

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 445 403**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/31** (2006.01)

**A23K 1/18** (2006.01)

**C07K 14/655** (2006.01)

**A23L 1/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.06.2008 E 08771936 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.12.2013 EP 2303314**

54 Título: **Proteína de fusión de somatostatina deficiente en cloranfenicol acetiltransferasa (CAT) y el uso de ésta en ganado vacunovacuino**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**03.03.2014**

73 Titular/es:

**BRAASCH BIOTECH LLC (100.0%)**  
**421 Rose Avenue**  
**Garretson, SD 57030, US**

72 Inventor/es:

**MENDELSON, ANDREW R.;**  
**HAFFER, KEITH N. y**  
**LARRICK, JAMES**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

ES 2 445 403 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

**DESCRIPCIÓN**

Proteína de fusión de somatostatina deficiente en cloranfenicol acetiltransferasa (CAT) y el uso de ésta en ganado vacuno

Campo técnico

- 5 La presente invención se refiere a polipéptidos quiméricos a base de somatostatina, y a los usos de los mismos. La presente invención también se refiere a nuevos adyuvantes y composiciones de inmunización para mejorar la inmunogenicidad de, por ejemplo, polipéptidos quiméricos a base de somatostatina de la invención así como a otros antígenos de este tipo.

Antecedentes de la invención

- 10 La somatostatina (también conocida como hormona inhibidora de la hormona de crecimiento o GHIH) es una hormona peptídica producida en el hipotálamo así como ciertas partes del sistema digestivo. La somatostatina generalmente se implica en la regulación del sistema endocrino a través de interacciones con los receptores de la somatostatina acoplados a la proteína G. Esta cascada de señalización basada en la somatostatina conduce a un número de acciones extendidas por todo el cuerpo.

- 15 Pertinente para los aspectos de la presente invención, se sabe que la somatostatina inhibe la liberación de la hormona de crecimiento y la hormona estimulante de la tiroides de la pituitaria anterior. (Patel YC and Srikant CB, Somatostatin and its receptors Adv Mol Cell Endocrinol, 1999, 3 43-73). Otras hormonas inhibidas por la somatostatina incluyen la insulina, el glucagón, secretina, gastrina, pepsina, maletina, etc. (Patel YC and Srikant CB, Somatostatin and its receptors Adv Mol Cell Endocrinol, 1999, 3 43-73). La capacidad de la somatostatina para regular muchos factores/hormonas necesarias para el crecimiento y la utilización de alimentos ha hecho de la somatostatina un objetivo central para el control del crecimiento de animales en el campo de la cría de animales, i.e., la inhibición de la somatostatina da lugar a que mayores niveles de la hormona de crecimiento estén presentes en un animal objetivo y por lo tanto da lugar a animales con una capacidad mayor para producir leche, para proveer mayores cantidades de carne, etc.

- 25 En particular, se ha reconocido la inmunización de los animales a la somatostatina como un medio de neutralización de la somatostatina en un animal objetivo y eliminando así los efectos inhibidores normales de la somatostatina sobre diversos aspectos de la productividad del animal, por ejemplo, producción de leche en una vaca lechera. 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

- 30 Science, 12, 31-46. Es importante destacar que, estos procedimientos de inmunización basados en la somatostatina evitan el uso directo de hormonas anabólicas, por ejemplo, hormona de crecimiento, y similares, en el animal y permiten pequeños cambios en la concentración de los factores anabólicos endógenos y por consiguiente productos alimenticios ecológicamente puros.

- 35 Se sabe que la somatostatina tiene una vida media relativamente corta en la sangre. Con el fin de mejorar los efectos inmunológicos de la somatostatina, se han desarrollado los protocolos de inmunización para mejorar la vida media de las proteínas por medio de la conjugación de la somatostatina con proteínas portadoras diana. Estas proteínas de somatostatina conjugadas están diseñadas para tener una mayor vida media y una mayor antigenicidad en la sangre y por consiguiente proveer beneficios mejorados (especialmente a la luz de los costos de preparación de la somatostatina). Por ejemplo, las proteínas quiméricas de la somatostatina se revelan en U.S. Patent No. 6,316,004, (y la correspondiente European Patent EP0645454) donde se muestra que diferentes conjugados de proteínas que contienen somatostatina tienen una mayor antigenicidad y función con respecto a la productividad de animales de granja en comparación con otros procedimientos de inmunización convencional o basados en hormonas anabólicas.

- 45 Sin embargo, se necesitan dosis más bajas, procedimientos y composiciones de inmunización a basados en un antigenicidad mayor, para mejorar una productividad total y rapidez en el campo de la cría de animales. La presente invención está dirigida a proveer estos procedimientos, composiciones y compuestos de inmunización basados en somatostatina funcionalmente activa y más antigénicos.

En este contexto, se proporciona la siguiente divulgación.

Resumen de la invención

- 50 La presente invención provee nuevos polipéptidos que tienen una mayor inmunogenicidad de la somatostatina. Los polipéptidos de la invención incluyen somatostatina-14 fusionada a una proteína cloranfenicol acetiltransferasa inactivada sustancialmente a través de un ligador funcionalmente optimizado. Los polipéptidos quiméricos de la

invención proveen materiales de bajo costo y altamente efectivos, para utilizar en el campo de la cría de animales, como se describe con más detalle a continuación. Las modalidades de la invención incluyen las secuencias de aminoácidos como se definen en SEQ ID NOs: 3, 7, 8, 10, 11 y 13.

5 En este documento se describen los procedimientos de producción y purificación para la fabricación de los polipéptidos quiméricos en una condición libre de endotoxina y altamente funcional. Los polipéptidos libres de endotoxina proveen una ventaja sustancial e inesperada para utilizar en ciertos animales objetivos, donde las cantidades pequeñas de endotoxina, normalmente concebidas ventajosas para provocar una respuesta inmunogénica, actualmente conducen a una desventaja funcional significativa. Este es particularmente el caso cuando los polipéptidos de la invención se utilizan para inmunizar vacas lecheras criadas y reproducidas en los Estados Unidos. Además, debido a que los polipéptidos quiméricos de la invención muestran una función mejorada en comparación con los materiales convencionales, se utiliza un número de dosis inferior y más pequeño, para inmunizar a los animales objetivo. Esta disminución en las cantidades requeridas también provee una resultante reducción de la endotoxina en las vacunas de la invención. La combinación de un aislado libre de endotoxina y una menor cantidad utilizada de los polipéptidos quiméricos de la invención, permite que vacunas sustancialmente libres de endotoxina sean utilizadas en este documento.

La invención también provee composiciones de adyuvantes que tienen una mayor seguridad y función en comparación con los materiales adyuvantes convencionales. Los adyuvantes en este documento no contienen materiales derivados de animales y son libres de carcinógenos químicos más conocidos, por ejemplo, el benceno y otros materiales similares. Se ha demostrado que las composiciones de adyuvantes en este documento son inesperadamente efectivas para provocar la respuesta inmune cuando se combina con antígenos diana.

La invención además provee las vacunas que contienen los polipéptidos quiméricos de la invención con las composiciones de adyuvantes de la invención. En este documento, las vacunas se utilizan para inducir respuestas inmunes en aves y mamíferos vacunados, por ejemplo, animales objetivos de granja. Los animales de granja ilustrativos para utilizar en este documento incluyen: vacas lecheras, cerdos, ovejas, cabras, pavos, conejos, y terneros. En algunos aspectos los polipéptidos de la invención se preparan y purifican con baja o ninguna endotoxina asociada. Estas vacunas se han optimizado para provocar reacciones inmunogénicas seguras y mejoradas en el animal objetivo.

La invención además incluye los métodos para la vacunación de aves y mamíferos diana utilizando las vacunas de la invención. Se proporcionan los métodos ilustrativos de vacunación de vacas lecheras para mejorar la producción de leche de una manera segura (tanto para los animales como para el usuario final), rentable y de gran utilidad. Otros métodos ilustrativos incluyen vacunación de cerdos, ovejas, pavos, cabras, conejos o terneros para mejorar la producción de carne (y particularmente carne magra) en un animal objetivo de manera segura y rentable.

Estas y otras diferentes características y ventajas de la invención serán aparentes a partir de una lectura de la siguiente descripción detallada y una revisión de las reivindicaciones anexas

35 Breve descripción de los dibujos

Figura 1 es un esquema ilustrativo de un plásmido pET30b CatSom de acuerdo con las modalidades de la presente invención. El plásmido incluye un marcador de resistencia de la canamicina, un operador Lac, promotor T7, secuencia codificante de CAT, todas de acuerdo con las modalidades de la invención, también se incluyen una región ligadora de acuerdo con la invención en este documento y una región codificante de la somatostatina de acuerdo con la invención.

Figura 2 es un SDS-PAGE teñido ilustrativo que muestra una banda de 28KD correspondiente al tamaño previsto de un polipéptido de la somatostatina defectuoso en CAT, codón-optimizado de la invención. El carril 1 es LB + IPTG, reducido, el carril 2 es LB, reducido, el carril 3 es LB + IPTG y el carril 4 es LB.

Figura 3A y 3B son tablas que muestran la producción de leche en litros por día de ganado lechero vacunado (utilizando vacunas como se describe en los Ejemplos) y control (BSY). Cada vaca tenía un número de identificación específico, como se muestra en cada tabla.

Identificación de las secuencias e identificadores de secuencia

SEQ ID NO: 1 AGCKNFFWKTFTSC

SEQ ID NO 1a GCTGGCTGCAAGAATTTCTTCTGGAAGACTTTCACA TCCTGT

50 SEQ ID NO: 2 (His192 → Gly, His193 → Gly):

ES 2 445 403 T3

Atggagaaaaaatcactggatataaccaccgttgatataatccaatggcatcgtaaagaacattttgaggcatttcagtcagttgctcaatgta  
cctataaccagaccgttcagctggatattacggcctttttaagaccgtaaagaaaaataagcacaagttttatccggcctttattcacattcttg  
cccgcctgatgaatgctcatccggaattccgatggcaatgaaagacggtagctggtgatatgggatagttacccttggtacaccgttt  
ccatgagcaaaactgaaacgtttcatcgtctggagtgaataccacgacgattccggcagtttctacacatatattcgcaagatgtggcgtgtt  
acggtgaaaacctggcctatttccctaaagggtttattgagaatatgttttcgtctcagccaatccctgggtgagtttcaccagtttgattaaac  
gtggccaatatggacaacttctcgccccgtttcaccatgggcaaatattatacgcaaggcgacaaggtgctgatgccgctggcgattcag  
gttggtggtgccgtttgtgatggcttccatgctggccgtatgcttaatgaactgcagcag

SEQ ID NO: 3: (His192 → Gly, His193 → Gly):

Mekkitgyttvdisqwhrkehfeafqsvaqtynqtvqlditafkvtvknkhkfyfafi hilarl m nahpefr mamkdgelviwds  
vhpcyvfheqtetfsslwseyhddfrqflhiysqdvacygenlayfpkgfienmffvsanpwvsvtsfdlnvanmdnffapvftmg  
kyytqgdkvimplaiqvvgavcdgfhvgrmlnelqq

SEQ ID NO: 4 (His193 → Gly)

Atggagaaaaaatcactggatataaccaccgttgatataatccaatggcatcgtaaagaacattttgaggcatttcagtcagttgctcaatgta  
cctataaccagaccgttcagctggatattacggcctttttaagaccgtaaagaaaaataagcacaagttttatccggcctttattcacattcttg  
cccgcctgatgaatgctcatccggaattccgatggcaatgaaagacggtagctggtgatatgggatagttacccttggtacaccgttt  
ccatgagcaaaactgaaacgtttcatcgtctggagtgaataccacgacgattccggcagtttctacacatatattcgcaagatgtggcgtgtt  
acggtgaaaacctggcctatttccctaaagggtttattgagaatatgttttcgtctcagccaatccctgggtgagtttcaccagtttgattaaac  
gtggccaatatggacaacttctcgccccgtttcaccatgggcaaatattatacgcaaggcgacaaggtgctgatgccgctggcgattcag  
gttcatggtgccgtttgtgatggcttccatgctggccgtatgcttaatgaactgcagcag

5

SEQ ID NO:5 (1 His193 → Ala)

Atggagaaaaaatcactggatataaccaccgttgatataatccaatggcatcgtaaagaacattttgaggcatttcagtcagttgctcaatgta  
cctataaccagaccgttcagctggatattacggcctttttaagaccgtaaagaaaaataagcacaagttttatccggcctttattcacattcttg  
cccgcctgatgaatgctcatccggaattccgatggcaatgaaagacggtagctggtgatatgggatagttacccttggtacaccgttt  
ccatgagcaaaactgaaacgtttcatcgtctggagtgaataccacgacgattccggcagtttctacacatatattcgcaagatgtggcgtgtt  
acggtgaaaacctggcctatttccctaaagggtttattgagaatatgttttcgtctcagccaatccctgggtgagtttcaccagtttgattaaac  
gtggccaatatggacaacttctcgccccgtttcaccatgggcaaatattatacgcaaggcgacaaggtgctgatgccgctggcgattcag  
gttcatgctgccgtttgtgatggcttccatgctggccgtatgcttaatgaactgcagcag

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

Atggagaaaaaatcactggatataccaccgttgatatacccgaatggcatcgtaaagaacattttgaggcattcagtcagttgctcaatgta  
cctataaccagaccgttcagctggatattacggccttttaagaccgtaaagaaaaataagcacaagtttatccggcctttattcacattcttg  
cccgcctgatgaatgctcatccggaattccgtatggcaatgaaagacgggtgagctggtgatatgggatagttcacccttggtacaccgtttt  
ccatgagcaaacgaaacgtttcatcgctctggagtgaataccacgacgatttccggcagtttctacacatatattcgcaagatgtggcgtgtt  
acggtgaaaacctggcctatttccctaaagggtttattgagaatatgttttctcagccaatccctgggtgagttcaccagtttgatttaaac  
gtggccaatatggacaacttctcgccccgtttcaccatgggcaaatattatacgcaaggcgacaagggtgctgatgccgctggcgattcag  
gttcatggtgccgtttgatggcttccatgctggcagaatgcttaatgaactgcagcag

SEQ ID NO: 7 (una H → G):

Mekkitgyttvdisqwhrkehfeafqsvaqtynqvtvqlditaflktvkknkhkfyfafihiarlmnahpefrmamkdgelviwds  
vhpcytfheqtetfsslwseyhddfrqflhiysqdvacygenlayfpgkfienmffvsanpwvsftsfdlvnanmdnffapvftmg  
kyytqgdkvimplaiqvhgavcdgfhvgrmlnelqq

SEQ ID NO: 8: (H → A)

Mekkitgyttvdisqwhrkehfeafqsvaqtynqvtvqlditaflktvkknkhkfyfafihiarlmnahpefrmamkdgelviwds  
vhpcytfheqtetfsslwseyhddfrqflhiysqdvacygenlayfpgkfienmffvsanpwvsftsfdlvnanmdnffapvftmg  
kyytqgdkvimplaiqvhaavcdgfhvgrmlnelqq

5

SEQ ID NO: 9

tgggaactgcaccgttctgtccacgcccgcctcgcccacgtccggaattcatg

SEQ ID NO: 10

welhrsgprprprpferm

10 SEQ ID NO: 11

welhrsgp(rp)nefm, donde n>1

SEQ ID NO: 12

Atggagaaaaaatcactggatataccaccgttgatatacccgaatggcatcgtaaagaacattttgaggcattcagtcagttgctcaatgta  
cctataaccagaccgttcagctggatattacggccttttaagaccgtaaagaaaaataagcacaagtttatccggcctttattcacattcttg  
cccgcctgatgaatgctcatccggaattccgtatggcaatgaaagacgggtgagctggtgatatgggatagttcacccttggtacaccgtttt  
ccatgagcaaacgaaacgtttcatcgctctggagtgaataccacgacgatttccggcagtttctacacatatattcgcaagatgtggcgtgtt  
acggtgaaaacctggcctatttccctaaagggtttattgagaatatgttttctcagccaatccctgggtgagttcaccagtttgatttaaac  
gtggccaatatggacaacttctcgccccgtttcaccatgggcaaatattatacgcaaggcgacaagggtgctgatgccgctggcgattcag  
gttgggtggcgtttgatggcttccatgctggcgtatgcttaatgaactgcagcagtggggaactgcaccgttctggtccacgcccgcgc  
cctcgcccacgtccggaattcatggccggctgcaagaacttctttggaaaacctttacgagctgc

SEQ ID NO: 13

mekkitgyttvdisqwhrkehfeafqsvaqctynqtvqlditaflktvkknkhkfyfapifihilarlmnahpefrmamkdgelviwds  
hpcytfheqtetfsslwseyhddfrqflhiysqdvacygenlayfpkgfienmffvsanpwvsfstdlnvanmdnffapvftmgk  
yytqgdkvimplaiqvvgavcdgfhvgrmlnelqqwelhrsgprprprpfeinagcknffwktftsc

SEQ ID NO: 14

mekkitgyttvdisqwhrkehfeafqsvaqctynqtvqlditaflktvkknkhkfyfapifihilarlmnahpefrmamkdgelviwds  
hpcytfheqtetfsslwseyhddfrqflhiysqdvacygenlayfpkgfienmffvsanpwvsfstdlnvanmdnffapvftmgk  
yytqgdkvimplaiqvvhavcdgfhvgrmlnelqqwelhrsgprprprpfeinagcknffwktftsc

5 Descripción detallada de la invención

Las modalidades de la presente invención proveen los polipéptidos quiméricos, que tienen mayor inmunogenicidad de somatostatina. Las modalidades en este documento incluyen los métodos para usar la proteína quimérica para aumentar cierta productividad de animales objetivo de granja, y especialmente para aumentar la producción de leche en vacas lecheras y producción de carne de ganado vacuno, cerdos, ovejas, conejos, cabras, terneros, etc.

10 Las modalidades de la presente invención también incluyen nuevos adyuvantes para utilizar con las proteínas quiméricas de la invención para mejorar la inmunogenicidad en un animal objetivo, seguridad mejorada para el animal objetivo que se vacuna y seguridad mejorada para un usuario del animal objetivo, i.e., consumidor del animal vacunado o consumidor de un producto a partir del animal vacunado.

15 En un aspecto, la invención provee una proteína quimérica de la somatostatina diseñada para mejorar la inmunogenicidad de la somatostatina. Las modalidades de la proteína quimérica de la somatostatina incluyen una secuencia de aminoácido de somatostatina-14 ligada y una secuencia conectora para una proteína truncada de la cloranfenicol acetiltransferasa (CAT) sustancialmente inactivada. En algunos casos el ligador (también denominado en este documento como un espaciador) ha sido optimizado para mejorar la producción del polipéptido quimérico en las células huésped diana. Los métodos se describen para producir y aislar estas cantidades mejoradas de la  
20 proteína quimérica en una condición sustancialmente libre de endotoxina.

25 En otro aspecto, la invención provee novedosas composiciones de adyuvantes (que no contienen ningún producto químico o proteína derivada de animales, como el benceno) y las vacunas que incorporan proteínas quiméricas de la somatostatina de la invención. Las modalidades incluyen adyuvante/proteína quimérica de la somatostatina inesperadamente efectiva (por lo general sustancialmente libre de endotoxina), i.e., nuevas vacunas, composiciones para inducir la antigenicidad en animales vacunados objetivo de granja. En algunas modalidades el animal objetivo de granja es una vaca lechera, ternero, cerdo, cabra, etc. Tener en cuenta que aunque los adyuvantes de la presente invención se describen en combinación con las proteínas quiméricas de la somatostatina en este documento, se contempla que los adyuvantes de la invención en este documento se podrían utilizar con otras vacunas y en una variedad de animales objetivo, por ejemplo, humanos, cerdos, perros, gatos, etc.

30 En otros aspectos, se proveen los métodos para la vacunación de animales objetivo de granja utilizando tan sólo una dosis de esta nueva vacuna para obtener una productividad mejorada, y en particular, una producción mejorada de leche en vacas lecheras y de otros tipos de animales de granja. Estos procedimientos de dosis mejorada (menor número de vacunaciones y concentración más pequeña de somatostatina quimérica) proveen un aprovechamiento del tiempo y costos más bajos, lo que cuando se extiende a la industria láctea representa un avance significativo en  
35 la productividad en los animales de granja. También, los métodos en este documento evitan el uso de la terapia de la hormona de crecimiento recombinante lo que es una preocupación en la industria del cuidado de la salud, i.e., tanto para el animal de granja diana, el usuario final y el entorno dónde la excreción de hormona de crecimiento recombinante se libera en el suministro de agua subterránea.

Definiciones

40 Las siguientes definiciones se proveen para facilitar la comprensión de ciertos términos utilizados frecuentemente en este documento y no pretenden limitar el alcance de la presente divulgación.

5 El término "aminoácido" se refiere a cualquiera de los veinte aminoácidos de origen natural así como cualquiera de las secuencias de aminoácidos modificadas. Las modificaciones pueden incluir procesos naturales, tales como procesamiento postraduccional, o pueden incluir modificaciones químicas que se conocen en la técnica. Las modificaciones incluyen pero no se limitan a: fosforilación, ubiquitinación, acetilación, amidación, glicosilación, unión covalente de flavina, ribosilación de ADP, reticulación, yodación, metilación, y similares.

Los términos "polipéptido quimérico" o proteína de fusión se refieren a un primer polipéptido que tiene unido un segundo, polipéptido heterólogo, de tal manera que el primer y segundo polipéptidos se expresan en el marco. A menudo los dos polipéptidos pueden estar unidos a través de un segmento ligador o espaciador para optimizar la expresión y función de los polipéptido(s) quimérico(s) de la invención.

10 El término "endotoxina" se refiere a las toxinas asociadas en las paredes celulares de bacterias gram negativas. En algunos casos las toxinas son componentes lipopolisacáridos de componentes de membranas bacteriales de la membrana exterior de las paredes celulares de bacterias gram negativas.

15 El término "célula huésped" o "células huésped" se refiere a células establecidas en cultivo ex vivo. Es una característica de las células huésped discutida en este documento que pueden ser capaces de expresar las proteínas quiméricas de la invención. Ejemplos de células huésped apropiadas útiles para los aspectos de la invención incluyen, pero no se limitan a, células bacterianas, levaduras, de insectos y de mamíferos. Ejemplos específicos de tales células incluyen células de insecto SF9 (Summers and Smith, 1987, Texas Agriculture Experiment Station Bulletin, p 1555), células de E. Coli (BL21(DE3), Novagen), levaduras (Pichia Pastoris, Invitrogen) y células hepáticas humanas (Hep G2 (ATCC HB8065).

20 El término "secuencia de ácido nucleico" se refiere al orden de secuencia de desoxiribonucleótidos a lo largo de la cadena del ácido desoxiribonucleótido. El orden de estos desoxiribonucleótidos determina el orden de los aminoácidos a lo largo de la cadena de polipéptido. La secuencia de desoxiribonucleótido codifica para la secuencia de aminoácido.

25 Los términos "proteína", "péptido", y "polipéptido" se utilizan de forma intercambiable para indicar un polímero de aminoácido o un conjunto de dos o más polímeros de aminoácidos unidos o que interactúan.

30 El término "sustancialmente" se refiere a una "gran extensión", por ejemplo, sustancialmente eliminado significa que al menos 75%, más normalmente al menos 80%, 85%, 90%, 95% y más normalmente 96%, 97%, 98%, 99% del material diana se elimina; sustancialmente inactivo significa al menos 75%, más normalmente 80%, 85%, 90%, 95% y más normalmente 96% 97%, 98%, 99% de una enzima se inactiva. 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 eliminada. (la actividad de CAT se puede determinar utilizando ensayos funcionales conocidos, por ejemplo enlace de n-Butiril Coenzima A con cloranfenicol radiomarcado y la posterior medición por Recuento de Centelleo Líquido (LCS); determinando la cantidad de etiqueta radioactiva transferida a partir de [<sup>14</sup>C]acetil CoA con cloranfenicol por medio de cromatografía de capa delgada (ver Molecular Cloning: A Laboratory Model, 3rd ed., J Sambrook and DW Russell, 2001. Cold Spring Harbor Press] u otros ensayos conocidos o similares).

35 El término "vector" se utiliza en referencia a moléculas de ácido nucleico que transfieren segmento(s) de ADN de una célula a otra célula. Algunas veces el término "vehículo" se utiliza de forma intercambiable con el vector. Dos tipos comunes de vectores son vectores plásmidos y virales.

#### Somatostatina

40 Un número de estudios ha demostrado que los animales inmunizados con la somatostatina tienen una ganancia media diaria del 10-20%, una reducción del apetito en un 9% y un aumento del 11% en la eficiencia del uso de los alimentos. Los animales inmunizados con somatostatina, y también su descendencia, tienen proporciones correctas, y la distribución del peso de los animales entre los músculos, huesos y grasa es la misma que en los animales control (ver Reichlin, 1987). Por consiguiente, la inmunización de somatostatina provee una forma útil y segura de mejorar una productividad del animal objetivo. Este es particularmente el caso cuando se compara con el uso de la hormona de crecimiento recombinante, que el uso ha planteado inquietudes sobre la hormona en leche o carne de animales tratados o para la seguridad de los propios animales o para la acumulación de la hormona en el ecosistema, particularmente el suministro de agua subterránea.

50 La somatostatina-14 es un tetradecapéptido biológicamente activo producida en el hipotálamo y tracto gastrointestinal. La secuencia de aminoácido del tetradecapéptido es AGCKNFFWKFTTSC (SEQ ID NO: 1). La secuencia de somatostatina-14 se conserva altamente entre los mamíferos (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). El tetradecapéptido se codifica por una secuencia de ácido nucleico GCTGGCTGCAAGAATTTCTTCTGGAAGACTTTTCACATCCTGT (SEQ ID NO: 1a) (se debe tener presente

que otras secuencias de ácido nucleico se pueden utilizar para codificar SEQ ID NO: 1, sin embargo, SEQ ID NO: 1a se provee para fines ilustrativos).

Se sabe que la somatostatina-14 tiene un fuerte efecto inhibitor sobre un gran número de hormonas involucradas en el crecimiento y utilización de alimentos en animales. Como se ha descrito previamente en US Patent No. 6,316,004, la somatostatina-14 y las versiones quiméricas de la somatostatina se pueden utilizar en la inmunización de animales para el aumento en el peso diario y, cuando sea apropiado, la producción de leche. Estos procedimientos de inmunización se llevaron a cabo con adyuvantes convencionales y no utilizaron los materiales a base de la somatostatina de esta invención. Se debe tener en cuenta que el tratamiento de animales objetivo con anticuerpos anti-somatostatina ha demostrado ser excesivamente costoso y no-sorprendente funcionalmente, eliminando así el tratamiento con anticuerpo directo como no-práctico. Muromtsev G.S., et al., 1990, Basics of agricultural biotechnology, Agropromizdat, Moscow, pp 102-106. Un aspecto de la presente invención se basa en el concepto de que los anticuerpos anti-somatostatina formados por las composiciones y los métodos descritos en este documento atenúan pero no eliminan completamente las acciones inhibitoras principalmente de la somatostatina en el animal objetivo. Este proceso produce un aumento natural y proporcional en el crecimiento y la productividad de los animales objetivo inmunizados.

Como tal, los aspectos de la presente invención facilitan la inmunización basada en la somatostatina proporcionando materiales altamente inmunogénicos para el uso de la inmunización de los animales objetivo. Estos compuestos de inmunización basados en la somatostatina se han optimizado para la expresión y la antigenicidad. En algunas modalidades, la somatostatina-14 se expresa como un polipéptido de la somatostatina quimérico deficiente de CAT, codón-optimizada. Estos materiales proveen una mejora inesperada sobre otras vacunas basadas en la inmunización.

#### Nuevas Construcciones de Somatostatina Deficiente de CAT, Codón-Optimizada

En este documento se describen las moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican las proteínas quiméricas que tienen actividad inmunogénica de somatostatina optimizada. En este documento se describen las nuevas construcciones del ácido nucleico que codifican las proteínas de fusión CAT que tienen actividad inmunogénica para la somatostatina. Estos polipéptidos se han identificado por su actividad funcional óptima en procedimientos de inmunización.

En un ejemplo, una construcción que tiene un esquema como se muestra en la figura 1 se describe que codifica los polipéptidos quiméricos. Las construcciones de ácido nucleico descritas en este documento codifican una enzima CAT inactiva sin 10 aminoácidos C-terminales e incluye uno o dos aminoácidos reemplazados por la histidina. La inactivación sustancial de CAT permite reacciones adversas para CAT en el animal objetivo inyectado (y por lo tanto evitar la resistencia de CAT). Se debe tener en cuenta que el cloranfenicol es un antibiótico comúnmente utilizado en la industria de ganado vacuno y resistencia al cloranfenicol en ganado vacuno sería adverso a la seguridad de animales vacunados utilizando materiales de la invención. Tal como, las construcciones que tienen una CAT inactivada tiene la inmunogenicidad de CAT sin los efectos secundarios adversos de resistencia en animales vacunados (un tema de seguridad problemático para los animales).

La enzima CAT es inactivada por la eliminación del grupo imidazol de His193 (His195 en la variante CAT<sub>III</sub> canónica, ver Lewendon et al a continuación). En otra modalidad la enzima CAT es inactivada mediante la eliminación de los grupos imidazol de ambos His 193 y His192 adyacente (respectivamente His195 y His194 para CAT<sub>III</sub>). La eliminación del grupo imidazol His193 esencial (His195 en CAT<sub>III</sub>) a partir del sitio activo de CAT y reemplazo con una alanina, glicina u otro aminoácido de este tipo da lugar a la inactivación sustancial de la enzima CAT 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.). Ejemplos, descritos en este documento incluyen inactivación de la enzima CAT a través de la eliminación del grupo imidazol de His192 solo (His 194 para CAT<sub>III</sub>). Como para His193, el reemplazo puede ser con una alanina, glicina u otro aminoácido de este tipo.

En los ejemplos descritos en este documento uno o más aminoácidos histidina reemplazados se codifican por los ácidos nucleicos localizados en los números de posición 574-576 y 577-579 de SEQ ID NO: 2 (correspondiente a los números de aminoácido 192 y 193 en SEQ ID NO:3). En los ejemplos descritos en este documento las secuencias de ácido nucleico son SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO:6. Las proteínas quiméricas de la invención proveen proteínas altamente inmunogénicas con poca o ninguna actividad de CAT, una significativa mejora sobre la técnica existente. Las modalidades de la enzima CAT sustancialmente inactivada se unen a un polipéptido de la somatostatina de la invención. Esta unión se puede hacer directamente o con un ligador (como se describe más completamente, a continuación).

La inactivación de los sitios diana (His192 y/o His193) se puede lograr a través de cualquier número de procedimientos conocidos por aquellos expertos en la técnica incluyendo mutagénesis dirigida al sitio y ensamblaje de gen sintético. En un ejemplo descrito en este documento, la secuencia de ácido nucleico que codifica la histidina 193 se modifica para codificar una alanina, glicina u otro aminoácido de este tipo. En otro ejemplo, las secuencias de

ácido nucleico que codifican la histidina 192 se modifica para codificar alanina, glicina u otros aminoácidos de este tipo. Los reemplazos de combinación típicos para los polipéptidos quiméricos 192 y 193 incluyen: alanina, alanina; alanina, glicina; glicina, alanina; y glicina, glicina.

5 Las modalidades de la presente invención también incluyen las secuencias de aminoácidos para polipéptidos deficientes en CAT de la invención, incluyendo secuencia de aminoácido que tiene SEQ ID NO: 7, 8 y 3 (correspondiente a his → gly a 193, his → ala a 193, y his → gly a ambas 192 y 193).

10 Como se muestra en la Figura 1, la enzima CAT sustancialmente no-activa se puede ligar a la somatostatina-14 4 a través de un espaciador de longitud variable. El espaciador que se necesite para asegurar la presentación de la somatostatina codificada sobre una superficie global. Las modalidades del espaciador en este documento proveen la resistencia a la proteasa óptima y la exposición óptima al epítipo y la inclusión en los polipéptidos quiméricos de la invención ha mostrado una mejora inesperada sobre las construcciones no tienen la(s) secuencia(s) conectora(s) de la presente invención.

15 Ejemplos de los espaciadores descritos en este documento se han optimizado en longitud y composición para asegurar la expresión de la somatostatina deficiente de CAT en varios microorganismos, y en particular en E. Coli. Las construcciones originales como se describe en US Patent No. 6,316,004, incluyeron un espaciador que tiene codones de E.Coli raros y requieren la co-expresión de ARNTs raros a partir de un segundo plásmido o auxiliar. Los ejemplos espaciadores descritos en este documento eliminan estos codones de E. Coli raros y por lo tanto eliminan la necesidad de un segundo auxiliar plásmido, una mejora sobre la tecnología previa.

20 En los ejemplos descritos, el espaciador tiene una secuencia de ácido nucleico de tgggaactgcaccgttctgglccacgcccgcgcccctcgcccacgtccggaattcatg (SEQ ID NO:9). Un ejemplo de un espaciador de la invención tiene una secuencia de aminoácido de welhrsgprprprpefm (SEQ ID NO:10). Una secuencia de aminoácido típica para un espaciador de la invención es welhrsgp(rp)<sub>n</sub>ecfm donde n>1 (SEQ ID NO: 11). Como se señaló anteriormente, estas secuencias de nuevos espacios proveen la mejora de la resistencia de la proteasa (permitiendo así una mayor producción en comparación con las construcciones reveladas en U.S. Patent No. 6,316,004) y exposición óptima a la somatostatina-14. La combinación de la somatostatina-14 unida a una enzima sustancialmente inactivada (construcciones reemplazadas por la histidina) por un ligador configurado de forma óptima mostró inesperada y sorprendentemente mejora sobre otros materiales convencionales cuando se utiliza para inmunizar animales objetivo, para mejorar la productividad.

30 Aunque no es tan óptima en función, otras secuencias ligadoras de longitud variable se pueden utilizar para unir la somatostatina-14 a la enzima CAT inactiva sustancialmente. Además, se contempla que una fusión directa de la somatostatina-14 con la enzima CAT inactiva sustancialmente, también se podría utilizar.

#### Vectores y Células huésped

35 También se describen en este documento los vectores que comprenden moléculas de polinucleótido, así como células huésped transformadas con tales vectores. Las moléculas de polinucleótido descritas en este documento se pueden unir a un vector, que incluye un marcador seleccionable y origen de replicación, para la propagación de huésped de interés. Las células huésped se modificaron genéticamente para incluir estos vectores y por lo tanto expresan los polipéptidos. Los vectores en este documento incluyen moléculas de polinucleótidos ligadas operablemente a las secuencias reguladoras transcripcionales o traduccionales apropiadas, tales como aquellas para células huésped microbianas o virales. Ejemplos de secuencias reguladoras incluyen promotores 40 transcripcionales, operadores, o potenciadores, sitios de enlace ribosomales de ARNm, y secuencias apropiadas que controlan la transcripción y traducción. Las secuencias de nucleótidos como se describe en este documento están ligadas operablemente cuando las secuencias reguladoras en este documento funcionalmente se relacionan con el polipéptido quimérico codificante de polinucleótidos.

45 Los vehículos típicos incluyen plásmidos, vectores de lanzadera de levadura, baculovirus, adenovirus inactivados, y similares. En un ejemplo descrito en este documento, el vehículo es un plásmido pET30b CatSom modificado (ver Figura 1). Las células huésped diana descritas en este documento incluyen huésped bacteriano, por ejemplo, E. Coli., levadura, células de insecto SF-9, células de mamífero, células de vegetales, y similares.

50 En un ejemplo descrito en este documento, las secuencias reguladoras incluyen un promotor T7lac, CAT, Trp, o T5 para la expresión de los polipéptidos quiméricos de la invención en E. coli u otro tipo de microbio. Estas secuencias reguladoras se conocen en la técnica y se utilizan bajo condiciones apropiadas y conocidas.

Cuando se utilizan células de vegetales verdes modificadas genéricamente para la expresión, se pueden utilizar los sistemas como se desarrolla por Planet Biotechnology y otros.

En este documento, se describen diversos plásmidos que han sido construidos para la expresión de polipéptidos quiméricos a través del uso de secuencias reguladoras diana. Los plásmidos ilustrativos pueden incluir un promotor T7lac (ver Figura 1).

5 Las células huésped para la expresión de polipéptidos quiméricos diana incluyen células procariotas, de levadura y eucariotas superiores. Los huéspedes procariotas ilustrativos incluyen bacterias del género *Escherichia*, *Bacillus*, y *Salmonella* así como el género *Pseudomonas* y *Streptomyces*. En los ejemplos descritos en este documento, la célula huésped es del género *Escherichia* y puede ser *Escherichia Coli* (E. Coli).

10 Como se muestra en los Ejemplos a continuación, las construcciones descritas en este documento proveen la expresión de la somatostatina deficiente en CAT óptima bajo una variedad de condiciones. Estas construcciones son particularmente eficientes para la expresión en huéspedes procariotas y en particular bacterias de los géneros *Escherichia*. Obsérvese igualmente que también se pueden utilizar diversos sistemas de expresión de plantas, por lo general utilizando *Agrobacterium trameficies*.

#### Purificación de la Proteína de Fusión Libre de Endotoxina

15 Los aspectos de la presente invención incluyen el uso de somatostatina libre de endotoxina, codón-optimizada, deficiente de CAT para utilizar en la vacunación de animales, y en particular para la vacunación de animales de granja, que en algunos casos son vacas lecheras criados en Estados Unidos. Los materiales libres de endotoxina son particularmente importantes para ganado vacuno criado y reproducido en los Estados Unidos (ver por ejemplo, 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).

20 En una modalidad, las proteínas que contienen somatostatina inmunogénica quimérica de la invención se preparan mediante la transformación de células diana con vehículos apropiados que contienen somatostatina. Como se señaló anteriormente, los vehículos para utilizar en este documento incluyen apropiados sistemas de vector y plásmido conocidos para la expresión en células diana seleccionadas.

25 En un aspecto de la invención, las proteínas que contienen somatostatina inmunogénica quimérica se expresan en las células huésped diana. La expresión de la proteína quimérica se lleva a cabo utilizando secuencias reguladoras diana. En algunos aspectos los polipéptidos quiméricos se han optimizado (especialmente con respecto a las secuencias espaciadoras reveladas en este documento) para la expresión en E. Coli.

30 A continuación, la proteína quimérica se puede purificar de acuerdo con tecnologías de purificación de proteínas, incluyendo, por ejemplo, lisis de lisozima, centrifugación diferencial de cuerpos de inclusión, cromatografía de tamiz y similares. Los procedimientos de replegamiento se pueden realizar en cloruro de guanidina y urea a pH alcalino seguido por diálisis y liofilización.

35 En un ejemplo descrito en este documento, las células E. coli se transforman utilizando la somatostatina deficiente en CAT, codón-optimizada, que contiene el plásmido - pET30b CatSom; el pET30b CatSom que tiene secuencias reguladoras a base de E. Coli apropiadas para la expresión. En algunos casos, la fermentación de aproximadamente diez litros de estas células provee al menos 500 gramos y en algunos casos 600 gramos de biomasa total, produciendo aproximadamente 4 - 6 gramos de proteína total. Se estima a partir de tinción con plata y azul de coomassie que hasta la mitad de la proteína puede ser proteína quimérica (ver Ejemplo 2 y Figura 2).

40 En algunas modalidades en este documento, la proteína quimérica de la invención se purifica a partir de células huésped transformadas en una condición sustancialmente libre de endotoxina. El hecho de que la endotoxina, y en particular múltiples exposiciones a la endotoxina, en algunos animales, y en particular vacas lecheras, dan lugar a animales sustancialmente comprometidos (mastitis y shock por endotoxinas en vacas lecheras criadas y reproducidas en los Estados Unidos) fue un resultado inesperado y sorprendente que los inventores actuales obtuvieron. Este hecho resultó en un intento de eliminar o reducir la cantidad de dosis de endotoxina o número de exposiciones en las vacunas de vacas lecheras. Se debe tener en cuenta que este efecto basado en las endotoxinas se produce mucho menos en vacas criadas y reproducidas en Rusia y otros países como el ganado lechero son descendientes de una diferente cepa de cow. Holstein Association, 1 Holstein Place, Brattleboro, Vermont 05302-0808. Este hallazgo en vacas lecheras de Estados Unidos generalmente es contrario a la expectativa de que una vacuna debería incluir alguna baja cantidad de endotoxina para ayudar a maximizar una respuesta inmune de los animales, como es el caso de las vacas lecheras cuando se vacunan con la somatostatina en algunos otros mercados Europeos (ver US Patent No. 6, 316,004).

50 Como tal, algunas modalidades en este documento se dirigen al uso de proteínas quiméricas sustancialmente libres de endotoxina para utilizar en vacunas, y especialmente para utilizar en vacunas utilizadas en la industria de ganado vacuno y para utilizar en la industria de ganado vacuno dentro de los Estados Unidos. En ciertas modalidades los

niveles de endotoxina están en o por debajo de 1 EU/ml y en otras modalidades los niveles de endotoxina se eliminan sustancialmente, i.e., los polipéptidos quiméricos de la invención son sustancialmente libres de endotoxina.

En una modalidad, la IB recuperada a partir de células huésped lisadas se lava múltiples veces utilizando una solución de lavado carente de endotoxina, i.e., agua o solución libre de endotoxina. El pellet de IP recuperado opcionalmente se puede lavar hasta que los niveles de endotoxina estén por debajo de aproximadamente 1 EU/ml (se pueden realizar pruebas de endotoxina utilizando uno o más ensayos conocidos, incluyendo kits de prueba disponibles comercialmente a partir de MP Biochemicals, Charles River, etc.). En algunas modalidades la solución de lavado es libre de endotoxina e incluye uno o más inhibidor(es) de proteína proteolítica, por ejemplo, fenilmetanosulfonilfluoruro (PMSF), 4-(2-aminoetil)-bencenosulfonil fluoruro (AEBSF), etc. En algunas modalidades, la solución de lavado es solución salina reguladora de fosfato (PBS) que tiene una cantidad efectiva inhibidora de PMSF, AEBSF o una combinación de ambos PMSF y AEBSF.

En algunos aspectos, los pellets sustancialmente libres de endotoxina se pueden tratar con una solución de despliegue de proteínas a pH 12.5 que contiene urea y proteína replegada en una solución de replegado que contiene una molaridad reducida de urea con arginina, glicerol y/o sacarosa. La concentración de proteína quimérica purificada se modifica para estar entre 1 y 3 mg/ml y por lo general aproximadamente 1.4 a 1.8 mg/ml. En algunos casos, la proteína quimérica sustancialmente libre de endotoxina se provee para formulaciones de vacuna a aproximadamente 1.5 a 5 mg/2ml de dosis y más normalmente de 2.0 a 3.5 mg/2 ml de dosis.

Otros procedimientos de eliminación de endotoxinas se contemplan para estar dentro del alcance de la presente invención y pueden incluir, por ejemplo, columnas de eliminación de la endotoxina de intercambio iónico disponibles comercialmente, columnas hidrofóbicas, etc. (ver por ejemplo Columnas Mustang E o G (Millipore)).

#### Adyuvante de Respuesta Inmune Mejorada

Las modalidades de la invención proveen nuevos adyuvantes para mejorar la inducción de inmunidad humoral. Estos adyuvantes proveen una mejora significativa sobre materiales convencionales para la inducción de una respuesta humoral. Los adyuvantes en este documento se pueden utilizar con numerosas vacunas, pero se muestran en los Ejemplos en el uso con los polipéptidos de la invención para la vacunación en las vacas lecheras, cerdos o terneros.

Es importante destacar que, todos los componentes de adyuvantes en este documento son de origen no-animal, eliminando así, la potencial contaminación cruzada de animales vacunados a partir de componentes de adyuvantes potencialmente contaminados. Por ejemplo, las modalidades en este documento pueden utilizar Tween 80 libre de origen animal. Esto es particularmente importante cuando el animal objetivo es una vaca lechera, debido a preocupaciones sobre encefalopatía espingoforme bovina (BSE) u otro tipo de enfermedades bovinas. Se debe tener en cuenta que estas preocupaciones son igualmente apropiadas para el tratamiento humano cuando el adyuvante de origen no-animal provee significantes beneficios de seguridad. Adicionalmente, las modalidades del adyuvante en este documento son libres de benceno y otros tipos de compuestos cancerígenos. Estas modalidades proveen un beneficio de seguridad no disponible en la mayoría de compuestos de adyuvante convencionales. Por ejemplo, las modalidades en este documento pueden utilizar Carbopol® 974P o ácido policíclico libre de benceno.

En una modalidad, el adyuvante inmunológico comprende una emulsión aceite-en-agua en combinación con antígenos seleccionados mezclados dentro de una premezcla de emulsión.

Las emulsiones aceite-en-agua ilustrativas para utilizar en este documento incluyen combinaciones de aceite mineral, Tween 80, Span 85 y polímeros diana (ácido poliacrílico libre de benceno). En algunos casos el polímero diana se selecciona del grupo que consiste de Carbómero Homopolímero Tipo B. Las emulsiones aceite-agua típicas comprenden de aproximadamente 8-10% de aceite mineral (v/v), 0.003 a 0.004% de Tween 80 (v/v), 0.007 a 0.008 de Span 85 (v/v) y 0.04 a 0.06% de polímero (w/v).

Las premezclas de emulsión de la invención ilustrativas se componen de un polímero de alto peso molecular, agente tensoactivo, y emulsificante en aproximado el 50% de base oleosa acuosa. Los polímeros de alto peso molecular para utilizar en este documento incluyen ácidos acrílicos reticulados con alil éteres de pentaeritrol. En algunos casos los polímeros de alto peso molecular tienen una viscosidad Brookfield RVT de entre aproximadamente 29,000 y 40,000, por ejemplo, Carbopol® 974P (Noveon, Inc).

#### Método de Obtención de Respuesta Inmune Optimizada en Vacas Lecheras u Otros Animales Objetivo de Granja

De acuerdo con las composiciones y los métodos de la presente invención, las composiciones inmunogénicas descritas en este documento (construcciones de somatostatina deficiente en CAT libres de endotoxina, codón-optimizadas) se combinan con nuevos adyuvantes, como se describe anteriormente, para proveer las vacunas de la invención. En una modalidad, las construcciones de somatostatina deficiente en CAT libres de endotoxina, codón-

5 optimizadas, se administran a una dosis total de 2.98 mg/2ml (de los cuales del 5% al 25% es adyuvante (v/v), más normalmente del 10% al 20% es adyuvante y más normalmente aproximadamente el 20% es adyuvante). Se debe tener en cuenta que otros adyuvantes convencionales se contemplan para estar dentro del alcance de la invención y se pueden utilizar con las construcciones de somatostatina deficiente en CAT, codón-optimizadas de la invención, sin embargo, se han demostrado óptimos resultados cuando los nuevos adyuvantes en este documento se utilizan en esta capacidad.

El objetivo de las nuevas construcciones de somatostatina y adyuvante es aumentar la productividad de un animal objetivo, por lo general un animal de granja, y más normalmente una vaca lechera, ternero, ovejas, cerdo, o cabra.

10 La preparación se inyecta por vía intramuscular o por vía subcutánea, preferiblemente menos de 12 veces, más preferiblemente menos de 6 veces, y en algunos casos tan solo una vez. Cuando se necesita más de una inyección en un animal objetivo, antes de la segunda inyección es típico un intervalo de 14 a 28 días. Como se señaló anteriormente, las modalidades en este documento evitan el uso de un tratamiento con hormona recombinante para los animales objetivo, una ventaja importante en el campo de la cría de animales (la hormona de crecimiento recombinante se ha asociado con la aparición temprana de la pubertad de las niñas y los diversos problemas ambientales, a tal grado que el estiércol del ganado vacuno tratado puede afectar negativamente tanto en ambientes superficiales como subterráneos).

15 Las composiciones estériles de la invención se pueden administrar por rutas subcutáneas o intramusculares. En casos típicos el sitio de administración es la cola o el cuello del animal objetivo, aunque se pueden utilizar otros sitios. Se debe tener en cuenta que un sitio debe ser utilizado de tal manera que una reacción adversa no impida la capacidad del animal para moverse, comer, beber, etc.

20 Como se señaló anteriormente, las vacunas en este documento, por lo general en una condición libre de endotoxina, utilizando los nuevos adyuvantes descritos en este documento, proveen una mejora significativa en la producción de carne y leche de vaca lecheras, ganado vacuno, cerdos, etc. Estos tratamientos, sin embargo, no se logran mediante un aumento en el consumo de alimentos.

## 25 EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos se proveen solamente para fines ilustrativos y no tienen la intención de limitar el alcance de la invención.

### **Ejemplo 1: Construcción de Proteína de Fusión de Somatostatina deficiente en CAT**

30 El presente ejemplo ilustra la producción de una proteína de fusión de somatostatina deficiente en CAT. La mutagénesis dirigida al sitio se realizó sobre el plásmido pET30b-Cat-Som para reemplazar His192 y His193 con residuos de glicina (después de la modificación: Gly192 y Gly193). La inactivación de los residuos His193 (y His 192) elimina la capacidad de la enzima CAT para aceptar protones, proporcionando así la inactivación completa de la CAT.

35 El espaciador en el mismo pET30b-Cat-Som (que tiene los reemplazo(s) His) fue codón-optimizado para la expresión por E. coli en la ausencia de moléculas de ARNt co-expresadas.

La construcción del ácido nucleico de somatostatina deficiente en CAT modificada se muestra como SEQ ID NO: 12. La secuencia de la proteína de fusión de somatostatina deficiente en CAT se revela como SEQ ID NO: 13, que se compara con una proteína de fusión de somatostatina-CAT sin modificar (SEQ ID NO: 14).

### **Ejemplo 2: Proteína de Fusión de Somatostatina deficiente en CAT Se Puede Expresar a Niveles Altos**

40 La construcción de somatostatina deficiente en CAT codón-optimizada como se describe en el Ejemplo 1, se utilizó para expresar la proteína de fusión en las células BL21 (DE3). Las células transformadas se cultivaron en LB y se indujeron con IPTG 0.4 mM, durante aproximadamente tres horas. Un mililitro de células a una densidad de OD 0.7 cultivo fueron peletizadas, y se calentaron a 70°C, durante diez minutos en 100µl de solución reguladora de muestra SDS. Se cargó una muestra de 40µl de extracto celular por carril para SDS PAGE.

45 Como se muestra en la Figura 2, una banda de 28 KD correspondiente al tamaño previsto de una proteína de fusión de somatostatina deficiente en CAT codón-optimizada, fue visible en los carriles 1 (LB + IPTG, reducido) y 3 (LB + IPTG) después de la inducción con IPTG. Ninguna expresión se ve en los carriles control 2 (LB, reducido) y 4 (LB). Como era de esperar, no hubo diferencia en el tamaño de proteína de fusión cuando se realiza bajo condiciones estándar o de reducción.

**Ejemplo 3: Vacuna que contiene somatostatina deficiente en CAT codón optimizada, libre de endotoxina**

Una vacuna ilustrativa de acuerdo con la presente invención:

- |    |  |                   |
|----|--|-------------------|
| a. | JH 14 (Adyuvante)  | 24 ml             |
|    | aceite mineral - 50% (v/v)   |                   |
|    | Tween 80 - 0.1694% (v/v)   |                   |
|    | Span 85 - 0.1915% (v/v)  |                   |
|    | Carbopol 974NP - 0.125% (w/v)                                      |                   |
| b. | Proteína de Replegado de la invención (2.96 mg/ml) - ver Ejemplo 2 | 95.6 ml           |
| c. | Solución Salina Estandarizada con Fosfato                          | 35.6 ml           |
| d. | Antibacteriano/Antifúngico   | 0.36 mo<br>120 ml |

**Ejemplo 4: Adyuvantes/Péptidos Libres de Endotoxinas Proveen una Mayor Producción de Leche**

5 Se identificó un grupo aleatorio de vacas lecheras (Holstein Crosses – criadas y reproducidas en US), cada uno era 31 a 65 días post-parto (3 a 5 de lactancia). Cada vaca se examinó y se determinó que tenía una salud óptima por un veterinario.

10 El peso medio de la vaca en el estudio fue de aproximadamente 1,000 a 1,200 lbs. Seis vacas lactantes se trataron con 1.96 mg/ proteína quimérica/2 ml de dosis en JH14. De forma alternativa, a 9 vacas lactantes se les administró un tratamiento convencional con rBST. Los tratamientos y el estudio de producción de leche se realizaron a gran escala, la producción intensa de leche.

Las vacunaciones se llevaron a cabo en el día 0. Los niveles en suero de anticuerpos anti-SST y de IGF-1 en suero se probaron a las 4 semanas, la producción de la leche y la identificación de la salud general de animales se llevaron a cabo en un horario regular.

15 Seis vacas que fueron vacunadas con las composiciones de la invención descritas en este documento tuvieron una apariencia normal, sin reacción de endotoxina o retirada de alimentos. Las seis vacas tuvieron una respuesta serológica positiva al SST con un título medio de 1: 14. La producción de la leche de las seis vacas se obtuvo con una sola vacunación (ver Fig. 3A), mostrando un incremento medio de la producción del 23.7%.

Nueve vacas tratadas utilizando inyecciones de rBST convencionales a los 0 y 14 días con un incremento medio total en productividad de leche del 2% (ver Fig. 3B).

20 Los datos en este Ejemplo muestran la drástica mejora en efectividad para el uso de las construcciones libres de endotoxina en combinación con los adyuvantes de la invención en vacas lecheras. Estos resultados se mejoran dramáticamente para la productividad y salud de los animales en comparación con las vacas rechazadas dos veces con rBST.

25 **Ejemplo 5: Adyuvantes/Péptidos Libres de Endotoxinas Proporcionan una mayor Producción de la Carne en Cerditos de Cerdas Tratadas**

30 Un grupo aleatorio de cerdas será identificado, siendo cada uno al menos 35-36 días antes del parto. Cada cerdo será examinado y se determina por tener una salud óptima por un veterinario. Las cerdas gestantes serán inmunizadas dos veces con las vacunas de la invención (ver Ejemplo 3), una vez a los 35-36 días antes de la administración, y una vez a los 8 días antes de la administración. Un grupo control de cerdas gestantes se mantendrán para propósitos de comparación (sin vacunación o vacunación con solución salina estéril).

35 Los cerditos administrados del grupo vacunado tendrán mayor capacidad de supervivencia y serán de un tamaño medio mayor. Es el aumento en tamaño del cerdito que mejora el porcentaje de supervivencia, como cerditos más grandes son menos probables a ser empujados lejos de las tetillas de la cerda. Los cerditos control y tratados serán pesados en el día 21, día 30 y día 75. Las vacunaciones de la presente invención aumentarán el peso diario del cerdito por una media de 35 % en el transcurso del periodo de 75 días.

Es importante destacar que, la supervivencia y peso del cerdito se aumentan a través del uso de las vacunas de la presente invención en la ausencia de hormona de crecimiento recombinante. Esto es una mejora significativa sobre la terapia de hormona recombinante.

**Ejemplo 6: Adyuvantes/Péptido Quimérico Libre de Endotoxina Proporcionan una Mayor Producción de Carne en Terneros Tratados**

Un grupo aleatorio de terneros, uno a tres meses de edad, será identificado, y se inyectó con las composiciones de la invención. Un aumento de peso durante un periodo de aproximadamente diez meses serán monitoreados y comparados con un grupo control, el grupo control que se trata igual en todos los sentidos como el grupo inyectado excepto para las inyecciones de la vacuna de la invención. Cada ternero será examinado y determinado por tener una salud óptima por un veterinario en el transcurso de los tratamientos.

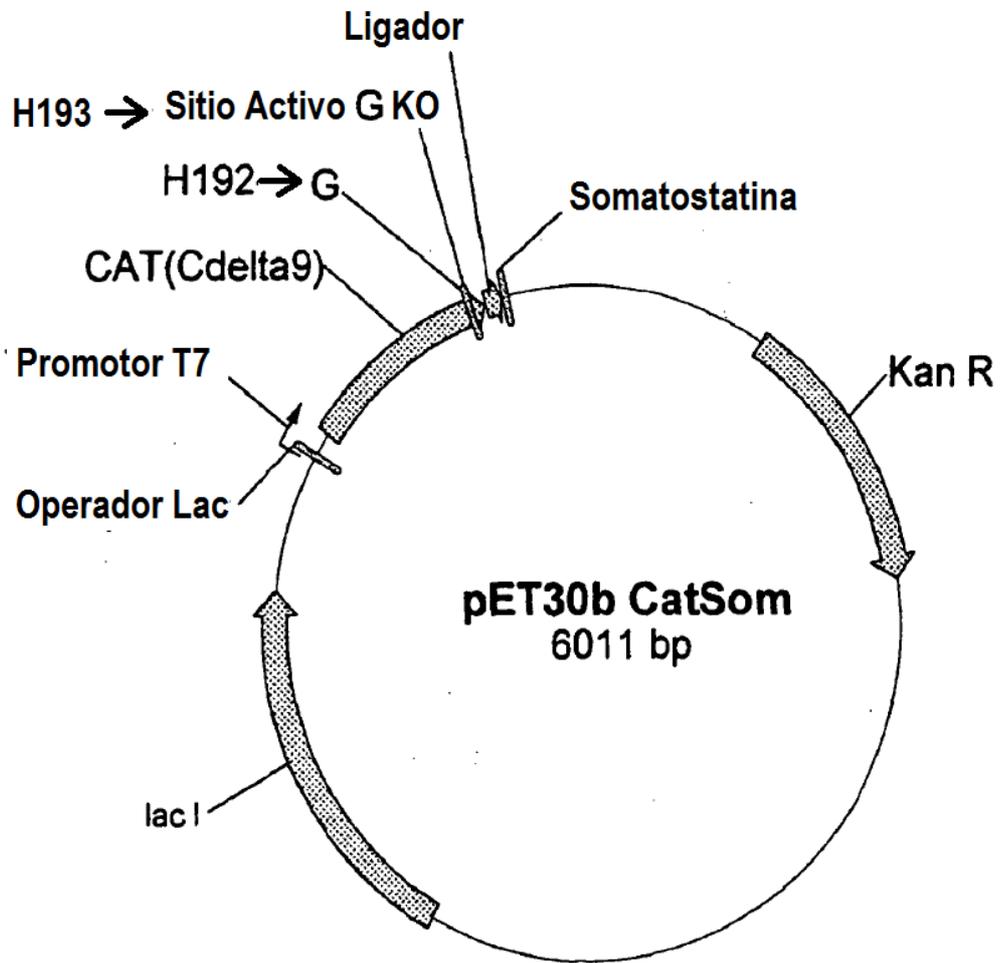
En este documento, las inyecciones para el grupo vacunado se realizan en la semana cero, las semanas 4 y 8 (tres vacunaciones totales). Las vacunaciones serán administradas por vía subcutánea o intramuscular en el cuello utilizando aguja de calibre 18-21 cc. También se administraron inyecciones de refuerzo (4 refuerzos, tres refuerzos o ningún refuerzo). Las inyecciones de vacunación incluyeron 2 mg/2ml del polipéptido quimérico. El polipéptido quimérico se preparó como se describe en este documento teniendo ambos residuos de histidina en CAT reemplazados con los aminoácidos glicina de la invención y un ligador optimizado como se describe por SEQ ID NO: 3.

Para registrar el peso inicial, se pesaron cada uno de los terneros vacunados y los terneros control. Se espera que los animales vacunados en este documento muestran un aumento del 15 al 40% en peso sobre los animales control. Este aumento en el peso medio de los terneros tratados muestra una ventaja significativa sobre los no tratados.

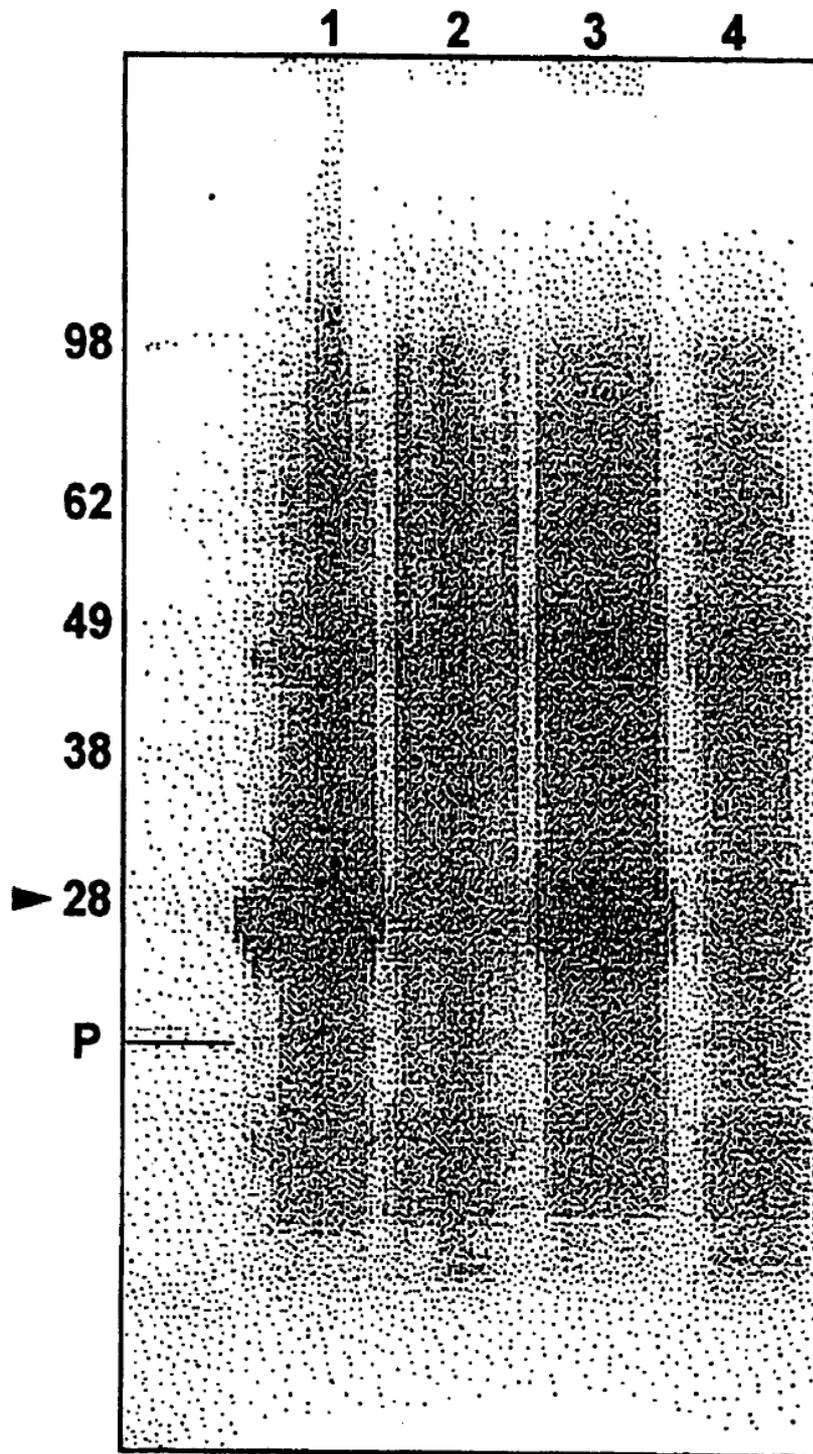
Es importante destacar que, la carne obtenida de los terneros tratados no contiene la hormona de crecimiento recombinante.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un polipéptido quimérico que tiene la inmunogenicidad de la somatostatina, que comprende: una secuencia de aminoácido de la somatostatina-14 ligada a un polipéptido de cloranfenicol acetiltransferasa truncado y sustancialmente inactivo en donde la somatostatina-14 se liga a la cloranfenicol acetiltransferasa inactiva mediante un espaciador, en donde la cloranfenicol inactiva tiene al menos 193 residuos de histidina reemplazados con una alanina, glicina u otro aminoácido de este tipo.
2. El polipéptido quimérico de la reivindicación 1, en donde el espaciador tiene una secuencia de aminoácido de SEQ ID NO: 10 o SEQ ID NO: 11.
- 10 3. El polipéptido quimérico de la reivindicación 1, en donde el polipéptido de cloranfenicol acetil transferasa truncado y sustancialmente inactivo tiene una secuencia de aminoácido de SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO 8.
4. El polipéptido quimérico de la reivindicación 1, que tiene una secuencia de aminoácido con al menos 99% de identidad de la secuencia con la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO: 13.
5. El polipéptido quimérico de la reivindicación 1, que tiene una secuencia de aminoácido de SEQ ID NO: 13.
- 15 6. Una composición inmunogénica que comprende el polipéptido quimérico de la reivindicación 1, junto con un adyuvante farmacéuticamente apropiado en una cantidad efectiva para provocar una respuesta inmune.
- 20 7. Una composición inmunogénica, que comprende el polipéptido quimérico de la reivindicación 1, junto con un adyuvante en donde el adyuvante comprende una emulsión aceite-en-agua mezclada con una premezcla de emulsión en donde la emulsión aceite-en-agua comprende un aceite mineral, Tween 80, Span 85 y uno o más polímeros y en donde la premezcla de emulsión comprende un polímero de alto peso molecular, un agente tensoactivo y un emulsificante en una base oleosa acuosa.
8. Un método no-terapéutico para aumentar la producción de leche en vacas lecheras, que comprende:  
vacunar una vaca lechera con una o más dosis de la composición de la reivindicación 6; y  
dejar por lo menos diez días, durante los cuales la producción de leche de las vacas lecheras aumentará en comparación con la misma producción de leche de vaca en la ausencia de la vacunación.
- 25 9. El método de la reivindicación 8, en donde la vaca lechera se vacuna con solo una dosis de la composición de la reivindicación 6.
10. Un método no-terapéutico para aumentar la producción de leche en vacas lecheras que comprende:  
vacunar una vaca lechera con una o más dosis de la composición de la reivindicación 7; y  
dejar por lo menos diez días, durante los cuales la producción de leche de las vacas lecheras aumentará en comparación con la misma producción de leche de vaca en la ausencia de la vacunación.
- 30 11. Un método no-terapéutico para aumentar la producción de carne magra en ganadería de granja, que comprende vacunar la ganadería de granja con la composición de la reivindicación 7.



**Fig. 1**



**Fig. 2**

# Vaca	MY D10	MY D15	Aumento del Rendimiento	% de Aumento
3361	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%
8540	24	25	+ 1 Lbs	4%
Media	<b>29.33</b>	<b>36.33</b>	<b>+7.0 Lbs</b>	<b>23.7%</b>

TRATADO CON  
POLIPEPTIDO QUIMÉRICO

**Fig. 3A**

# Vaca	Pre-Tratamiento (lbs)	Periodo de Post-Tratamiento (lbs Media)	% de 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%
Media	32.4	32.7	2%

**BST**

**Fig. 3B**