de aceite en agua comprende aceite mineral, Tween 80, Span 85 y uno o más polímeros.
8. El adyuvante de la reivindicación 7 donde la premezcla de emulsión comprende un polímero de alto peso molecular, un surfactante, y un emulsificador en una base de aceite acuoso.
9. El adyuvante de la reivindicación 7 que además comprende antígenos preseleccionados donde los antígenos son polipéptidos nativos, recombinantes o sintéticos, polisacáridos y glicoproteínas.
10. Una composición inmunogénica que comprende el polipéptido quimérico de la reivindicación 1 junto con el adyuvante de la reivindicación 8.
11. Un método para el incremento de la producción de leche en vacas lecheras que comprende:

Vacuna de una vaca lechera con una o más dosis de la composición de la reivindicación 6; y espera de al menos diez días durante los cuales la producción de leche de una vaca lechera incrementara comparado con la producción de leche de una vaca lechera en ausencia de la vacuna.

x21

12. El método de la reivindicación 11 donde la vaca lechera es vacunada con una sola dosis de la composición de la reivindicación 6.

13. Un método para el incremento de la producción de leche en vacas lecheras que comprende:

Vacuna de una vaca lechera con una o más dosis de la composición de la reivindicación 10; y espera de al menos diez días durante los cuales la producción de leche de una vaca lechera incrementara comparado con la producción de leche de una vaca lechera en ausencia de la vacuna.

14. Un método para el incremento de la producción de carne sin grasa en ganado de granja que comprende; vacunación del ganado de granja.

83

1/4

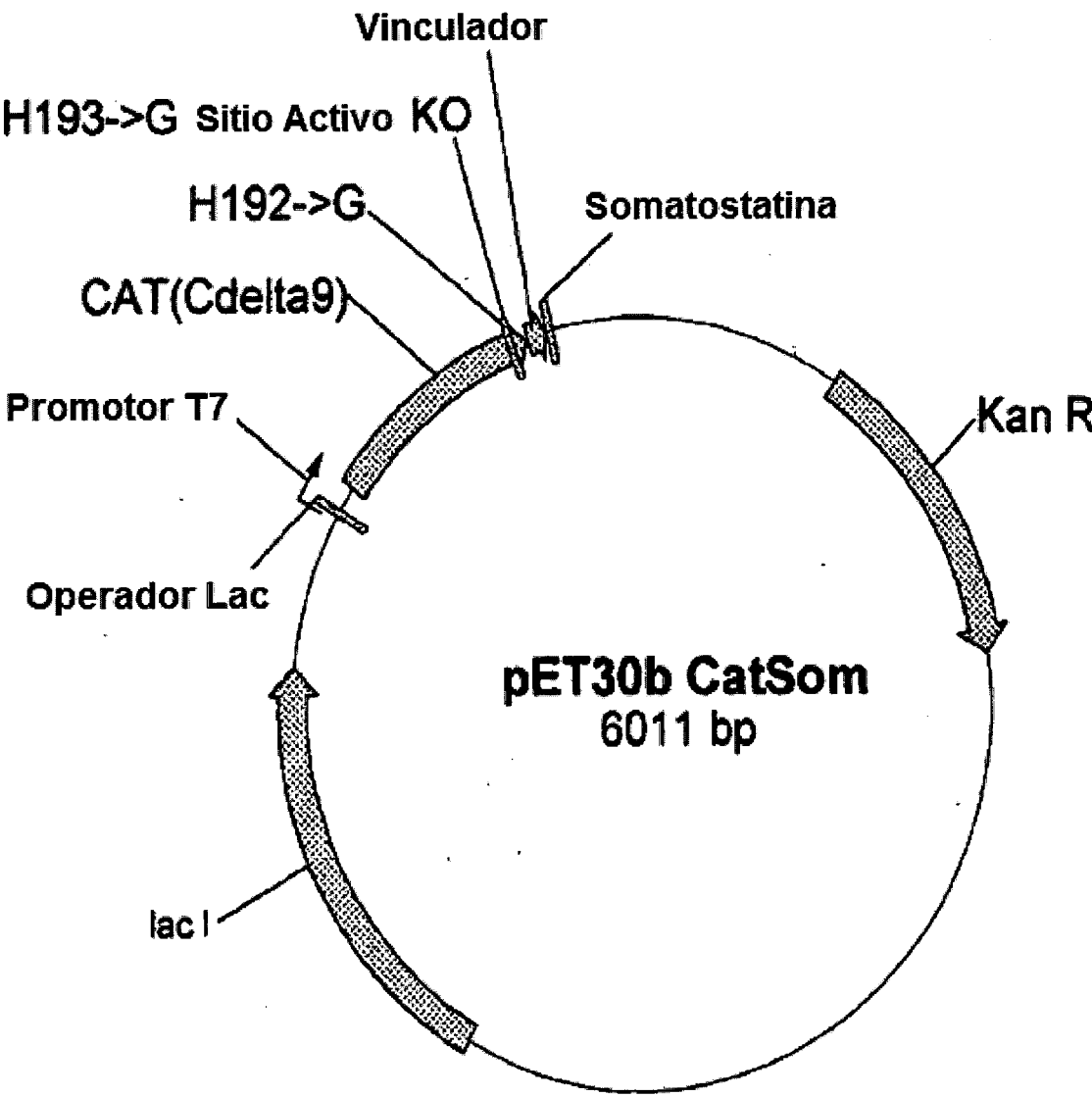


FIGURA 1

24

2/4

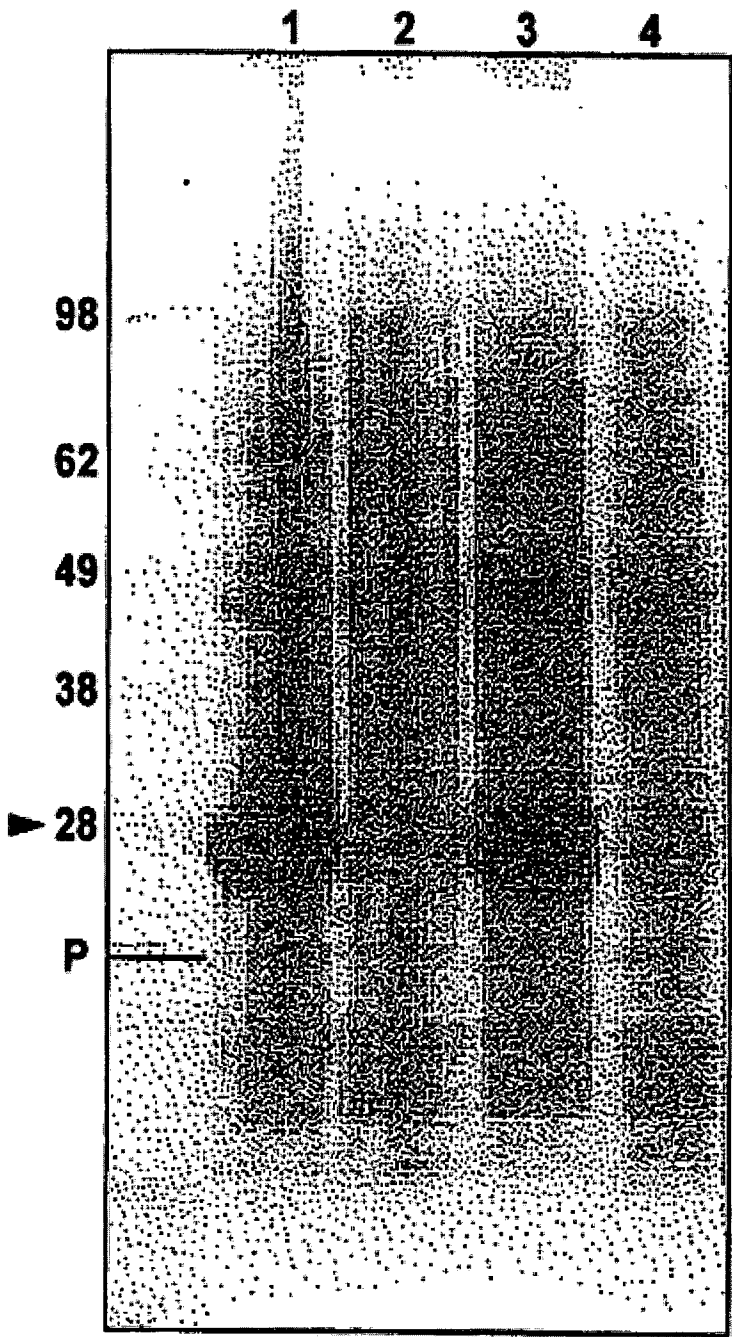


FIGURA 2

75

3/4

Vaca No.	MY D10	MY D15	Produccion Incrementada	% Incremento
3381	30	34	+4 Lbs	13%
4222	32	40	+ 8 Lbs	25%
5861	40	55	+15 Lbs	38%
6141	20	29	+9 Lbs	45%
6142	30	35	+5 Lbs	17%
6540	24	25	+ 1 Lbs	4%
Promedio	29.33	36.33	+7.0 Lbs	23.7%

TRATADO CON
POLIPEPTIDO QUIMERICO

FIGURA 3A

76

4/4

Vaca No.	Pre-Tratamiento (lbs)	Pos - Tratamiento Periodo (Promedio Lbs)	% Cambio
983	56.3	55.7	-1%
3361	27.7	33.2	20%
4222	34.5	36.8	7%
5961	42.3	44.8	6%
6141	29.8	25.3	-15%
6142	34.5	27	-22%
6490	30.5	33.3	9%
6540	11	23.8	8%
6556	13.8	14.5	5%
Mean	32.4	32.7	2%

BST

FIGURA 3B

SEQUENCE LISTING

<110> Braasch Biotech LLC
Mendelsohn, Andrew R.
Haffer, Keith N.
Larrick, James

<120> Chloramphenicol Acetyl Transferase (CAT)-Defective
Somatostatin Fusion Protein and Uses Thereof

<130> 0311.01PCT

<140> PCT/US2008/068195

<141> 2008-06-25

<160> 15

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic

<400> 1

Ala Gly Cys Lys Asn Phe Phe Trp Lys Thr Phe Thr Ser Cys
1 5 10

<210> 2

<211> 630

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic

<400> 2

atggagaaaa aaatcactgg atataccacc gttgatatat cccaatggca tcgtaaagaa
60

cattttgagg catttcagtc agttgctcaa tgtacctata accagaccgt tcagctggat
120

attacggcct ttttaaagac cgtaaagaaa aataagcaca agttttatcc ggcctttatt
180

cacattcttg cccgcctgat gaatgctcat ccggaattcc gtatggcaat gaaagacggt
240

gagctggtga tatgggatag tgttcaccct tgttacaccg ttttccatga gcaaactgaa
300

acgttttcat cgctctggag tgaataccac gacgatttcc ggcagtttct acacatatat
360

tcgcaagatg tggcgtgtta cggtgaaaac ctggcctatt tccctaaagg gtttattgag
420

aatatgtttt tcgtctcagc caatccctgg gtgagtttca ccagttttga tttaaacgtg
480

gccaatatgg acaacttctt cgcccccggt ttcaccatgg gcaaataatta tacgcaaggc
540

gacaagggtgc tgatgccgct ggcgattcag gttggtggtg ccgtttgtga tggcttccat
600

gtcggccgta tgcttaatga actgcagcag
630

- <210> 3
- <211> 210
- <212> PRT
- <213> Artificial

- <220>
- <223> Synthetic

<400> 3

Met Glu Lys Lys Ile Thr Gly Tyr Thr Thr Val Asp Ile Ser Gln Trp
1 5 10 15

His Arg Lys Glu His Phe Glu Ala Phe Gln Ser Val Ala Gln Cys Thr
20 25 30

Tyr Asn Gln Thr Val Gln Leu Asp Ile Thr Ala Phe Leu Lys Thr Val
35 40 45

Lys Lys Asn Lys His Lys Phe Tyr Pro Ala Phe Ile His Ile Leu Ala
50 55 60

Arg Leu Met Asn Ala His Pro Glu Phe Arg Met Ala Met Lys Asp Gly
65 70 75 80

Glu Leu Val Ile Trp Asp Ser Val His Pro Cys Tyr Thr Val Phe His
85 90 95

Glu Gln Thr Glu Thr Phe Ser Ser Leu Trp Ser Glu Tyr His Asp Asp
100 105 110

Phe Arg Gln Phe Leu His Ile Tyr Ser Gln Asp Val Ala Cys Tyr Gly

72

115

120

125

Glu Asn Leu Ala Tyr Phe Pro Lys Gly Phe Ile Glu Asn Met Phe Phe
130 135 140

Val Ser Ala Asn Pro Trp Val Ser Phe Thr Ser Phe Asp Leu Asn Val
145 150 155 160

Ala Asn Met Asp Asn Phe Phe Ala Pro Val Phe Thr Met Gly Lys Tyr
165 170 175

Tyr Thr Gln Gly Asp Lys Val Leu Met Pro Leu Ala Ile Gln Val Gly
180 185 190

Gly Ala Val Cys Asp Gly Phe His Val Gly Arg Met Leu Asn Glu Leu
195 200 205

Gln Gln
210

<210> 4
<211> 630
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic

<400> 4
atggagaaaa aaatcactgg atataccacc gttgatatat cccaatggca tcgtaaagaa
60

cattttgagg catttcagtc agttgctcaa tgtacctata accagaccgt tcagctggat
120

attacggcct ttttaaagac cgtaaagaaa aataagcaca agttttatcc ggcctttatt
180

cacattcttg cccgcctgat gaatgctcat ccggaattcc gtatggcaat gaaagacggg
240

gagctggtga tatgggatag tgttcaccct tgttacaccg ttttccatga gcaaactgaa
300

acgttttcat cgctctggag tgaataccac gacgatttcc ggcagtttct acacatatat
360

tcgcaagatg tggcgtgtta cggtgaaaac ctggcctatt tccctaaagg gtttattgag
420

aatatgtttt tcgtctcagc caatccctgg gtgagtttca ccagttttga tttaaactgtg
480

gccaatatgg acaacttctt cgcccccggt ttcaccatgg gcaaatatta tacgcaaggc
540

gacaaggtgc tgatgccgct ggcgattcag gttcatgggt ccgtttgtga tggcttccat
600

gtcggccgta tgcttaatga actgcagcag
630

<210> 5
<211> 630
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic

<400> 5
atggagaaaa aaatcactgg atataccacc gttgatatat cccaatggca tcgtaaagaa
60

cattttgagg catttcagtc agttgctcaa tgtacctata accagaccgt tcagctggat
120

attacggcct tttaaagac cgtaaagaaa aataagcaca agttttatcc ggcctttatt
180

cacattcttg cccgcctgat gaatgctcat ccggaattcc gtatggcaat gaaagacggg
240

gagctgggtga tatgggatag tgttcaccct tgttacaccg ttttccatga gcaaactgaa
300

acgttttcat cgctctggag tgaataccac gacgatttcc ggcagtttct acacatatat
360

tcgcaagatg tggcgtgtta cggtgaaaac ctggcctatt tccctaaagg gtttattgag
420

aatatgtttt tcgtctcagc caatccctgg gtgagtttca ccagttttga tttaaactgtg
480

gccaatatgg acaacttctt cgcccccggt ttcaccatgg gcaaatatta tacgcaaggc
540

gacaaggtgc tgatgccgct ggcgattcag gttcatgctg ccgtttgtga tggcttccat
600

gtcggccgta tgcttaatga actgcagcag
630

<210> 6
<211> 630

<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic

<400> 6
atggagaaaa aaatcactgg atataccacc gttgatatat cccaatggca tcgtaaagaa
60
cattttgagg catttcagtc agttgctcaa tgtacctata accagaccgt tcagctggat
120
attacggcct ttttaaagac cgtaaagaaa aataagcaca agttttatcc ggcctttatt
180
cacattcttg cccgcctgat gaatgctcat ccggaattcc gtatggcaat gaaagacggg
240
gagctgggtga tatgggatag tgttcaccct tgttacaccg ttttccatga gcaaactgaa
300
acgttttcat cgctctggag tgaataccac gacgatttcc ggcagtttct acacatatat
360
tcgcaagatg tggcgtgtta cggtgaaaac ctggcctatt tccctaaagg gtttattgag
420
aatatgtttt tcgtctcagc caatccctgg gtgagtttca ccagttttga tttaaactg
480
gccaatatgg acaacttctt cgcccccggt ttcaccatgg gcaaatatta tacgcaaggc
540
gacaaggtgc tgatgccgct ggcgattcag gttcatgggt ccgtttgtga tggcttccat
600
gtcggcagaa tgcttaatga actgcagcag
630

<210> 7
<211> 210
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic

<400> 7

Met	Glu	Lys	Lys	Ile	Thr	Gly	Tyr	Thr	Thr	Val	Asp	Ile	Ser	Gln	Trp
1				5					10					15	

His	Arg	Lys	Glu	His	Phe	Glu	Ala	Phe	Gln	Ser	Val	Ala	Gln	Cys	Thr
			20					25					30		

Tyr Asn Gln Thr Val Gln Leu Asp Ile Thr Ala Phe Leu Lys Thr Val
35 40 45

Lys Lys Asn Lys His Lys Phe Tyr Pro Ala Phe Ile His Ile Leu Ala
50 55 60

Arg Leu Met Asn Ala His Pro Glu Phe Arg Met Ala Met Lys Asp Gly
65 70 75 80

Glu Leu Val Ile Trp Asp Ser Val His Pro Cys Tyr Thr Val Phe His
85 90 95

Glu Gln Thr Glu Thr Phe Ser Ser Leu Trp Ser Glu Tyr His Asp Asp
100 105 110

Phe Arg Gln Phe Leu His Ile Tyr Ser Gln Asp Val Ala Cys Tyr Gly
115 120 125

Glu Asn Leu Ala Tyr Phe Pro Lys Gly Phe Ile Glu Asn Met Phe Phe
130 135 140

Val Ser Ala Asn Pro Trp Val Ser Phe Thr Ser Phe Asp Leu Asn Val
145 150 155 160

Ala Asn Met Asp Asn Phe Phe Ala Pro Val Phe Thr Met Gly Lys Tyr
165 170 175

Tyr Thr Gln Gly Asp Lys Val Leu Met Pro Leu Ala Ile Gln Val His
180 185 190

Gly Ala Val Cys Asp Gly Phe His Val Gly Arg Met Leu Asn Glu Leu
195 200 205

Gln Gln
210

<210> 8
<211> 210
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic

<400> 8

Met Glu Lys Lys Ile Thr Gly Tyr Thr Thr Val Asp Ile Ser Gln Trp
1 5 10 15

His Arg Lys Glu His Phe Glu Ala Phe Gln Ser Val Ala Gln Cys Thr
20 25 30

Tyr Asn Gln Thr Val Gln Leu Asp Ile Thr Ala Phe Leu Lys Thr Val
35 40 45

Lys Lys Asn Lys His Lys Phe Tyr Pro Ala Phe Ile His Ile Leu Ala
50 55 60

Arg Leu Met Asn Ala His Pro Glu Phe Arg Met Ala Met Lys Asp Gly
65 70 75 80

Glu Leu Val Ile Trp Asp Ser Val His Pro Cys Tyr Thr Val Phe His
85 90 95

Glu Gln Thr Glu Thr Phe Ser Ser Leu Trp Ser Glu Tyr His Asp Asp
100 105 110

Phe Arg Gln Phe Leu His Ile Tyr Ser Gln Asp Val Ala Cys Tyr Gly
115 120 125

Glu Asn Leu Ala Tyr Phe Pro Lys Gly Phe Ile Glu Asn Met Phe Phe
130 135 140

Val Ser Ala Asn Pro Trp Val Ser Phe Thr Ser Phe Asp Leu Asn Val
145 150 155 160

Ala Asn Met Asp Asn Phe Phe Ala Pro Val Phe Thr Met Gly Lys Tyr
165 170 175

Tyr Thr Gln Gly Asp Lys Val Leu Met Pro Leu Ala Ile Gln Val His
180 185 190

Ala Ala Val Cys Asp Gly Phe His Val Gly Arg Met Leu Asn Glu Leu
195 200 205

Gln Gln
210

<211> 57
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic

<400> 9
tgggaactgc accgttctgg tccacgcccg cgcctcgcc cacgtccgga attcatg
57

<210> 10
<211> 19
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic

<400> 10

Trp	Glu	Leu	His	Arg	Ser	Gly	Pro	Arg	Pro	Arg	Pro	Arg	Pro
1				5				10				15	

Glu Phe Met

<210> 11
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (9)..(10)
<223> The pair of residues repeats at least once

<400> 11

Trp	Glu	Leu	His	Arg	Ser	Gly	Pro	Arg	Pro	Glu	Phe	Met
1				5				10				

<210> 12
<211> 729
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic

85

<400> 12

atggagaaaa aaatcactgg atataccacc gttgatatat cccaatggca tcgtaaagaa
60

cattttgagg catttcagtc agttgctcaa tgtacctata accagaccgt tcagctggat
120

attacggcct ttttaaagac cgtaaagaaa aataagcaca agttttatcc ggcctttatt
180

cacattcttg cccgcctgat gaatgctcat ccggaattcc gtatggcaat gaaagacggt
240

gagctggatga tatgggatag tgttcaccct tgttacaccg ttttccatga gcaaactgaa
300

acgttttcat cgctctggag tgaataccac gacgatttcc ggcagtttct acacatatat
360

tcgcaagatg tggcgtgtta cggtgaaaac ctggcctatt tccctaaagg gtttattgag
420

aatatgtttt tcgtctcagc caatccctgg gtgagtttca ccagttttga tttaaacgtg
480

gccaatatgg acaacttctt cgcccccggt ttcaccatgg gcaaataatta tacgcaaggc
540

gacaaggtgc tgatgccgct ggcgattcag gttggtggtg ccgtttgtga tggcttccat
600

gtcggccgta tgcttaatga actgcagcag tgggaactgc accgttctgg tccacgcccg
660

cgccctcgcc cacgtccgga attcatggcc ggctgcaaga acttcttttg gaaaaccttt
720

acgagctgc
729

<210> 13

<211> 243

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic

<400> 13

Met Glu Lys Lys Ile Thr Gly Tyr Thr Thr Val Asp Ile Ser Gln Trp
1 5 10 15

His Arg Lys Glu His Phe Glu Ala Phe Gln Ser Val Ala Gln Cys Thr
20 25 30

Tyr Asn Gln Thr Val Gln Leu Asp Ile Thr Ala Phe Leu Lys Thr Val
 35 40 45

Lys Lys Asn Lys His Lys Phe Tyr Pro Ala Phe Ile His Ile Leu Ala
 50 55 60

Arg Leu Met Asn Ala His Pro Glu Phe Arg Met Ala Met Lys Asp Gly
 65 70 75 80

Glu Leu Val Ile Trp Asp Ser Val His Pro Cys Tyr Thr Val Phe His
 85 90 95

Glu Gln Thr Glu Thr Phe Ser Ser Leu Trp Ser Glu Tyr His Asp Asp
 100 105 110

Phe Arg Gln Phe Leu His Ile Tyr Ser Gln Asp Val Ala Cys Tyr Gly
 115 120 125

Glu Asn Leu Ala Tyr Phe Pro Lys Gly Phe Ile Glu Asn Met Phe Phe
 130 135 140

Val Ser Ala Asn Pro Trp Val Ser Phe Thr Ser Phe Asp Leu Asn Val
 145 150 155 160

Ala Asn Met Asp Asn Phe Phe Ala Pro Val Phe Thr Met Gly Lys Tyr
 165 170 175

Tyr Thr Gln Gly Asp Lys Val Leu Met Pro Leu Ala Ile Gln Val Gly
 180 185 190

Gly Ala Val Cys Asp Gly Phe His Val Gly Arg Met Leu Asn Glu Leu
 195 200 205

Gln Gln Trp Glu Leu His Arg Ser Gly Pro Arg Pro Arg Pro Arg Pro
 210 215 220

Arg Pro Glu Phe Met Ala Gly Cys Lys Asn Phe Phe Trp Lys Thr Phe
 225 230 235 240

Thr Ser Cys

86
87

<211> 243
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic

<400> 14

Met Glu Lys Lys Ile Thr Gly Tyr Thr Thr Val Asp Ile Ser Gln Trp
1 5 10 15

His Arg Lys Glu His Phe Glu Ala Phe Gln Ser Val Ala Gln Cys Thr
20 25 30

Tyr Asn Gln Thr Val Gln Leu Asp Ile Thr Ala Phe Leu Lys Thr Val
35 40 45

Lys Lys Asn Lys His Lys Phe Tyr Pro Ala Phe Ile His Ile Leu Ala
50 55 60

Arg Leu Met Asn Ala His Pro Glu Phe Arg Met Ala Met Lys Asp Gly
65 70 75 80

Glu Leu Val Ile Trp Asp Ser Val His Pro Cys Tyr Thr Val Phe His
85 90 95

Glu Gln Thr Glu Thr Phe Ser Ser Leu Trp Ser Glu Tyr His Asp Asp
100 105 110

Phe Arg Gln Phe Leu His Ile Tyr Ser Gln Asp Val Ala Cys Tyr Gly
115 120 125

Glu Asn Leu Ala Tyr Phe Pro Lys Gly Phe Ile Glu Asn Met Phe Phe
130 135 140

Val Ser Ala Asn Pro Trp Val Ser Phe Thr Ser Phe Asp Leu Asn Val
145 150 155 160

Ala Asn Met Asp Asn Phe Phe Ala Pro Val Phe Thr Met Gly Lys Tyr
165 170 175

Tyr Thr Gln Gly Asp Lys Val Leu Met Pro Leu Ala Ile Gln Val His
180 185 190

His Ala Val Cys Asp Gly Phe His Val Gly Arg Met Leu Asn Glu Leu

08

195

200

205

Gln Gln Trp Glu Leu His Arg Ser Gly Pro Arg Pro Arg Pro Arg Pro
210 215 220

Arg Pro Glu Phe Met Ala Gly Cys Lys Asn Phe Phe Trp Lys Thr Phe
225 230 235 240

Thr Ser Cys

<210> 15
<211> 42
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic

<400> 15
gctggctgca agaatttctt ctggaagact ttcacatcct gt
42

8/89

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2008/068195

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
<i>A61K 38/31(2006.01)i, C07K 14/655(2006.01)i, C12P 21/02(2006.01)i, A61K 39/385(2006.01)i</i>		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC: A61K, C07K, C12P		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKIPASS(KIPO internal), Delphion, Pubmed (somatostatin, inactive CAT, immunological adjuvant, oil-in-water emulsion, vaccination)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y/A	US 6316004 B1 (TIKHONENKO T) 13 November 2001 See abstract and claim 1	1-6/7-10
Y/A	Lewendon A, Shaw WV. The pKa of the catalytic histidine residue of chloramphenicol acetyltransferase. Biochem J. 1993 Feb 15; 290 (Pt 1):15-19. See abstract and scheme I	1-6/7-10
X/A	Muderhwa JM, et al., Oil-in-water liposomal emulsions: characterization and potential use in vaccine delivery. J Pharm Sci. 1999 Dec; 88(12): 1332-1339. See Materials and Methods	7-9/1-6, 10
A	Liang A, et al., Construction and evaluation of the eukaryotic expression plasmid encoding two copies of somatostatin genes fused with hepatitis B surface antigen gene S. Vaccine. 2008 Jun 2; 26(23): 2935-2941. Epub 2008 Apr 8. See Materials and Methods	1-10
A	Danoff A, et al., Intracellular degradation of prohormone-chloramphenicol-acetyl-transferase chimeras in a pre-lysosomal compartment. Eur J Biochem. 1993 Dec 15; 218(3): 1063-1070. See figure 1	1-10
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 18 MARCH 2009 (18.03.2009)		Date of mailing of the international search report 18 MARCH 2009 (18.03.2009)
Name and mailing address of the ISA/KR  Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon, 139 Seonsa-ro, Seo-gu, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140		Authorized officer CHO, Kyung Joo  Telephone No. 82-42-481-8287

87
90

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2008/068195

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2005-066344 A2 (INSTYTUT BIOTECHNOLOGII I ANTYBIOTYKOW et al.) 21 July 2005 See sequence 3	1-10
A	KR 10-1990-0700505A (CALIFORNIA BIOTECHNOLOGY Inc.) 13 August 1990 See sequence 15	1-10

~~8/9~~
a1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2008/068195

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of:

a. type of material

- ☒ a sequence listing
☒ table(s) related to the sequence listing

b. format of material

- ☒ on paper
☒ in electronic form

c. time of filing/furnishing

- ☒ contained in the international application as filed
☐ filed together with the international application in electronic form
☒ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

92

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2008/068195

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 11-14
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 11 to 14 pertain to methods for treatment of the human or animal body by surgery or therapy, as well as diagnostic methods, and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.
2. ☒ Claims Nos.: 14
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
The scope of claim 14 is unclear, since the sentence is not completely written in said claim.
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

Invention I (claim 1 to 6, 10 to 13) is related to a chimeric polypeptide having the immunogenicity of somatostatin.

Invention II (claims 7 to 10, 13) is related to an immunological adjuvant comprising an oil-in-water emulsion.

Invention III (claim 14) is related to a method for increasing lean meat production in farm live-stock by vaccinating the farm live-stock.

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

93

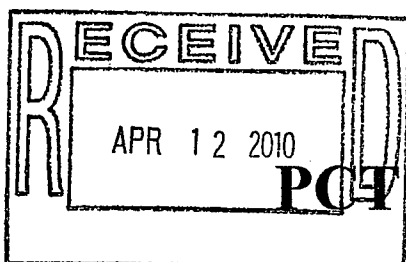
INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/US2008/068195

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 6316004 B1	13.11.2001	EP 0645454 A2 RU 2031121 C1	29.03.1995 20.03.1995
WO 2005-066344 A2	21.07.2005	EP 1704233 A2 US 2008-0160570 A1 WO 2005-066208 A3 WO 2005-066344 A3	27.09.2006 03.07.2008 17.11.2005 20.04.2006
KR 10-1990-0700505A	13.08.1990	AU 2797989 A AU 625394 B2 CA 1340461 C DE 3856129 D1 DK 110190 A EP 0383837 B1 EP 0383837 A1 JP 03-502095A KR 9610558 B1 US 5104853A WO 89-04326 A1	01.06.1989 09.07.1992 23.03.1999 12.03.1998 04.07.1990 04.02.1998 29.08.1990 16.05.1991 02.08.1996 14.04.1992 18.05.1989

PATENT COOPERATION TREATY

PCT/US2008/068195

NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

SWANSON, Barry J.
Swanson & Bratschun, L.L.C.
8210 SouthPark Terrace
Littleton, CO 80120
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

Date of mailing (day/month/year) 18 March 2010 (18.03.2010)	
Applicant's or agent's file reference BR.01PCT 0311.01/PCT	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/US2008/068195	International filing date (day/month/year) 25 June 2008 (25.06.2008)

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant ☐ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

Name and Address

BRAASCH BIOTECH LLC
621 N. Main Avenue
Garretson, SD 57030
United States of America

State of Nationality

US

State of Residence

US

Telephone No.

Facsimile No.

E-mail address

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☐ the person ☐ the name ☒ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address

BRAASCH BIOTECH LLC
421 Rose Avenue
Garretson, SD 57030
United States of America

State of Nationality

US

State of Residence

US

Telephone No.

Facsimile No.

E-mail address

☐ Notifications by e-mail authorized

3. Further observations, if necessary:

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office
☐ the International Searching Authority
☐ the Authority(ies) specified for supplementary search

☐ the International Preliminary Examining Authority
☒ the designated Offices concerned
☐ the elected Offices concerned
☐ other:

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Authorized officer

Cruz Juan

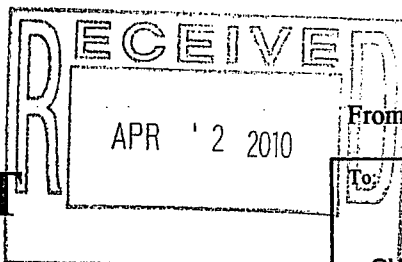
e-mail pt12.pct@wipo.int

Telephone No. +41 22 338 74 12

Facsimile No. +41 22 338 70 90

PATENT COOPERATION TREATY

PCT/US2008/068195

23
95

PCT

From the INTERNATIONAL BUREAU

NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)To:
SWANSON, Barry J.
Swanson & Bratschun, L.L.C.
8210 SouthPark Terrace
Littleton, CO 80120
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing (day/month/year) 18 March 2010 (18.03.2010)	
Applicant's or agent's file reference BR-01PCT 0311-011PCT	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/US2008/068195	International filing date (day/month/year) 25 June 2008 (25.06.2008)

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant ☒ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

Name and Address HAFFER, Keith N. 621 N . Main Avenue Garretson, SD 57030 United States of America	State of Nationality US	State of Residence US
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	E-mail address	

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☐ the person ☐ the name ☒ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address HAFFER, Keith N. 421 Rose Drive Garretson, SD 57030 United States of America	State of Nationality US	State of Residence US
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	E-mail address ☐ Notifications by e-mail authorized	

3. Further observations, if necessary:

4. A copy of this notification has been sent to:

- | | |
|--|--|
| ☒ the receiving Office | ☐ the International Preliminary Examining Authority |
| ☐ the International Searching Authority | ☒ the designated Offices concerned |
| ☐ the Authority(ies) specified for supplementary search | ☐ the elected Offices concerned |
| | ☐ other: |

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Cruz Juan
Facsimile No. +41 22 338 70 90	e-mail pt12.pct@wipo.int Telephone No. +41 22 338 74 12

PATENT COOPERATION TREATY

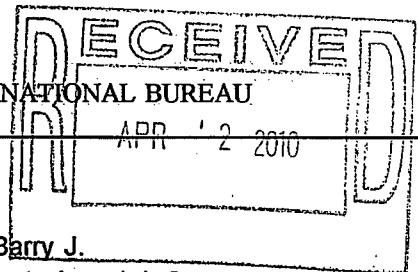
PCT/US2008/068195

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

SWANSON, Barry J.
Swanson & Bratschun, L.L.C.
8210 SouthPark Terrace
Littleton, CO 80120
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing (day/month/year) 18 March 2010 (18.03.2010)	
Applicant's or agent's file reference BR-01PCT 0311-011PCT	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/US2008/068195	International filing date (day/month/year) 25 June 2008 (25.06.2008)

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant ☒ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

Name and Address LARRICK, James 2462 Wyandotte Street Mountain View, CA 94043 United States of America	State of Nationality US	State of Residence US
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	E-mail address	

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☐ the person ☐ the name ☒ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address LARRICK, James Braasch Biotech LLC 1230 Bordeaux Drive Sunnyvale, CA 94089 United States of America	State of Nationality US	State of Residence US
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	E-mail address ☐ Notifications by e-mail authorized	

3. Further observations, if necessary:

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office	☐ the International Preliminary Examining Authority
☐ the International Searching Authority	☒ the designated Offices concerned
☐ the Authority(ies) specified for supplementary search	☐ the elected Offices concerned
	☐ other:

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. +41 22 338 70 90	Authorized officer Cruz Juan e-mail pt12.pct@wipo.int Telephone No. +41 22 338 74 12
---	---

PATENT COOPERATION TREATY

PCT/US2008/068195

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

To:

SWANSON, Barry J.
Swanson & Braasch, L.L.C.
8210 South Park Terrace
Littleton, CO 80120
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

IMPORTANT NOTIFICATION

Date of mailing (day/month/year)

18 March 2010 (18.03.2010)

Applicant's or agent's file reference

BR.01PCT

International application No.

PCT/US2008/068195

International filing date (day/month/year)

25 June 2008 (25.06.2008)

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant☒ the inventor☐ the agent☐ the common representative

Name and Address

MENDELSON, Andrew R.
2462 Wyandotte Street
Mountain View, CA 94043
United States of America

State of Nationality

US

State of Residence

US

Telephone No.

Facsimile No.

E-mail address

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☐ the person☐ the name☒ the address☐ the nationality☐ the residence

Name and Address

MENDELSON, Andrew R.
Braasch Biotech LLC
1230 Bordeaux Drive
Sunnyvale, CA 94089
United States of America

State of Nationality

US

State of Residence

US

Telephone No.

Facsimile No.

E-mail address

☐ Notifications by e-mail authorized

3. Further observations, if necessary:

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office☐ the International Searching Authority☐ the Authority(ies) specified for supplementary search☐ the International Preliminary Examining Authority☒ the designated Offices concerned☐ the elected Offices concerned☐ other:The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Authorized officer

Cruz Juan

e-mail pt12.pct@wipo.int

Telephone No. +41 22 338 74 12

Facsimile No. +41 22 338 70 90

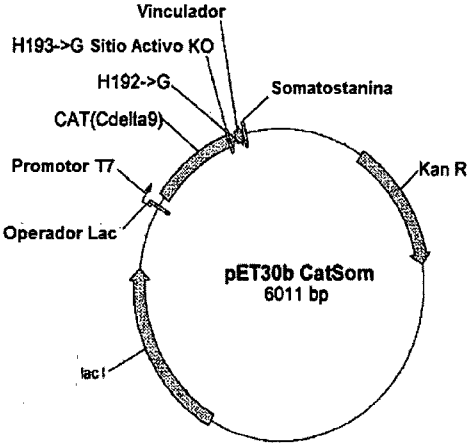
98

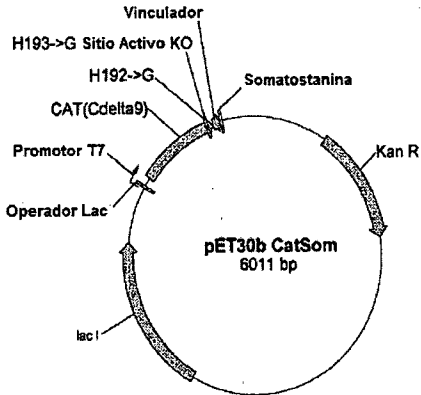
Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISION DE NUEVAS CREACIONES EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT	
(21) N° de solicitud: (22) Fecha de solicitud: (30) Prioridad (31) Prioridad (32) Fecha (33) País		(51) Int Cl: A61K 038/031 (71) Solicitante(s) BRAASCH BIOTECH LLC (72) Inventor(es) ANDREW R. MENDELSON Y OTROS (74) Apoderado: LUZ CLEMENCIA DE PAEZ	
(85) Fecha limite inicio fase nacional: 25/01/2011 (86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT Fecha de presentación de la solicitud: 25/06/2008 No. de solicitud PCT/US2008/068195		(87) Publicación internacional Fecha: 30/12/2009 N° publicación: WO 2009/157926 A1	
(54) Titulo: CLORANFENICOL ACETILTRANSFERASA (CAT) PROTEÍNA SOMATOSTATINA DE FUSIÓN DEFECTUOSA Y USOS DE ESTA			

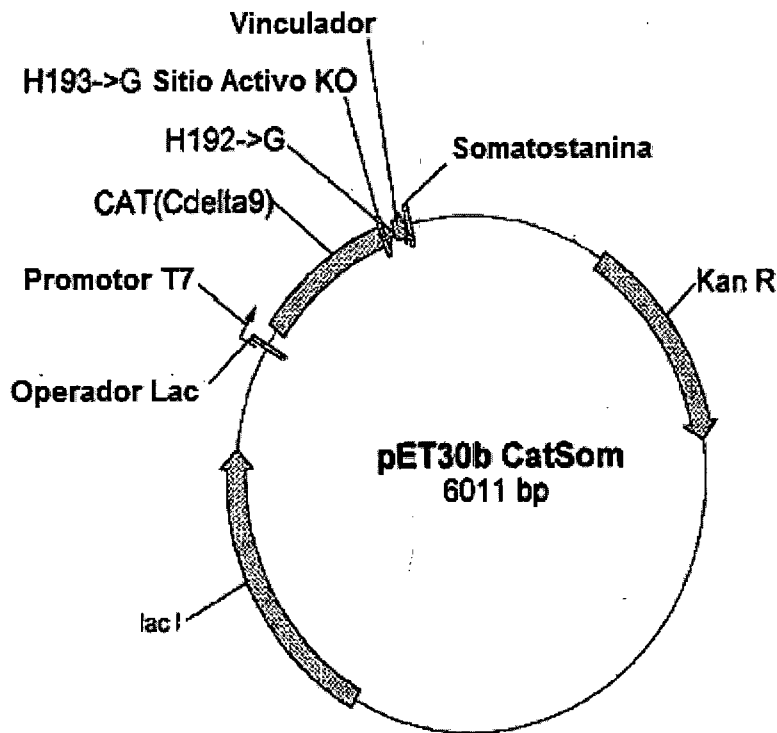
Reivindicación(es):

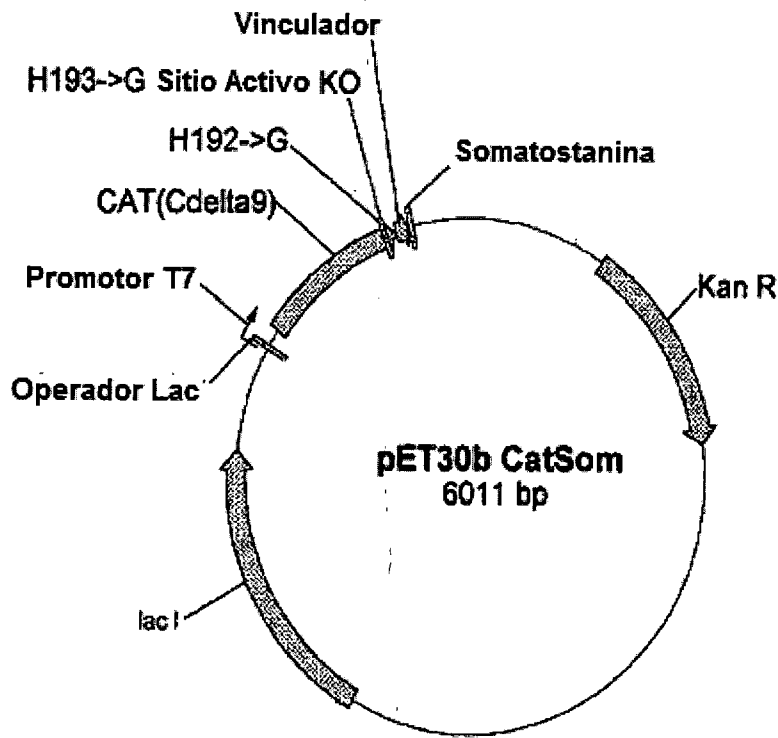
1. Un polipéptidos quimérico que posea la inmunogenicidad de somatostatina, que comprende: una secuencia de aminoácido de somatostatina-14 vinculada a un polipéptido cloranfenicol acetiltransferasa sustancialmente inactivo y truncado donde la somatostatina-14 esté vinculada al cloranfenicol acetiltransferasa inactivo por un espaciador, el espaciador optimizado para una expresión optima del polipéptidos quimérico en una célula huésped objetivo y donde el cloranfenicol inactivo tiene al menos residuo de histidina 193 sustituida con una alanina, glicina u otro como ácido amino.
2. El polipéptido quimérico de la reivindicación 1 donde el espaciador tiene una secuencia de aminoácido de ID DE SECUENCIA NO: 10 o ID DE SECUENCIA NO: 11.
3. El polipéptido quimérico de la reivindicación 1 donde el polipéptido cloranfenicol acetiltransferasa sustancialmente inactivo y truncado tiene una secuencia de aminoácido de ID DE SECUENCIA NO: 3, ID DE SECUENCIA NO: 7 o ID DE SECUENCIA NO: 8.
4. El polipéptido quimérico de la reivindicación 1 que tiene una secuencia de aminoácido con al menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácido de ID DE SECUENCIA NO: 12.
5. El polipéptido quimérico de la reivindicación 1 que tienen una secuencia de aminoácido de ID DE SECUENCIA NO: 12.
6. Una composición inmunogénica que comprende el polipéptido quimérico de la reivindicación 1 junto con adyuvante apropiado farmacéuticamente en una cantidad efectiva para obtener una respuesta inmune.
7. Un adyuvante inmunológico que comprende una emulsión de aceite en agua mezclada con una premezcla de emulsión donde la emulsión de aceite en agua comprende aceite mineral, Tween 80, Span 85 y uno o más polímeros.

8. El adyuvante de la reivindicación 7 donde la premezcla de emulsión comprende un polímero de alto peso molecular, un surfactante, y un emulsificador en una base de aceite acuoso.
9. El adyuvante de la reivindicación 7 que además comprende antígenos preseleccionados donde los antígenos son polipéptidos nativos, recombinantes o sintéticos, polisacáridos y glicoproteínas.
10. Una composición inmunogénica que comprende el polipéptido quimérico de la reivindicación 1 junto con el adyuvante de la reivindicación 8.
11. Un método para el incremento de la producción de leche en vacas lecheras que comprende:
Vacuna de una vaca lechera con una o más dosis de la composición de la reivindicación 6; y espera de al menos diez días durante los cuales la producción de leche de una vaca lechera incrementara comparado con la producción de leche de una vaca lechera en ausencia de la vacuna.
12. El método de la reivindicación 11 donde la vaca lechera es vacunada con una sola dosis de la composición de la reivindicación 6.









100

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-160832- -00000-0000

Fecha: 2010-12-22 11:55:12 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 100

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

MIT : 800176089-2

CERTIFICACION DE EXCEDENTE : 10 - 104,293

FECHA : DICIEMBRE 7 DE 2010

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	146320775	06/12/2010	63,501,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	
99		OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	1,000.00
		TOTAL :	\$ 1,000.00

SON: MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

COLO 18019-841-001-1

ESTA CERTIFICACION DE EXCEDENTE DE PAGO SOLO PODRA SER UTILIZADA
COMO PARTE DE LA CANCELACION DE UNA TARIFA VIGENTE Y NO PODRA SER
SUSTITUIDA POR NINGUN RECIBO.

878

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-160832- -00000-0000

Fecha: 2010-12-22 11:55:12 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 100

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

CERTIFICACION DE EXCEDENTE : 10 - 104,317

FECHA : DICIEMBRE 7 DE 2010

***** CONSIGNACION *****

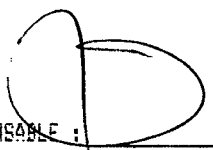
DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	146320775	06/12/2010	63,501,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	
99		OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	20,000.00
		TOTAL :	\$ 20,000.00

SON: VEINTE MIL PESOS

RESPONSABLE :



RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

COLO 18019-841-001-1

ESTA CERTIFICACION DE EXCEDENTE DE PAGO SOLO PODRA SER UTILIZADA
COMO PARTE DE LA CANCELACION DE UNA TARIFA VIGENTE Y NO PODRA SER
SUSTITUIDA POR NINGUN RECIBO.

99

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 900176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 10 - 108,539
FECHA : DICIEMBRE 20 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-160832- -00000-0000

Fecha: 2010-12-22 11:55:12 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve. 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 100

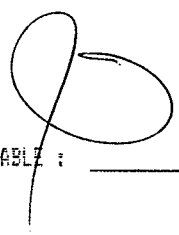
***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754397	146326865	20/12/2010	54,421,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-08	PRORROGA DE TERMINOS	*** N.CREACION PRORROGA DE TERMINOS 0
		TOTAL :	\$ 83,000.00

SON: OCHENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE : 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

COLO 18019-841-001-1

9100

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-160832- -00000-0000

Fecha: 2010-12-22 11:55:12 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 100

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

MIT : B00174089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 10 - 108,582
FECHA : DICIEMBRE 20 DE 2010

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	052754387	146326865	20/12/2010	54,481,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	
		1	TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN
			TOTAL : \$ 554,000.00

SON: QUINIENTOS CINCUENTA Y CUATRO MIL PESOS

RESPONSABLE : 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

0010 18019-841-001-1



No. 10-160832- 00000-0000

Fecha: 2010-12-22 11:55:12 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 100

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO DE UTILIDAD ☐

Art 33 Decisión 486/00

☐ Indicación que se solicita una patente.

☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

☐ Descripción de la invención

☐ Dibujos de ser estos pertinentes

☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)

Completa ☐ Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☒

MODELO DE UTILIDAD PCT ☐

Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

☒ Indicación que se solicita una PCT

☒ Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)

☒ Dibujos de ser estos pertinentes

☒ Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)

Completa ☒ Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

☐ Indicación que se solicita Diseño Industrial

☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

☐ Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño

☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐ Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

☐ Indicación que se solicita un esquema de trazado

☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

☐ Representación gráfica de un esquema de trazado

☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐ Incompleta ☐



Bogotá D.C.,
2020

Doctor(a)
SUAREZ DE PAEZ LUZ CLEMENCIA
Apoderado(a) y/o Representante de
BRAASCH BIOTECH LLC

REFERENCIA	Radicación No.	10 160832
	Solicitud internacional	PCT/US2008/068195
	Fecha inicio fase nacional	25/01/2011
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	<u>10 3381</u>

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene el poder debidamente otorgado, con el lleno de los requisitos exigidos por los artículos 63 y subsiguientes del Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente, deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante, cuando ésta fuere persona jurídica.

2. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante, conforme a lo establecido por el artículo 26 literal k) de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina. Cuando se trate de documentos otorgados en el extranjero, estos deberán legalizarse de conformidad con lo dispuesto por los artículos 259 y 260 del Código de Procedimiento Civil. Cuando se trate de las declaraciones a que hace referencia la Regla 4.17 ii) del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes PCT., el alcance de las tales declaraciones se determinará según indiquen claramente una cesión de derechos del inventor al solicitante o su causante, de conformidad con lo dispuesto en el numeral 5.2.15 del Capítulo Quinto, Título X de la Circular Única de Superintendencia de Industria y Comercio.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Continúa en la página siguiente...



Continuación radicado No: 10 160832



Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Unica No.10 de 2001.

JOSE LUIS SALAZAR LOPEZ
Director de Nuevas Creaciones (c)

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 25 FEB. 2011
adpa11

Al contestar favor indique el número de
radicación que se encuentra a continuación

Sede Centro: Carrera 13 No. 27-00 Pisos 2, 5, 7 y 10 PBX: 5870000
Sede CAN: Av. Cra 50 No. 26-55 int. 2 Tel: 5880070
Call Center 6513240. Línea 01800-910165
Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co
Bogotá D.C. - Colombia