



**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ(21)(22) Заявка: **2011100104/15, 25.06.2008**(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
25.06.2008

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: **25.06.2008**(43) Дата публикации заявки: **20.07.2012** Бюл. № 20(45) Опубликовано: **20.12.2013** Бюл. № 35

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: **US 6316004 B1, 13.11.2001. RU 2034457 C1, 10.05.1995. SZCZEPANOWSKI et al. The 120 592 bp IncF plasmid pRSB107 isolated from a sewage-treatment plant encodes nine different antibiotic-resistance determinants, two iron-acquisition systems and other putative virulence-associated functions. Microbiology (Mosc.) 151:1095-1111 (2005). NUCLEOTIDE SEQUENCE.** (см. прод.)

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на национальной фазе: **13.01.2011**(86) Заявка РСТ:
US 2008/068195 (25.06.2008)(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2009/157926 (30.12.2009)

Адрес для переписки:

105082, Москва, Спартаковский пер., 2, стр. 1, секция 1, этаж 3, "ЕВРОМАРКПАТ"

(72) Автор(ы):

**МЕНДЕЛСОН Эндрыю Р. (US),
ХАФФЕР Кейт Н. (US),
ЛАРРИК Джеймс (US)**

(73) Патентообладатель(и):

БРААШ БИОТЕХ ЛЛК (US)**(54) СЛИТЫЙ БЕЛОК ДЕФЕКТНАЯ ХЛОРАМФЕНИКОЛ АЦЕТИЛТРАНСФЕРАЗА (САТ)-СОМАТОСТАТИН И ЕГО ПРИМЕНЕНИЯ**

(57) Реферат:

Группа изобретений раскрывает химерные полипептиды, иммуногенные композиции на их основе, а также способы повышения продукции молока и постного мяса, включающие вакцинацию указанными пептидами. Химерные полипептиды обладают иммуногенностью соматостатина и включают аминокислотную последовательность соматостатина-14, связанную с существенно неактивным и

укороченным полипептидом хлорамфеникол ацетилтрансферазы, где соматостатин-14 является связанным с неактивной хлорамфеникол ацетилтрансферазой с помощью спейсера. Данные пептиды обладают улучшенной иммуногенностью, что позволяет применять их в меньших дозах при лечении коров и сельскохозяйственных животных. 8 н. и 3 з.п. ф-лы, 4 ил., 6 пр.

(56) (продолжение):

SZCZEPANOWSKI et al. The 120 592 bp IncF plasmid pRSB107 isolated from a sewage-treatment plant encodes nine different antibiotic-resistance determinants, two iron-acquisition systems and other putative virulence-associated functions. Microbiology (Mosc.) 151:1095-1111 (2005). NUCLEOTIDE SEQUENCE. Vallenet D. et al., Comparative analysis of Acinetobacters: three genomes for three lifestyles. PLoS ONE 3:E1805-E1805 (2008). NUCLEOTIDE SEQUENCE. LEWENDON A. and SHAW W.V. The PKa of the catalytic histidine residue of chloramphenicol acetyltransferase, Biochem. J. (1993) 290, pp.15-19.

R U 2 5 0 1 5 6 5 C 2

R U 2 5 0 1 5 6 5 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21)(22) Application: **2011100104/15, 25.06.2008**

(24) Effective date for property rights:
25.06.2008

Priority:

(22) Date of filing: **25.06.2008**

(43) Application published: **20.07.2012 Bull. 20**

(45) Date of publication: **20.12.2013 Bull. 35**

(85) Commencement of national phase: **13.01.2011**

(86) PCT application:
US 2008/068195 (25.06.2008)

(87) PCT publication:
WO 2009/157926 (30.12.2009)

Mail address:

**105082, Moskva, Spartakovskij per., 2, str. 1,
sektcija 1, ehtazh 3, "EVROMARKPAT"**

(72) Inventor(s):

**MENDELSON Ehndr'ju R. (US),
KhAFFER Kejt N. (US),
LARRIK Dzhejms (US)**

(73) Proprietor(s):

BRAASh BIOTEKh LLK (US)

(54) CHLORAMPHENICOL ACETYL TRANSFERASE (CAT) DEFECTIVE SOMATOSTATIN FUSED PROTEIN AND USING IT

(57) Abstract:

FIELD: medicine, pharmaceuticals.

SUBSTANCE: group of inventions discloses chimeric polypeptides, based immunogenic compositions, as well as methods for increasing milk and lean meat production involving vaccination with the above peptides. The chimeric polypeptides possess the immunogenicity of somatostatin and comprise an amino acid sequence of somatostatin-14

related to an inactive and shortened polypeptide of chloramphenicol acetyl transferase wherein somatostatin-14 is bound to inactive chloramphenicol acetyl transferase by means of a spacer.

EFFECT: given peptides possess better immunogenicity that enables using them in smaller doses in treating cows and farm animals.

11 cl, 4 dwg, 6 ex

Область техники

Настоящее изобретение относится к химерным полипептидам на основе соматостатина, полинуклеотидам, которые используются для кодирования этих полипептидов, средствам для изоляции и получения таких полипептидов и к их
 5 применению. Настоящее изобретение также относится к новым адъювантам и композициям для иммунизации, предназначенным для повышения иммуногенности, например, к химерным полипептидам на основе соматостатина в соответствии с изобретением, а также к другим подобным антигенам.

Предпосылки создания изобретения

Соматостатин (также известный как фактор, тормозящий выделение гормона роста или ГНН) представляет собой пептидный гормон, который вырабатывается в гипоталамусе, а также и в некоторых органах пищеварительной системы.

Соматостатин в общем случае является вовлеченным в регуляцию эндокринной системы путем взаимодействия со слитыми с G-белком рецепторами соматостатина. Этот сигнальный каскад на основе соматостатина приводит к возникновению ряда
 15 воздействий, которые распространяются в организме.

В соответствии с аспектами настоящего изобретения соматостатин является известным как такой, который ингибирует высвобождение гормона роста и тиреотропного гормона из передней доли гипофиза. (Patel YC и Srikant CB, Somatostatin and its receptors Adv Mol Cell Endocrinol, 1999. 3 43-73). Другие гормоны, которые ингибируются с помощью соматостатина, включают инсулин, глюкагон, секретин, гастрин, пепсин, малетин и тому подобные. (Patel YC и Srikant CB Somatostatin and its
 25 receptors Adv Mol Cell Endocrinol, 1999. 3 43-73). Способность соматостатина регулировать достаточно большое количество факторов/гормонов, необходимых для роста и усвоения пищи, сделало соматостатин центральной мишенью для контроля роста животных в области животноводства, то есть, ингибирование соматостатина приводит к получению повышенных уровней гормона роста, который присутствует у
 30 животного, представляющего интерес, и, таким образом, приводит к получению животных с повышенной способностью к выработке молока, для обеспечения больших количеств мяса и т.п.

В частности, иммунизация животных соматостатином была признанной в качестве средства для нейтрализации соматостатина у животного, представляющего интерес, и удаляет, таким образом, нормальное ингибиторное влияние соматостатина на различные аспекты продуктивности животных, например, выработку молока у коров молочных пород. Reichlin S., ред., 1987, Somatostatin, Basic and Clinical Status, Plenum
 40 Press, New York (стр.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. Является важным, что такие процедуры иммунизации на основе соматостатина позволяют избежать непосредственного воздействия анаболических гормонов, например, гормона роста и подобных ему у животного и дают возможность
 45 осуществлять незначительные изменения концентрации эндогенных анаболических факторов и, таким образом, обеспечивают получение экологически чистых продуктов.

Соматостатин является известным как такой, который обладает коротким периодом полураспада в крови. Для того чтобы повысить иммунологические эффекты соматостатина, были усовершенствованы прописи для иммунизации с целью
 50 увеличения периода полураспада белков путем конъюгации соматостатина с целевыми белками носителями. Такие конъюгированные белки соматостатина были сконструированы для того, чтобы обеспечить более высокие значения периода

полураспада и повышенную антигенность в крови, и таким образом, имеют повышенную выгоду (в частности, в отношении затрат на получение соматостатина). Например, химерные белки соматостатина раскрываются в патенте США №6,316,004 (и соответствующем европейском патенте EP 0645454), где различные конъюгированные белки, содержащие соматостатин, были продемонстрированы как такие, которые обладают повышенной иммуногенностью и функцией в отношении продуктивности сельскохозяйственных животных по сравнению с другими традиционными процедурами иммунизации или процедурами, которые основываются на введении анаболического гормона.

Однако для улучшения общей продуктивности и временного охвата в области животноводства являются необходимыми композиции с более низкой дозой, а также процедуры для иммунизации, обеспечивающие более высокую антигенность. Настоящее изобретение является направленным на обеспечение таких более антигенных и функционально активных соединений, композиций и процедур для иммунизации на основе соматостатина.

С этой целью и обеспечивается настоящее раскрытие.

Краткое изложение сущности изобретения

Настоящее изобретение обеспечивает новые полипептиды и полинуклеотиды, которые их кодируют, обладающие улучшенной иммуногенностью соматостатина. Полипептиды в соответствии с изобретением включают соматостатин-14, слитый с существенно инактивированным белком хлорамфеникол ацетилтрансферазы посредством функционально оптимизированного линкера. Химерные полипептиды в соответствии с изобретением обеспечивают высокоэффективные и недорогие материалы для применения в области животноводства, как описывается более подробно ниже. Воплощения в соответствии с изобретением включают последовательности аминокислот и последовательности нуклеиновой кислоты, как определено в SEQ ID NO: 1-14.

Настоящее изобретение также обеспечивает процедуры получения и очистки для создания химерных полипептидов в соответствии с изобретением в свободном от эндотоксина и высокофункциональном состоянии. Свободные от эндотоксина полипептиды обеспечивают существенное и неожиданное преимущество для применения у некоторых животных, представляющих интерес, где незначительные количества эндотоксина, которые типично предполагаются как благоприятные для стимуляции иммунного ответа, фактически приводят к значительному функциональному недостатку. Это, в частности, касается случая, когда полипептиды в соответствии с изобретением используются для иммунизации при выведении и выращивании коров молочных пород в США. Кроме того, поскольку химерные полипептиды в соответствии с изобретением демонстрируют улучшенную функцию по сравнению с традиционными материалами, более низкие дозы и меньшее их количество используются для иммунизации животных, которые представляют интерес. Такое снижение требуемых количеств также обеспечивает получаемое в результате снижение уровня эндотоксина в вакцинах в соответствии с изобретением. Комбинация изоляции в свободном от эндотоксина состоянии и используемых меньших количеств химерных полипептидов в соответствии с изобретением позволяет использовать в данной заявке существенно свободные от эндотоксина вакцины.

Изобретение также обеспечивает адъювантные композиции, обладающие улучшенной функцией и безопасностью по сравнению с традиционными адъювантными материалами. Адъюванты, описанные в данной заявке, не содержат

материалов, имеющих происхождение от животных, и являются свободными от большинства известных химических канцерогенов, например, бензола и других подобных материалов. Адъювантные композиции, описанные в данной заявке, подтвердили свою пригодность как неожиданно эффективные при стимуляции

иммунного ответа, когда являются соединенными с целевыми антигенами. Изобретение также обеспечивает вакцины, содержащие химерные полипептиды в соответствии с изобретением в сочетании с адъювантными композициями в соответствии с изобретением. Вакцины, описанные в данной заявке, используются для индукции иммунного ответа у вакцинированных млекопитающих и птиц, например, у сельскохозяйственных животных, которые представляют интерес. Типичные сельскохозяйственные животные для применения в данной заявке включают: коров молочных пород, свиней, овец, коз, индюков, кролей и телят. В некоторых аспектах полипептиды в соответствии с изобретением получают и очищают с низким содержанием или при отсутствии ассоциированного эндотоксина. Эти вакцины были оптимизированными для того, чтобы стимулировать безопасные и улучшенные иммуногенные реакции у животного, представляющего интерес.

Изобретение также включает способы вакцинации животных, которые представляют интерес, а также птиц, при использовании вакцин в соответствии с изобретением. Типичные способы обеспечиваются для вакцинации коров молочных пород для повышения продукции молока безопасным (как для животного, так и для конечного пользователя), эффективным с точки зрения материальных затрат и пригодным способом. Другие типичные способы включают вакцинацию поросят, овец, индюков, коз, кролей или телят для повышения продукции мяса (и, в частности, нежирного мяса) у животного, представляющего интерес, безопасным и эффективным с точки зрения материальных затрат способом.

Эти и различные другие характеристики и преимущества в соответствии с изобретением будут понятными из приведенного ниже подробного описания и обзора приложенных пунктов формулы

Краткое описание фигур

Фигура 1 представляет собой схематическую иллюстрацию pET30b CatSom плазмиды в соответствии с воплощением настоящего изобретения. Плаزمида включает маркер устойчивости к канамицину, Lac оператор, T7 промотор, кодирующую последовательность CAT, все в соответствии с воплощениями изобретения, также являются включенными линкерный участок в соответствии с изобретением и кодирующий участок соматостатина в соответствии с изобретением.

Фигура 2 представляет собой иллюстрацию окрашенного SDS-ПАГЭ, демонстрирующего полосу 28 кДа, соответствующую спрогнозированному размеру оптимизированного по кодам, полипептида на основе дефектной CAT и соматостатина в соответствии с изобретением. Дорожка 1 представляет собой LB + IPTG, восстанавливающий. Дорожка 2 представляет собой LB, восстанавливающий, Дорожка 3 представляет собой LB + IPTG и Дорожка 4 представляет собой LB.

Фигуры 3А и 3В представляют собой таблицы, демонстрирующие продукцию молока в литрах в сутки у вакцинированного (при использовании вакцины, как описано в Примерах) и у контрольного молочного скота (BSY). Каждая корова имеет специфический идентификационный номер, как представлено в каждой таблице.

Идентификация последовательностей и идентификаторы последовательностей
 SEQ ID NO: 1 AGCKNFFWKFTFTSC
 SEQ ID NO 1a GCTGGCTGCAAGAATTTCTTCTGGAAGACTTTCACA TCCTGT

SEQ ID NO: 2 (His192 → Gly, His 193 → Gly):

Atggagaaaaaatcactggatataccaccgttgatataatcccaatggcatcgtaaagaacattttgaggcatttcagtcagttgctcaat
gtacctataaccagaccgttcagctggatattacggcctttttaagaccgtaaagaaaaataagcacaagttttatccggcctttattcac
5 attcttggccgcctgatgaatgctcatccggaattccgtatggcaatgaaagacggtagctggtagatgggtagtggtcacccttgta
caccgtttccatgagcaaacgaaacgtttcatcgctctggagtgaataccacgacgatttccggcagtttctacacatatattcgcaag
atgtggcgtgttacggtgaaaacctggcctatttccctaaagggttattgagaatatgttttcgtctcagccaatccctgggtgagttcac
10 cagttttgatttaaactggccaatatggacaacttcttgcggccttttaccatgggcaaatattatacgcaaggcgacaaggtgctg
atgccgctggcgattcaggttggtggtgccgtttgtgatggcttccatgtcggccgtatgcttaataactgcagcag

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

Mekkitgyttvdisqwhrkehfeafqsvaqtynqvtqlditafktvknkhkfyfafihiarlmnahpefrmamkdgelviw
dsvhpcyvtvheqtetfsslwseyhddfrqflhiysqdvacygenlayfpgkfienmffvsanpwvsfslnvanmdnffapv
ftmgkyytqgdkvlmplaiqvvgavcdgfhvgrmlnelqq
20

SEQ ID NO: 4 (His193->Gly)

Atggagaaaaaatcactggatataccaccgttgatataatcccaatggcatcgtaaagaacattttgaggcatttcagtcagttgctcaat
25 gtacctataaccagaccgttcagctggatattacggcctttttaagaccgtaaagaaaaataagcacaagttttatccggcctttattcac
attcttggccgcctgatgaatgctcatccggaattccgtatggcaatgaaagacggtagctggtagatgggtagtggtcacccttgta
caccgtttccatgagcaaacgaaacgtttcatcgctctggagtgaataccacgacgatttccggcagtttctacacatatattcgcaag
atgtggcgtgttacggtgaaaacctggcctatttccctaaagggttattgagaatatgttttcgtctcagccaatccctgggtgagttcac
30 cagttttgatttaaactggccaatatggacaacttcttgcggccttttaccatgggcaaatattatacgcaaggcgacaaggtgctg
atgccgctggcgattcaggttcatgggtgccgtttgtgatggcttccatgtcggccgtatgcttaataactgcagcag

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

Atggagaaaaaatcactggatataccaccgttgatataatcccaatggcatcgtaaagaacattttgaggcatttcagtcagttgctcaat
gtacctataaccagaccgttcagctggatattacggcctttttaagaccgtaaagaaaaataagcacaagttttatccggcctttattcac
40 attcttggccgcctgatgaatgctcatccggaattccgtatggcaatgaaagacggtagctggtagatgggtagtggtcacccttgta
caccgtttccatgagcaaacgaaacgtttcatcgctctggagtgaataccacgacgatttccggcagtttctacacatatattcgcaag
atgtggcgtgttacggtgaaaacctggcctatttccctaaagggttattgagaatatgttttcgtctcagccaatccctgggtgagttcac
45 cagttttgatttaaactggccaatatggacaacttcttgcggccttttaccatgggcaaatattatacgcaaggcgacaaggtgctg
atgccgctggcgattcaggttcatgctgccgtttgtgatggcttccatgtcggccgtatgcttaataactgcagcag

SEQ ID NO:6 (1 His+CAT дикого типа)

Atggagaaaaaatcactggatataccaccgttgatataatcccaatggcatcgtaaagaacattttgaggcatttcagtcagttgctcaat
gtacctataaccagaccgttcagctggatattacggcctttttaagaccgtaaagaaaaataagcacaagttttatccggcctttattcac

attcttccccgcctgatgaatgctcatccggaattccgtatggcaatgaaagacggtagctggtgatatgggatatgttcacccttgta
 caccgtttccatgagcaaaactgaaacgtttcatcgctctggagtgaataccacgacgatttccggcagtttctacacatatattcgcaag
 atgtggcgtgttacggtgaaaacctggcctatttccctaaagggttattgagaatatgttttcgtctcagccaatccctgggtgagttcac
 5 cagttttgatttaaacgtggccaatatggacaacttctcgccccgtttcaccatgggcaaatattatacgcaaggcgacaaggtgctg
 atgccgctggcgattcaggttcatggtgccgtttgtgatggcttccatgtcggcagaatgcttaatgaactgcagcag

10 SEQ ID NO: 7 (один H->G):

Mekkitgyttvdisqwhrkehfeafqsvaqtynqtvql ditaflktvkknkhkfyapafihilarlmnahpefrmamkdgelviw
 dsvhpcytfheqtetfsslwseyhddfrqflhiysqdvacygenlayfpkgfienmffvsanpwvsfstdlnvanmdnffapv
 15 ftmgkyytqgdkvimplaiqvghavcdgfhvgrmlnelqq

SEQ ID NO: 8: (H->A)

20 Mekkitgyttvdisqwhrkehfeafqsvaqtynqtvql ditaflktvkknkhkfyapafihilarlmnahpefrmamkdgelviw
 dsvhpcytfheqtetfsslwseyhddfrqflhiysqdvacygenlayfpkgfienmffvsanpwvsfstdlnvanmdnffapv
 ftmgkyytqgdkvimplaiqvhaavcdgfhvgrmlnelqq

25 SEQ ID NO: 9

tgggaactgcaccgttctgggtccacgcccgcgcctcgcccacgtccggaattcatg

30 SEQ ID NO: 10

welhrsgprprprprpefm

35 SEQ ID NO: 11

welhrsgp(rp)nefm, где $n > 1$

SEQ ID NO: 12

40 Atggagaaaaaatcactggatataccaccgttgatatatccaatggcatcgtaaagaacattttgaggcatttcagtcagttgctcaat
 gtacctataaccagaccgttcagctggatattacggccttttaagaccgtaaagaaaaataagcacaagttttatccggcctttattcac
 attcttccccgcctgatgaatgctcatccggaattccgtatggcaatgaaagacggtagctggtgatatgggatatgttcacccttgta
 45 caccgtttccatgagcaaaactgaaacgtttcatcgctctggagtgaataccacgacgatttccggcagtttctacacatatattcgcaag
 atgtggcgtgttacggtgaaaacctggcctatttccctaaagggttattgagaatatgttttcgtctcagccaatccctgggtgagttcac
 cagttttgatttaaacgtggccaatatggacaacttctcgccccgtttcaccatgggcaaatattatacgcaaggcgacaaggtgctg
 atgccgctggcgattcaggttggtggtgccgtttgtgatggcttccatgtcggcgtatgcttaatgaactgcagcagtggggaactgcac
 50 cgttctgggtccacgcccgcgcctcgcccacgtccggaattcatggcggctgcaagaacttcttttgaaaacctttacgagctgc

SEQ ID NO: 13

mekkitgyttvdisqwhrkehfeafqsvaqtynqtvql ditaflktvkknkhkfy pafihilarlmnahpefrmamkdgelviw
 dsvhpcytfheqtetfsslwseyhddfrqflhiysqdvacygenlayfpkgfienmffvsanpwvsfstdlnvanmdnffapv
 fimgkyytqgdkvlmplaiqvvggavcdgfhvgrmlnelqqwelhrsgprprprprpefmagcknffwktftsc

SEQ ID NO: 14

mekkitgyttvdisqwhrkehfeafqsvaqtynqtvql ditaflktvkknkhkfy pafihilarlmnahpefrmamkdgelviw
 dsvhpcytfheqtetfsslwseyhddfrqflhiysqdvacygenlayfpkgfienmffvsanpwvsfstdlnvanmdnffapv
 fimgkyytqgdkvlmplaiqvhhavcdgfhvgrmlnelqqwelhrsgprprprprpefmagcknffwktftsc

15 Подробное описание изобретения

Воплощения в соответствии с настоящим изобретением обеспечивают химерные полипептиды и конструкции нуклеиновых кислот, которые их кодируют, обладающие улучшенной иммуногенностью соматостатина. Воплощения данной заявки включают способы для получения химерного белка, а также способы применения химерного белка для повышения определенной продуктивности сельскохозяйственных животных, представляющих интерес, и, в частности, для повышения продукции молока у коров молочных пород и продукции мяса у крупного рогатого скота, свиней, овец, кролей, коз, телят и т.д.

25 Воплощения в соответствии с настоящим изобретением также включают новые адъюванты для применения с химерными белками в соответствии с изобретением для повышенной иммуногенности у животных, которые представляют интерес, повышенной безопасности для вакцинированных животных, которые представляют интерес, и улучшенной безопасности для потребителей животных, которые представляют интерес, то есть, потребителей вакцинированного животного или потребителей продукта, полученного от вакцинированного животного.

В одном аспекте изобретение обеспечивает химерный белок соматостатина, сконструированный для повышенной иммуногенности соматостатина. Химерный белок соматостатина воплощения включает аминокислотную последовательность соматостатина-14, связанную с помощью линкерной последовательности с существенно инактивированным укороченным белком хлорамфеникол ацетилтрансферазы (САТ). В некоторых случаях линкер (также в данной заявке упоминается как спейсер) является оптимизированным для улучшения продукции химерного полипептида в целевых хозяйских клетках. В других случаях также обеспечиваются способы получения и изоляции таких повышенных количеств химерного белка в существенно свободном от эндотоксина состоянии.

В другом аспекте изобретение обеспечивает новые адъювантные композиции (которые не содержат каких-либо белков животного происхождения или химических агентов, подобных бензолу) и вакцины, которые содержат химерные белки соматостатина в соответствии с изобретением. Воплощения включают непредвиденно эффективные композиции адъювант/химерный белок соматостатина (типично существенно свободный от эндотоксина), то есть, новые вакцины, композиции для индукции антигенности у вакцинированных сельскохозяйственных животных, которые представляют интерес. В некоторых воплощениях представляющие интерес сельскохозяйственные животные представляют собой коров молочных пород, телят, свиней, коз и т.д. Следует отметить, что поскольку адъюванты в соответствии с

настоящим изобретением являются описанными в комбинации с химерными белками соматостатина в соответствии с настоящей заявкой, предусматривается, что адъюванты в соответствии с настоящим изобретением могут использоваться с другими вакцинами у различных животных, которые представляют интерес, например, у людей, свиней, собак, кошек и т.д.

В других аспектах обеспечиваются способы для вакцинации животных, которые представляют интерес, при использовании в виде нескольких или одной дозы новой вакцины для получения повышенной продуктивности и, в частности, повышенной продукции молока у коров молочных пород и других подобных сельскохозяйственных животных. Эти улучшенные процедуры дозирования (меньшее количество вакцинаций и более низкая концентрация химерного соматостатина) обеспечивают длительную эффективность и снижение затрат, которые при использовании в молочной промышленности представляют значительный прогресс в достижении производительности сельскохозяйственных животных. Кроме того, способы, описанные в данной заявке, позволяют избежать применения терапии на основе рекомбинантного гормона роста, что представляет собой задачу охрану здоровья, то есть, как по отношению к представляющим интерес сельскохозяйственным животным, так и к конечному потребителю и окружающей среды, где выделение рекомбинантного гормона роста осуществляется в грунтовые воды.

Определения

Следующие определения обеспечиваются для того, чтобы способствовать пониманию некоторых терминов, которые часто встречаются в данной заявке и не подразумеваются для ограничения объема настоящего раскрытия.

Термин "аминокислота" относится к любой из двадцати существующих в природе аминокислот, а также к любой модифицированной аминокислотной последовательности. Модификации включать природные процессы, такие, как посттрансляционный процессинг, или могут включать химические модификации, которые являются известными в области техники. Модификации включают, но без ограничения: фосфорилирование, убиквитинизацию, ацетилирование, амидирование, гликозилирование, ковалентное присоединение флавина, АДФ-рибозилирование, перекрестное связывание, иодирование, метилирование и тому подобное.

Термины "химерный полипептид" или "слитый белок" относятся к первому полипептиду, содержащему присоединенный второй, гетерологичный полипептид, так, что первый и второй полипептиды экспрессируются в рамке. Часто два полипептида могут быть соединенными с помощью линкерного или спейсерного сегмента для оптимизации экспрессии и функции химерного(ых) полипептида(ов) в соответствии с изобретением.

Термин "эндотоксин" относится к токсинам, ассоциированным с клеточными стенками грамотрицательных бактерий. В некоторых случаях токсины представляют собой липополисахаридные компоненты бактериальных мембран, компоненты внешней мембраны клеточной стенки грамотрицательных бактерий.

Термин "хозяйская клетка" или "хозяйские клетки" относятся к клеткам, адаптированным к культуре *ex vivo*. Является характерным, что хозяйские клетки, которые обсуждаются в данной заявке, являются способными к экспрессии химерных белков в соответствии с изобретением. Примеры приемлемых хозяйских клеток, полезных в аспектах в соответствии с изобретением, включают, но без ограничения, клетки бактерий, дрожжей, насекомых и млекопитающих. Специфические примеры

таких клеток включают SF9 клетки насекомых (Summers и Smith, 1987, Texas Agriculture Experiment Station Bulletin, стр.1555), клетки E.coli (BL21 (DE3), Novagen), дрожжи (*Pichia pastoris*, Invitrogen) и клетки печени человека (Hep G2 (ATCC HB8065)).

Термин "последовательность нуклеиновой кислоты" относится к порядку последовательности дезоксирибонуклеотидов в цепочке дезоксирибонуклеиновой кислоты. Порядок этих дезоксирибонуклеотидов определяет порядок аминокислот в полипептидной цепи. Последовательность дезоксирибонуклеотидов кодирует аминокислотную последовательность.

Термины "белок", "пептид" и "полипептид" используются попеременно для обозначения аминокислотного полимера или набора двух или более взаимодействующих или связанных аминокислотных полимеров.

Термин "существенно" относится к "большой степени," например, существенно удаленный означает, что по крайней мере, 75%, более типично, по крайней мере, 80%, 85%, 90%, 95% и наиболее типично, 96%, 97%, 98%, 99% целевого материала является удаленным; существенно неактивный означает, что, по крайней мере, 75%, более типично, 80%, 85%, 90%, 95% и наиболее типично, 96% 97%, 98%, 99% фермента является инактивированным. Как таковой термин существенно неактивный САТ фермент представляет собой такой, который обладает 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 96%, 97%, 98%, 99% или 100% удаленной активности. (САТ активность может быть определена при использовании известных функциональных анализов, например, связывания н-бутирил кофермента А с радиоактивно меченным хлорамфениколом и последующее измерение с помощью жидкостно-сцинтилляционного измерения активности (LCS); путем определения количества радиоактивной метки, перенесенной с ¹⁴Сацетил СоА на хлорамфеникол с помощью тонкослойной хроматографии (смотри Molecular Cloning: A Laboratory Model, третье изд., J Sambrook и DW Russell, 2001. Cold Spring Harbor Press) или с помощью других известных или подобных им анализов).

Термин "вектор" используется в отношении молекул нуклеиновой кислоты, которые переносят сегмент(ы) ДНК с одной клетки на другую клетку. Термин "переносчик" иногда используется попеременно с термином "вектор". Два обычных вида векторов представляют собой плазмиды и вирусные векторы.

Соматостатин

Рядом исследований было показано, что животные, иммунизированные с помощью соматостатина, имеют среднее суточное увеличение массы, которое составляет 10-20%, снижение потребности организма в пище 9% и 11% увеличение эффективности усвоения пищи. Животные, иммунизированные с помощью соматостатина, и также их приплод, имеют правильные пропорции, а распределение веса животных между мышцами, костями и жиром является таким же, что и у контрольных животных (смотри Reichlin, 1987). Таким образом, иммунизация с помощью соматостатина обеспечивает полезный и безопасный путь повышения продуктивности животных. Это является особенно важным при сравнении с применением рекомбинантного гормона роста, использование которого поднимает проблему повышенного содержания гормона в молоке или мясе, полученном от обработанных животных, или безопасности для самих животных, или накопления гормона в экосистеме, в частности, водоснабжения с использованием грунтовых вод.

Соматостатин-14 представляет собой биологически активный тетрадекапептид, который вырабатывается гипоталамусом и желудочно-кишечным трактом. Аминокислотная последовательность тетрадекапептида является следующей:

AGCKNFFWKFTSC (SEQ ID NO: 1). Последовательность соматостатина-14

является высококонсервативной среди млекопитающих (Lin XW и др. Evolution of neuroendocrine peptide systems: gonadotropin-releasing hormone and somatostatin. Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol. 1998 119(3): 375-88.) Тетрадекапептид кодируется последовательностью нуклеиновой

кислоты GCTGGCTGCAAGAATTTCTTCTGGAAGACTTTCACATCCTGT (SEQ ID NO: 1a) (следует отметить, что могут использоваться другие последовательности нуклеиновой кислоты для кодирования SEQ ID NO: 1, однако, SEQ ID NO: 1a обеспечивается с целью иллюстрации).

Соматостатин-14 является известным как такой, который обладает сильным ингибиторным эффектом на большое количество гормонов, вовлеченных в рост и усвоение пищи у животных. Как было описано ранее в патенте США №6,316,004 (введен в данную заявку в качестве ссылки для всех целей), соматостатин-14 и химерные варианты соматостатина могут использоваться в иммунизации животных для повышения суточной прибавки веса, а там, где это является применимым, продукции молока. Такие процедуры иммунизации осуществляют с традиционными адъювантами и не применяют материалы на основе соматостатина в соответствии с изобретением. Следует отметить, что обработка животных, которые представляют интерес, с помощью антител к соматостатину зарекомендовала себя как излишне дорогая и функционально не эффективная, что, таким образом, исключило непосредственную обработку с помощью антител как непрактичную. Muromtsev G.S., и др., 1990, Basics of agricultural biotechnology, Agropromizdat, Moscow, стр.102-106. Один аспект в соответствии с настоящим изобретением основывается на идее, что антитела к соматостатину, сформированные при использовании композиции и способов, описанных в данной заявке, аттенуируют, но полностью не устраняют в основном ингибирующее действие соматостатина у животных, представляющих интерес. Этот процесс обеспечивает естественное и пропорциональное увеличение роста и продуктивности у иммунизированных животных, которые представляют интерес.

Как таковые аспекты в соответствии с настоящим изобретением способствуют иммунизации на основе соматостатина путем обеспечения высокоиммуногенных материалов для применения при иммунизации животных, которые представляют интерес. Такие соединения для иммунизации на основе соматостатина были оптимизированы для экспрессии и антигенности. В некоторых воплощениях соматостатин-14 экспрессируется в виде оптимизированного по кодам химерного полипептида дефектная САТ - соматостатин. Эти материалы обеспечивают неожиданное улучшение по сравнению с другими вакцинами для иммунизации.

Новые оптимизированные по кодам конструкции дефектная САТ - соматостатин
Один аспект в соответствии с изобретением обеспечивает изолированные молекулы нуклеиновой кислоты, которые кодируют химерные белки, обладающие оптимизированной иммуногенной активностью соматостатина. В частности, воплощения в соответствии с изобретением включают новые конструкции нуклеиновых кислот, которые кодируют САТ слитые белки, обладающие иммуногенной активностью по отношению к соматостатину. Такие полипептиды были идентифицированы для оптимальной функциональной активности в процедурах иммунизации.

В одном воплощении конструкция, которая схематически представлена на Фигуре 1, обеспечивается для кодирования химерных полипептидов в соответствии с изобретением. Конструкции нуклеиновых кислот в соответствии с изобретением в общем случае кодируют неактивный САТ фермент без 10 С-терминальных

аминокислот и включают одну или две аминокислоты, заменяющие гистидин.

Существенная инактивация САТ дает возможность устранить вредные реакции на САТ у инъектируемого животного, представляющего интерес (и, таким образом, устранить резистентность к САТ). Следует отметить, что хлорамфеникол представляет собой

5 традиционно используемый антибиотик в животноводстве, и устойчивость к хлорамфениколу у крупного рогатого скота будет вредной для безопасности вакцинированных животных при использовании материалов в соответствии с изобретением. Как таковые конструкции, содержащие инактивированную САТ,

10 обладают иммуногенностью САТ при отсутствии вредных побочных эффектов развития устойчивости у вакцинированных животных (проблематичный вопрос безопасности для животных).

Фермент САТ подвергают инактивации путем удаления группы имидазола His193 (His195 в каноническом САТ_{III} варианте, смотри Lewendon и др., ниже). В другом

15 воплощении фермент САТ инактивируют путем удаления групп имидазола как His193, так и соседнего His192 (соответственно, His195 и His194 для САТ_{III}). Удаление существенной для His193 (His195 в САТ_{III}) группы имидазола из активного сайта САТ и замена его аланином, глицином или другими подобными аминокислотами приводит

20 к существенной инактивации САТ фермента (Lewendon A и др. (1994). Replacement of catalytic histidine-195 of chloramphenicol acetyl transferase: evidence for a general base role for glutamate. Biochemistry. 33(7): 1944-50.). В заключение, воплощения данной заявки могут также включать инактивацию САТ фермента путем удаления только группы имидазола His192 (His 194 для САТ_{III}). Что касается His193, то замена может

25 осуществляться с помощью аланина, глицина и других подобных аминокислот. В некоторых аспектах одна или более замененных аминокислот гистидна кодируются нуклеиновыми кислотами, которые размещаются в положениях 574-576 и 577-579 последовательности SEQ ID NO: 2 (соответствует номерам аминокислот 192 и 193 в

30 последовательности SEQ ID NO: 3). В некоторых воплощениях последовательности нуклеиновой кислоты в соответствии с изобретением включают SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6. Химерные белки в соответствии с изобретением, которые включают конструкции с замещенным гистидином, описанные в данной заявке,

35 обеспечивают высокоиммуногенные белки с небольшой или с отсутствующей САТ активностью, значительное усовершенствование по сравнению с существующим уровнем техники. Существенно инактивированный САТ фермент воплощения присоединяют к полипептиду соматостатина в соответствии с изобретением. Такое присоединение может осуществляться непосредственно или с помощью линкера (как

40 более полно описано ниже).

Инактивация целевых сайтов (His192 и/или His193) может быть выполнена при использовании любого количества известных квалифицированному специалисту в данной области техники процедур, включая сайт-направленный мутагенез и

45 соединение синтетических генов. В одном воплощении последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует гистидин в положении 193, модифицируют для кодирования аланина, глицина или других подобных аминокислот. В другом воплощении последовательности нуклеиновой кислоты, которая кодирует гистидин в

50 положении 192, модифицируют для кодирования аланина, глицина или других подобных аминокислот. Типичная комбинация замен для положений 192 и 193 химерного полипептида включает: аланин, аланин; аланин, глицин; глицин, аланин; и глицин, глицин.

Воплощения в соответствии с настоящим изобретением также включают

аминокислотные последовательности для дефектных по САТ полипептидов в соответствии с изобретением, включая аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 7, 8 и 3 (соответствует his → gly в положении 193, his → ala в положении 193, и his → gly в положениях 192 и 193).

Как показано на Фигуре 1, существенно неактивный фермент САТ может связываться с соматостатином-14 с помощью спейсера различной длины. Спейсер является необходимым для обеспечения презентации кодированного соматостатина на общей поверхности. Воплощения спейсера данной заявки обеспечивают для оптимальной резистентности к протеазам и для оптимальной демонстрации эпитопов, их включения в химерные полипептиды в соответствии с изобретением продемонстрировали неожиданное улучшение по сравнению с конструкциями, содержащими линкерную(ые) последовательность(и) настоящего изобретения.

Воплощения спейсера, таким образом, были оптимизированы по длине и составу для обеспечения экспрессии дефектной САТ - соматостатина в различных микроорганизмах, и, в частности, в E.coli. Оригинальные конструкции, как описывается в патенте США №6,316,004, включают спейсер, содержащий редкие кодоны E.coli, и требуют для коэкспрессии редких тРНК из второй или хелперной плазмиды. Воплощения спейсера, описанные в данной заявке, удаляют эти редкие кодоны E.coli и, таким образом, удаляют необходимость во второй хелперной плазмиде, что представляет собой усовершенствование по сравнению с предыдущей технологией.

В типичном воплощении спейсер имеет последовательность нуклеиновой кислоты tgggaactgcaccgttctgtgccacgcccgcgccctcgccacgtccggaattcatg (SEQ ID NO: 9). Один пример спейсера в соответствии с изобретением имеет аминокислотную последовательность welhrsgprprprprpfe_m (SEQ ID NO: 10). Типичная аминокислотная последовательность для спейсера в соответствии с изобретением представляет собой welhrsgp(rp)_nef_m, где n>1 (SEQ ID NO: 11). Как отмечалось выше, такие новые спейсерные последовательности обеспечивают улучшенную резистентность к протеазам (тем самым позволяя повысить продукцию по сравнению с конструкциями, раскрытыми в патенте США №6,316,004), и обеспечивают оптимальное воздействие соматостатина-14. Комбинация соматостатина-14, присоединенного к существенно инактивированному ферменту САТ (конструкции, замещенные гистидином) с помощью линкеров с оптимальной конфигурацией, которые демонстрируют неожиданное и удивительное усовершенствование по сравнению с другими традиционными материалами, при использовании для иммунизации животных, которые представляют интерес, с целью достижения улучшенной продуктивности.

Хотя и не такие, которые являются оптимальными по своей функции, но другие линкерные последовательности переменной длины могут использоваться для соединения соматостатина-14 с существенно инактивированным ферментом САТ. Кроме того, является очевидным, что непосредственное слияние соматостатина-14 с существенно инактивированным ферментом САТ может также использоваться в данной заявке и рассматривается как такое, которое входит в объем настоящего изобретения.

Векторы и хозяйские клетки

Настоящее изобретение также относится к векторам, включающим полинуклеотидные молекулы в соответствии с изобретением, а также к хозяйским клеткам, трансформированным с помощью таких векторов. Любая из полинуклеотидных молекул в соответствии с изобретением может присоединяться к

вектору, который обычно включает селективный маркер и источник репликации, для размножения хозяина, который представляет интерес. Хозяйские клетки являются генетически сконструированными для включения этих векторов и, таким образом, экспрессируют полипептиды в соответствии с изобретением. В общем случае, векторы, описанные в данной заявке, включают полинуклеотидные молекулы в соответствии с изобретением, оперативно связанные с приемлемыми последовательностями для регуляции транскрипции или трансляции, такими, как те, что используются в микробных хозяйских клетках или вирусах. Примеры регуляторных последовательностей включают транскрипционные промоторы, операторы, или энхансеры, рибосомальные сайты связывания мРНК и приемлемые последовательности, которые контролируют транскрипцию и трансляцию. Нуклеотидные последовательности являются оперативно связанными, когда регуляторные последовательности, описанные в данной заявке, являются функционально связанными с полинуклеотидами, кодирующими химерные полипептиды в соответствии с изобретением.

Типичные векторы включают плазмиды, дрожжевые челночные векторы, бакуловирус, инактивированный аденовирус и подобные им. В одном воплощении вектор представляет собой модифицированную рЕТ30b CatSom плазмиду (смотри Фигуру 1). Целевые хозяйские клетки для применения в данной заявке включают бактериального хозяина, например, *E.coli*, дрожжи, SF-9 клетки насекомых, клетки млекопитающих, клетки растений и тому подобное.

В одном воплощении регуляторные последовательности включают T7lac, CAT, Tgr или T5 промотор для экспрессии химерных полипептидов в соответствии с изобретением в *E.coli* или других подобных бактериях. Такие регуляторные последовательности являются известными в области техники и используются при приемлемых и известных условиях.

В том случае, когда для экспрессии используются генерически модифицированные клетки зеленых растений, могут использоваться системы подобные тем, что разработаны Planet Biotechnology и другие.

Были сконструированы различные плазмиды в соответствии с изобретением для экспрессии химерных полипептидов в соответствии с изобретением при использовании целевых регуляторных последовательностей. Иллюстративные плазмиды могут включать T7lac промотор (смотри Фигуру 1).

Хозяйские клетки для экспрессии целевых химерных полипептидов включают прокариот, дрожжи и клетки высших эукариотических организмов. Иллюстративные прокариотические хозяева включают бактерии родов *Escherichia*, *Bacillus* и *Salmonella*, а также родов *Pseudomonas* и *Streptomyces*. В типичном воплощении хозяйская клетка является таковой рода *Escherichia* и может представлять собой *Escherichia coli* (*E.coli*). Как показано в примерах, приведенных ниже, конструкции в соответствии с изобретением обеспечивают оптимальную экспрессию соматостатина - дефектной CAT при различных условиях. Такие конструкции являются особенно эффективными для экспрессии в прокариотических хозяевах и, в частности, в бактериях рода *Escherichia*. Следует также отметить, что могут использоваться разнообразные растительные системы экспрессии в контексте настоящего изобретения, типично при использовании *Agrobacterium tumefaciens*.

Очистка свободных от эндотоксина слитых белков

Аспекты в соответствии с настоящим изобретением включают применение свободного от эндотоксина, оптимизированного по кодомам соматостатина, слитого

с дефектной САТ для использования при вакцинации животных и, в частности, для вакцинации сельскохозяйственных животных, которых разводят в Соединенных Штатах. Свободные от эндотоксина материалы являются особенно важными для разведения и выращивания крупного рогатого скота и в Соединенных Штатах (смотри, например, Drackley, JK 2004. Physiological adaptations in transition dairy cows. стр.74-87 in Proc. Minnesota Dairy Herd Health Conf., St Paul, MN. University of Minnesota, St. Paul).

В одном воплощении химерные иммуногенные белки, включающие соматостатин, в соответствии с изобретением получают путем трансформации целевых клеток с помощью приемлемых содержащих соматостатин векторов. Как отмечалось выше, векторы для применения в данной заявке включают известные плазмидные и векторные системы, приемлемые для экспрессии в выбранных хозяйских клетках.

В одном аспекте в соответствии с изобретением химерные иммуногенные, содержащие соматостатин белки экспрессируются в целевых хозяйских клетках. Экспрессию химерного белка осуществляют при использовании целевой регуляторной последовательности. В некоторых аспектах химерные полипептиды были оптимизированы (в частности, в отношении спейсерной последовательности, раскрытой в данной заявке) для экспрессии в *E.coli*.

Химерный белок может подвергаться очистке в соответствии с известными технологиями очистки белка, включая, например, лизис при использовании лизоцима, дифференциальное центрифугирование телец включения, хроматографии на молекулярных ситах и подобных им. Процедуры рефолдинга могут осуществляться в хлориде гуанидина и мочеvine при щелочном значении рН, после чего осуществляют диализ и лиофилизацию.

В одном воплощении клетки *E.coli* подвергают трансформации при использовании плазмиды, содержащей оптимизированный по кодам САТ-дефектный соматостатин - pET30b CatSom; при этом pET30b CatSom содержит приемлемые для *E.coli* основные регуляторные последовательности для экспрессии. В некоторых случаях осуществление ферментации этих клеток в объеме приблизительно 10 литров обеспечивает получение, по крайней мере, 500 грамм и в некоторых случаях 600 грамм общей биомассы, что дает выход, составляющий 4-6 грамм общего белка. С помощью окрашивания серебром и Кумасси голубым было показано, что вплоть до половины белка может представлять собой химерный белок (смотри Пример 2 и Фигуру 2).

В некоторых воплощениях, описанных в данной заявке, химерный белок в соответствии с изобретением очищают из трансформированных хозяйских клеток в существенно свободном от эндотоксина состоянии. Выявление того факта, что эндотоксин и, в частности, многократное воздействие эндотоксина, у некоторых животных и, в частности, у коров молочных пород, приводит к получению животных с существенной патологией (мастит и эндотоксиновый шок у выведенных и выращиваемых в Соединенных Штатах коров молочных пород), представляло собой неожиданный и удивительный результат, полученный изобретателями в соответствии с настоящей заявкой.. Выявление этого факта привело к попытке удалить или снизить количество дозы эндотоксин или количество вакцинаций у коров молочных пород. Следует отметить, что этот основанный на эндотоксине эффект значительно меньше реализуется при разведении и выращивание молочных коров в России и других странах, поскольку молочный крупный рогатый скот имеет происхождение от различных пород коров. Holstein Association, 1 Holstein Place, Brattleboro, Vermont 05302-0808. Выявление этого у молочных коров в Соединенных Штатах является в общем

случае противоположным ожиданию того, что если вакцина будет включать некоторое низкое количество эндотоксина, то это поможет максимально повысить иммунный ответ у животных, как это происходит в случае коров молочных пород при вакцинации соматостатином на рынках некоторых других европейских стран (смотри патент США №6,316,004).

Как таковые некоторые воплощения, описанные в данной заявке, являются направленными на получение существенно свободных от эндотоксина химерных белков для применения в вакцина, и, в частности, для применения в вакцинах, используемых в животноводстве и используемых в животноводстве в Соединенных Штатах. В некоторых воплощениях уровни эндотоксина находятся на уровне 1 ед. эндотоксина/мл или ниже, а в других воплощениях уровни эндотоксина являются существенно устраненными, то есть, химерные полипептиды в соответствии с изобретением являются существенно свободными от эндотоксина.

В одном воплощении извлеченный из лизированных хозяйских клеток IB многократно промывают при использовании промывочного раствора, свободного от эндотоксина, то есть, свободной от эндотоксина воды или раствора. Восстановленный IP осадок может подвергаться необязательному промыванию до тех пор, пока уровни эндотоксина не станут ниже значения приблизительно 1 ед. эндотоксина/мл (анализы эндотоксина можно осуществлять при использовании одного или более известных анализов, включая коммерчески доступные аналитические наборы от MP Biochemicals, Charles River, и т.п.). В некоторых воплощениях промывочный раствор является свободным от эндотоксина и включает один или более ингибитор(ов) протеолиза белка например, фенилметансульфонилфторид (PMSF), 4-(2-аминоэтил)-бензолсульфонилфторид (AEBSF), и т.п. В некоторых воплощениях промывочный раствор представляет собой забуференный фосфатом физиологический раствор (PBS), содержащий ингибиторно эффективные количества PMSF, AEBSF или комбинации PMSF и AEBSF.

В некоторых аспектах существенно свободные от эндотоксина образцы могут подвергаться обработке с помощью раствора для разворачивания белка со значением pH 12,5, который содержит мочевины, и подвергаться повторной сборке в растворе для сборки белка, имеющем сниженную молярность мочевины, с аргинином, глицерином и/или сахарозой. Концентрацию очищенного химерного белка подвергают модификации в интервале от 1 до 3 мг/мл и типично приблизительно от 1,4 до 1,8 мг/мл. В некоторых случаях существенно свободный от эндотоксина химерный белок обеспечивают для вакцинных композиций при концентрации приблизительно от 1,5 до 5 мг/2 мл дозы и более типично, от 2,0 до 3,5 мг/2 мл дозы.

Другие процедуры по удалению эндотоксина предполагаются как такие, которые входят в объем настоящего изобретения и могут включать, например, коммерчески доступные ионообменные колонки для удаления эндотоксина, гидрофобные колонки и т.п. (смотри, например, Mustang E или G колонки (Millipore)).

Усиливающий иммунный ответ адъювант

Воплощения в соответствии с изобретением обеспечивают новые адъюванты для улучшенной индукции гуморального иммунитета. Эти адъюванты обеспечивают значительное повышение по сравнению с традиционными материалами для индукции гуморального иммунитета. Адъюванты, описанные в данной заявке, могут использоваться во многих вакцинах, но представлены в примерах в применении с полипептидами в соответствии с изобретением для вакцинации коров молочных

пород, свиней или телят.

Является важным, что компоненты адъювантов, описанных в данной заявке, имеют не животное происхождение, устраняя, таким образом, потенциальную перекрестную контаминацию вакцинированных животных с потенциально загрязненными компонентами адъюванта. Например, воплощения, описанные в данной заявке, могут использовать Твин 80, не содержащий веществ животного происхождения. Это является особенно важным тогда, когда животное, представляющее интерес, представляет собой молочную корову, по причине беспокойства по поводу губкообразной энцефалопатии крупного рогатого скота (BSE) или других подобных заболеваний крупного рогатого скота. Следует отметить, что эти беспокойства являются в равной степени применимыми для лечения человека, где адъювант, имеющий не животное происхождение, обеспечивает значительное преимущество безопасности. Кроме того, воплощения адъюванта, описанные в данной заявке, являются свободными от бензола и других подобных канцерогенных соединений. Эти воплощения обеспечивают преимущество безопасности, которое является недоступным для большинства традиционных адъювантных соединений. Например, воплощения, описанные в данной заявке, могут использовать Carborpol® 974P или полициклическую кислоту, свободную от бензола.

В одном воплощении иммунологический адъювант включает эмульсию масло-в-воде в комбинации с выбранными антигенами, смешанными в эмульсионном премиксе. Иллюстративные эмульсии масло-в-воде для применения в данной заявке включают комбинации минерального масла, Твин 80, Span 85 и целевые полимеры (свободная от бензола полиакриловая кислота). В некоторых случаях целевой полимер является выбранным из группы, состоящей из гомополимера Карбомера типа В. Типичные эмульсии масло-вода включают от приблизительно 8-10% минерального масла (об./об.), от 0,003 до 0,004% Твина 80 (об./об.), от 0,007 до 0,008 Span 85 (об./об.) и от 0,04 до 0,06% полимера (вес./об.).

Иллюстративные эмульсионные премиксы в соответствии с изобретением состоят из полимера с высоким молекулярным весом, поверхностно-активного агента и эмульгатора в приблизительно 50% масляно-водной основе. Полимеры с высоким молекулярным весом для применения в данной заявке включают акриловые кислоты, перекрестно связанные с аллиловыми эфирами пентаэритрита. В некоторых случаях полимеры с высоким молекулярным весом имеют RVT вязкость Брукфильда от приблизительно 29000 до 40000, например, Карбопол® 974P (Noveon, Inc).

Способ получения оптимизированного иммунного ответа у коров молочных пород или других сельскохозяйственных животных, представляющих интерес

В соответствии с композициями и способами настоящего изобретения иммуногенные композиции, описанные в данной заявке (свободные от эндотоксина, оптимизированные по кодонам, САТ-дефектные конструкции соматостатина) объединяют с новыми адъювантами, как описано выше, для обеспечения вакцин в соответствии с изобретением. В одном воплощении свободные от эндотоксина, оптимизированные по кодонам, САТ дефектные конструкции соматостатина вводятся при общей дозе 2,98 мг/2 мл (где от 5% до 25% составляет адъювант (об./об.), более типично от 10% до 20% составляет адъювант и, наиболее типично, приблизительно 20% составляет адъювант). Следует отметить, что другие традиционные адъюванты также предполагаются в рамках настоящего изобретения и могут использоваться с оптимизированными по кодонам, САТ-дефектными конструкциями соматостатина в соответствии с изобретением, однако оптимальные

результаты были показаны тогда, когда новые адъюванты, описанные в данной заявке, используются в таком диапазоне.

Задача новых конструкций соматостатина и адъюванта заключается в повышении продуктивности животных, представляющих интерес, типично, сельскохозяйственных животных и, более типично, коров молочных пород, телят, овец, свиней или коз.

Препарат вводится внутримышечно или подкожно, предпочтительно менее 12 раз, более предпочтительно менее 6 раз, и в некоторых случаях только один раз. Тогда, когда требуется более одной инъекции у животных, которые представляют интерес, интервал, составляющий от 14 до 28 дней перед следующей инъекцией является типичным. Как отмечалось выше, воплощения, описанные в данной заявке, дают возможность избежать применения обработки с помощью рекомбинантного гормона у животных, которые представляют интерес, основное преимущество в области животноводства (рекомбинантный гормон роста был ассоциирован с ранним наступлением половой зрелости у девочек и различными проблемами окружающей среды, связанные с тем, что органические удобрения от обработанного крупного рогатого скота могут неблагоприятным образом влиять как на поверхностную окружающую среду, так и на грунтовые воды).

Стерильные композиции в соответствии с изобретением могут вводиться с помощью подкожной или внутримышечной инъекции. Типичные сайты введения представляют собой шею или хвост животного, представляющего интерес, хотя могут использоваться и другие сайты. Следует отметить, что сайт должен использоваться так, чтобы побочные реакции не препятствовали способности животного двигаться, есть, пить и т.п.

Как отмечалось выше, вакцины, описанные в данной заявке, типично в свободном от эндотоксина состоянии, при использовании новых адъювантов, описанных в данной заявке, обеспечивают значительное повышение продукции мяса и молока у коров молочных пород, крупного рогатого скота, свиней и т.п. Однако такие обработки не сопровождаются повышением потребления корма.

ПРИМЕРЫ

Приведенные ниже примеры обеспечиваются только для иллюстративных целей и не предназначены для ограничения объема в соответствии с изобретением.

Пример 1: Конструирование слитого белка дефектный САТ - соматостатин

Данный пример иллюстрирует продукцию слитого белка САТ-дефектного соматостатина в соответствии с воплощениями настоящего изобретения. Осуществляли сайт-направленный мутагенез на плазмиде pET30b-Cat-Som для замены His192 и His193 остатками глицина (после модификации: Gly192 и Gly193). Инактивация His193 (и His192) остатков устраняла способность фермента САТ принимать протоны, обеспечивая, таким образом, полную инактивацию САТ.

Спейсер в той же плазмиде pET30b-Cat-Som (имеющей замену(ы) His) был оптимизирован по кодонам для экспрессии с помощью E.coli при отсутствии совместно экспрессируемых молекул tРНК.

Модифицированная конструкция нуклеиновой кислоты САТ-дефектного соматостатина является представленной как SEQ ID NO: 12. Последовательность слитого белка САТ-дефектного соматостатина является раскрытой как SEQ ID NO: 13, по сравнению с немодифицированным слитым белком САТ-соматостатин (SEQ ID NO: 14).

Пример 2: Слитый белок САТ-дефектного соматостатина может экспрессироваться на высоком уровне

Оптимизированную по кодонам конструкцию САТ-дефектного соматостатина, как описано в Примере 1, использовали для экспрессии слитого белка в клетках BL21(DE3).

Трансформированные клетки выращивали в среде LB и индуцировали с помощью 0,4 mM IPTG в течение приблизительно трех часов. Один миллилитр клеток из культуры с оптической плотностью OD 0,7 осаждали и нагревали при 70°C в течение 10 минут в 100 мкл SDS буфера для образцов. Образец объемом 40 мкл клеточного экстракта загружали на каждую дорожку SDS ПАГЭ.

Как показано на Фигуре 2, полоса 28 кДа, соответствующая предсказанному размеру оптимизированного по кодонам слитого белка САТ-дефектного соматостатина, была видимой в дорожках 1 (LB + IPTG, восстанавливающий) и 3 (LB + IPTG) после индукции с помощью IPTG. Никакой экспрессии не наблюдали в дорожках 2 (LB, восстанавливающий) и 4 (LB). Как и ожидалось, не было различия в размерах белка при осуществлении разгонки при стандартных условиях и восстанавливающих условиях.

Пример 3: Вакцина, содержащая свободный от эндотоксина, оптимизированный по кодонам САТ-дефектный соматостатин

Иллюстративная вакцина в соответствии с настоящим изобретением:

а. JN 14 (Адьювант)	
минеральное масло - 50% (об./об.)	
Твин 80 - 0,1694% (об./об.)	24 мл
Span 85-0,1915% (об./об.)	
Карбопол 974NP - 0,125% (вес./об.)	
б. Повторно собранный белок в соответствии с изобретением (2,96 мг/мл) - смотри Пример 2	95,6 мл
в. Забуференный фосфатом физ. раствор	35,6 мл
г. Антибактериальный/противогрибковый агент	0,36 моля 120 мл

Пример 4: Свободные от эндотоксина химерные пептиды/адьюванты обеспечивают повышенную продукцию молока

Идентифицировали случайный пул коров молочных пород (Holstein Crosses - выведенные и выращенные в США), каждый из них состоял из коров через 31-65 дней после отела (третья - пятая лактация). Каждую корову подвергали анализу и определяли как такую, которая имеет оптимальное состояние здоровья, с помощью ветеринара.

Средний вес коров в исследовании составлял приблизительно от 1000 до 1200 фунтов. Шесть коров в периоде лактации обрабатывали 1,96 мг химерного белка/2 мл дозы в JN14. Альтернативно, 9 коров в периоде лактации обеспечивали при использовании традиционной обработки с помощью рBST. Изучение обработок и молочной продуктивности при исследовании молочной продуктивности осуществляли в большом масштабе на молочном заводе.

Вакцинации проводили в день 0. Анти-SST сывороточные антитела и сывороточные уровни IGF-1 подвергали анализу в течение 4 недель. Молочную продуктивность и общее состояние здоровья животных определяли в соответствии с регулярным расписанием.

Шесть коров, которые были вакцинированы при использовании композиции в соответствии с изобретением, описанным в данной заявке, имели нормальный внешний вид, при отсутствии реакции на эндотоксин и отказа от приема корма. Все шесть коров имели позитивный серологический ответ на SST со средним значением титра 1:14. Молочная продуктивность шести коров, полученная при использовании

только одной вакцинации (смотри Фиг.3А), продемонстрировала среднее значение выхода молока 23,7%.

Девять коров, обработанных при использовании традиционных инъекций рBST, в дни 0 и 14 продемонстрировали среднее значение молочной продуктивности 2% (смотри Фиг.3 В).

Данные этого примера показывают значительное повышение эффективности при использовании свободных от эндотоксина конструкций в комбинации с адъювантами в соответствии с изобретением у коров молочных пород. Эти результаты являются значительно улучшенными в отношении состояния здоровья и продуктивности животных по сравнению с коровами, которым дважды вводили рBST.

Пример 5: Свободные от эндотоксина химерные пептиды/адъюванты обеспечивают повышение мясной продуктивности у поросят подвергнутых обработке свиноматок

Идентифицировали случайный пул свиноматок приблизительно, по крайней мере, за 35-36 дней до опороса. Каждую свиноматку подвергали исследованию и определяли оптимальное состояние здоровья с помощью ветеринара. Беременных свиноматок подвергали иммунизации дважды при использовании вакцины в соответствии с изобретением (смотри Пример 3), один раз за 35-36 дней до родов и один раз за 8 дней до родов. Контрольную группу беременных свиноматок поддерживали с целью сравнения (при отсутствии вакцинации и при использовании вакцинации с помощью стерильного физиологического раствора).

Родившиеся поросята из вакцинированной группы будут иметь более высокую выживаемость и будут обладать большим средним размером. Повышение среднего размера поросят повышает процент выживаемости, поскольку большие поросята с меньшей вероятностью будут отталкиваться от молочной железы свиноматки. Подвергнутые обработке и контрольные поросята подвергались взвешиванию в день 21, день 30 и день 75. Вакцинации в соответствии с настоящим изобретением будут повышать дневную прибавку веса в среднем на 35% в течение периода времени 75 дней.

Важно отметить, что выживаемость поросят и вес увеличиваются при использовании вакцины в соответствии с настоящим изобретением при отсутствии рекомбинантного гормона роста. Это представляет собой значительное усовершенствование по сравнению с гормональной терапией.

Пример 6: Свободные от эндотоксина химерные пептиды/адъюванты обеспечивают повышенную продукцию мяса у подвергнутых обработке телят

Случайный пул телят в возрасте от одного до трех месяцев идентифицировали и подвергали обработке с помощью композиции в соответствии с изобретением. Повышение веса в течение периода времени примерно 10 месяцев подвергали мониторингу и сравнивали с контрольной группой, которую обрабатывали таким же образом, что и инъекционную группу, за исключением того, что в первом случае использовали инъекции в соответствии с изобретением. Каждого теленка подвергали исследованию и определяли на оптимальное состояние здоровья с помощью ветеринара в течение всего периода обработки.

Инъекции для группы вакцинации осуществляли в неделю 0, через 4 и 8 недель (три общие вакцинации). Вакцинации будут обеспечиваться подкожно или внутримышечно в область шеи при использовании 18-21 размера сс иголки. Также обеспечивали бустер-инъекции (4 бустер-инъекции, 3 бустер-инъекции или без бустер-инъекций). Вакцинные инъекции включали 2 мг/2 мл химерного полипептида. Химерный полипептид получали так, как описано в данной заявке, заменяя оба остатка гистидина в САТ

аминокислотами глицина в соответствии с изобретением и при оптимизации линкера так, как описывается в SEQ ID NO: 3.

Каждого из вакцинированных и контрольных телят взвешивали, принимая во внимание исходный вес. Ожидается, что вакцинированные в соответствии с изобретением животные будут демонстрировать прибавку веса по сравнению с контрольными животными, которая составляет от 15 до 40%. Такое повышение среднего веса для подвергнутых обработке телят демонстрирует значительное преимущество по сравнению с отсутствием обработки.

Является важным отметить, что полученное от обработанных телят мясо не содержит рекомбинантного гормона роста.

Несмотря на то, что изобретение было специфически продемонстрировано и описано со ссылкой на ряд воплощений, специалисту в данной области техники будет понятным, что могут быть внесены изменения в форму и детали различных воплощений, раскрытых в данной заявке, при отсутствии отступления от духа и объема настоящего изобретения, и различные воплощения, раскрытые в данной заявке, не предназначены для того, чтобы служить ограничением пунктов формулы изобретения.

Формула изобретения

1. Химерный полипептид, обладающий иммуногенностью соматостатина и включающий аминокислотную последовательность соматостатина-14, которая представлена в SEQ ID NO: 1, связанную с существенно неактивным и укороченным полипептидом хлорамфеникол ацетилтрансферазы, имеющим последовательность, которая выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 7 и SEQ ID NO: 8, где соматостатин-14 связан с неактивной хлорамфеникол ацетилтрансферазой с помощью последовательности спейсера, выбранной из SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 11.

2. Химерный полипептид по п.1, имеющий аминокислотную последовательность, которая характеризуется по крайней мере 99% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 13.

3. Химерный полипептид по п.1, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13.

4. Иммуногенная композиция, включающая химерный полипептид по п.1 вместе с фармацевтически приемлемым адъювантом в количестве, эффективном для того, чтобы вызвать иммунный ответ.

5. Иммуногенная композиция, включающая химерный полипептид по п.1 вместе с адъювантом, где адъювант включает эмульсию масло-в-воде, смешанную с эмульсионным премиксом, где эмульсия масло-в-воде включает минеральное масло, Твин 80, Span 85 и один или более полимеров, и где эмульсионный премикс включает полимер с высоким молекулярным весом, поверхностно-активный агент и эмульгатор в масляно-водной основе.

6. Способ повышения продукции молока у коров молочных пород, включающий: вакцинацию коров молочных пород с помощью одной или более доз иммуногенной композиции, содержащей химерный полипептид по п.1;

и фармацевтически приемлемый адъювант в количестве, эффективном для того, чтобы вызвать иммуногенный ответ, и

предоставление периода времени, по крайней мере, десять дней, в течение которых продукция молока коровами молочных пород будет повышаться по сравнению с

продукцией молока теми же коровами при отсутствии вакцинации.

7. Способ по п.6, в котором корову молочной породы вакцинируют с помощью одной дозы композиции.

8. Способ повышения продукции молока у коров молочных пород, включающий вакцинацию коров молочных пород с помощью одной или более доз композиции по п.5;

предоставление периода времени, по крайней мере, десять дней, в течение которых продукция молока коровами молочных пород будет повышаться по сравнению с продукцией молока теми же коровами при отсутствии вакцинации.

9. Способ повышения продукции постного мяса фермерского поголовья скота, включающий вакцинацию фермерского поголовья скота с помощью одной или более доз иммуногенной композиции, содержащей химерный полипептид, включающий аминокислотную последовательность соматостатина-14, которая представлена в SEQ ID NO: 1, связанную с существенно неактивным и укороченным полипептидом хлорамфеникол ацетилтрансферазы, имеющим последовательность, которая выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 7 и SEQ ID NO: 8, где соматостатин-14 связан с неактивной хлорамфеникол ацетилтрансферазой с помощью спейсера и фармацевтически приемлемый адъювант в количестве, эффективном для того, чтобы вызвать иммуногенный ответ;

предоставление периода времени, по крайней мере, десять дней, в течение которых продукция постного мяса животным будет повышаться по сравнению с продукцией постного мяса теми же животными при отсутствии вакцинации.

10. Химерный полипептид, обладающий иммуногенностью соматостатина и включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, которая состоит из SEQ ID NO: 3, 7 и 8, и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1; где спейсер, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10 и SEQ ID NO: 11, связан с аминокислотными последовательностями.

11. Способ повышения продукции молока у коров молочных пород, включающий вакцинацию коров молочных пород с помощью одной или более доз иммуногенной композиции, содержащей химерный полипептид, включающий аминокислотную последовательность соматостатина-14, которая представлена в SEQ ID NO: 1, связанную с существенно неактивным и укороченным полипептидом хлорамфеникол ацетилтрансферазы, имеющим последовательность, которая выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 7 и SEQ ID NO: 8, где соматостатин-14 связан с неактивной хлорамфеникол ацетилтрансферазой с помощью последовательности спейсера, и фармацевтически приемлемый адъювант в количестве, эффективном для того, чтобы вызвать иммуногенный ответ, и

предоставление периода времени, по крайней мере, десять дней, в течение которых продукция молока коровами молочных пород будет повышаться по сравнению с продукцией молока теми же коровами при отсутствии вакцинации.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> БРААШ БИОТЕХ ЛЛК

<120> СЛИТЫЙ БЕЛОК ДЕФЕКТНАЯ ХЛОРАМФЕНИКОЛ АЦЕТИЛ ТРАНСФЕРАЗА (САТ) - СОМАТОСТАТИН И ЕГО ПРИМЕНЕНИЯ

<130> 0311.01РСТ

<140> РСТ/US2008/068195

<141> 2008-06-25

<160> 15

<170> PatentIn версия 3.5

<210> 1

<211> 14

<212> Белок

<213> Искусственный

<220>

<223> Синтетический

<400> 1

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

<210> 2

<211> 630

<212> ДНК

<213> Искусственная

<220>

<223> Синтетическая

<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 tgttcacccct tgttacaccg tttccatga gcaaaactgaa      300
acgttttcat cgctctggag tgaataccac gacgatttcc ggcagtttct acacatatat      360
tcgcaagatg tggcgtgtta cggtgaaaac ctggcctatt tccctaaagg gtttattgag      420
aatatgtttt tcgtctcagc caatccctgg gtgagtttca ccagttttga tttaaacgtg      480
gccaatatgg acaacttctt cgcctccgtt ttcaccatgg gcaaatatta tacgcaaggc      540
gacaagggtc tgatgccgct ggcgattcag gttgggtggtg ccgtttgtga tggcttccat      600
gtcggccgta tgcttaatga actgcagcag                                     630

```

<210> 3

<211> 210

<212> Белок

<213> Искусственный

<220>

<223> Синтетический

<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
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> ДНК

<213> Искусственная

<220>

<223> Синтетическая

<400> 4
 atggagaaaa aaatcactgg atataccacc gttgatatat cccaatggca tcgtaaagaa 60
 cattttgagg catttcagtc agttgctcaa tgtacctata accagaccgt tcagctggat 120
 attacggcct ttttaaagac cgtaaagaaa aataagcaca agttttatcc ggccctttatt 180
 cacattcttg cccgcctgat gaatgctcat ccggaattcc gtatggcaat gaaagacggg 240
 gagctgggta tatgggatag tgttcaccct tgttacaccg ttttccatga gcaaaactgaa 300
 acgttttcat cgctctggag tgaataccac gacgatttcc ggcagtttct acacatatat 360
 tcgcaagatg tggcgtgtta cggtgaaaac ctggcctatt tccttaaagg gtttattgag 420
 aatatgtttt tcgtctcagc caatccctgg gtgagtttca ccagttttga tttaaacgtg 480
 gccaatatgg acaacttctt cgcctccgtt ttcaccatgg gcaaatatta tacgcaaggc 540
 gacaagggtg tgatgccgct ggcgattcag gttcatgggtg ccgtttgtga tggcttccat 600
 gtcggccgta tgcttaatga actgcagcag 630

<210> 5
 <211> 630
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Синтетическая

<400> 5
 atggagaaaa aaatcactgg atataccacc gttgatatat cccaatggca tcgtaaagaa 60
 cattttgagg catttcagtc agttgctcaa tgtacctata accagaccgt tcagctggat 120
 attacggcct ttttaaagac cgtaaagaaa aataagcaca agttttatcc ggccctttatt 180
 cacattcttg cccgcctgat gaatgctcat ccggaattcc gtatggcaat gaaagacggg 240
 gagctgggta tatgggatag tgttcaccct tgttacaccg ttttccatga gcaaaactgaa 300
 acgttttcat cgctctggag tgaataccac gacgatttcc ggcagtttct acacatatat 360
 tcgcaagatg tggcgtgtta cggtgaaaac ctggcctatt tccttaaagg gtttattgag 420
 aatatgtttt tcgtctcagc caatccctgg gtgagtttca ccagttttga tttaaacgtg 480
 gccaatatgg acaacttctt cgcctccgtt ttcaccatgg gcaaatatta tacgcaaggc 540
 gacaagggtg tgatgccgct ggcgattcag gttcatgctg ccgtttgtga tggcttccat 600
 gtcggccgta tgcttaatga actgcagcag 630

<210> 6
 <211> 630
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Синтетическая

<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 tttaaacgtg 480
gccaatatgg acaacttctt cgcccccggt ttcaccatgg gcaaataatta tacgcaaggc 540
gacaagggtgc tgatgccgct ggcgattcag gttcatgggtg ccgtttgtga tggcttccat 600
gtcggcagaa tgcttaatga actgcagcag 630

<210> 7
<211> 210
<212> Белок
<213> Искусственный

<220>
<223> Синтетический

<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> Белок
<213> Искусственный

<220>
<223> Синтетический

<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

<210> 9
<211> 57
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая

<400> 9
tgggaactgc accgttcttg tccacgcccg cgcctctgcc cagtcgcga attcatg

<210> 10
<211> 19
<212> Белок
<213> Искусственный

<220>
<223> Синтетический

<400> 10

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

Glu Phe Met

<210> 11
<211> 13
<212> Белок
<213> Искусственный

<220>
<223> Синтетический

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (9)..(10)
<223> Пара повторов остатков, по крайней мере, один раз

<400> 11

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

<210> 12
<211> 729

<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая

<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 gaaagacggg 240
gagctggtga tatgggtag tggtcacctc tggtacaccg ttttccatga gcaaactgaa 300
acgttttcat cgctctggag tgaataccac gacgatttcc ggcagtttct acacatatat 360
tcgcaagatg tggcgtgtta cggtgaaaaa ctggcctatt tccctaaagg gtttattgag 420
aatatgtttt tcgtctcagc caatccctgg gtgagtttca ccagttttga tttaaacgtg 480
gccaatatgg acaacttctt cgcctccgtt ttcaccatgg gcaaatatta tacgcaaggc 540
gacaagggtc tgatgccgct ggcgattcag gttggtggtg ccgtttgtga tggcttccat 600
gtcggccgta tgcttaatga actgcagcag tgggaactgc accgttcttg tccacgcccg 660
cgccctcgcc caggtccgga attcatggcc ggctgcaaga acttcttttg gaaaaccttt 720
acgagctgc 729

<210> 13
<211> 243
<212> Белок
<213> Искусственный

<220>
<223> Синтетический

<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

<210> 14
<211> 243
<212> Белок
<213> Искусственный

<220>
<223> Синтетический

<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
195 200 205

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

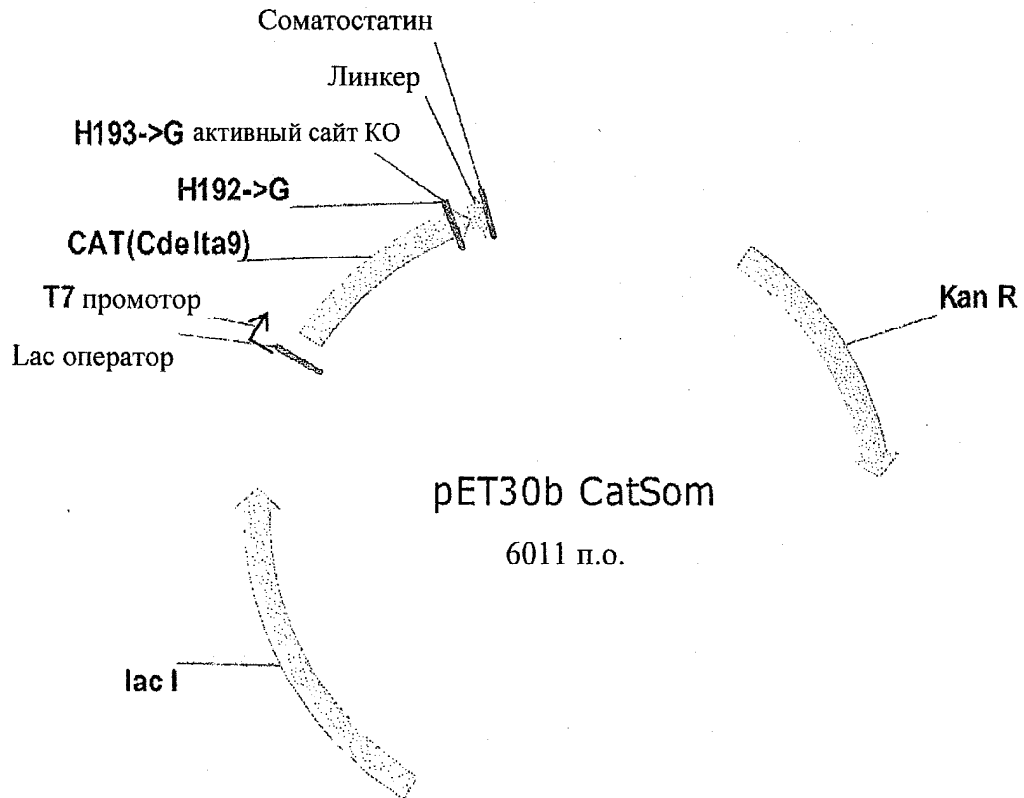
Arg Pro Glu Phe Met Ala Gly Cys Lys Asn Phe Phe Trp Lys Thr Phe
225 230 235 240

Thr Ser Cys

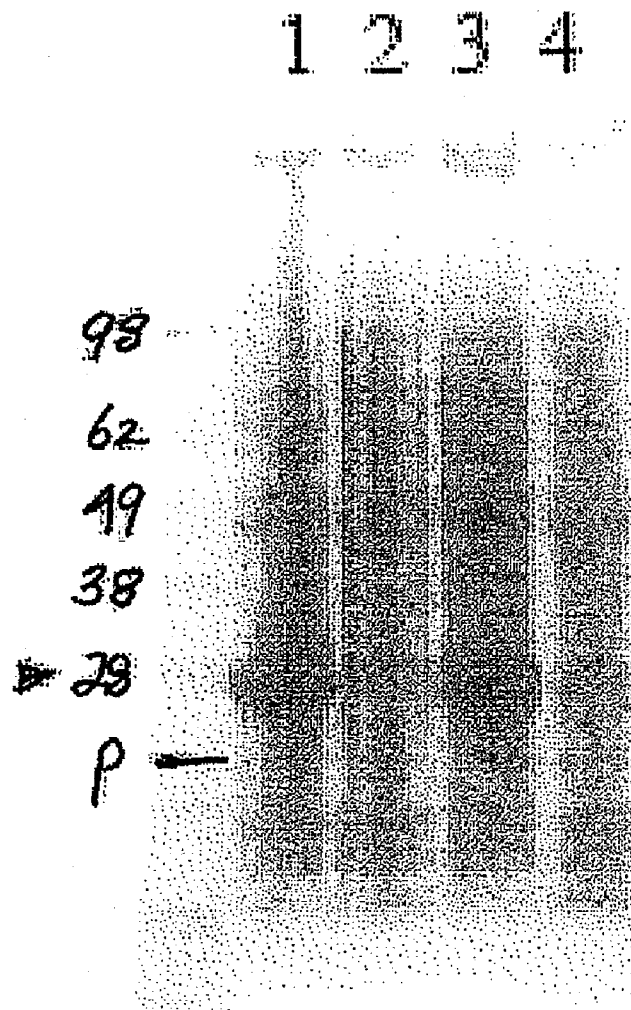
<210> 15
<211> 42
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая

<400> 15
gctggctgca agaatttctt ctggaagact ttcacatcct gt



Фиг. 1



Фиг. 2

ОБРАБОТАННЫЕ ХИМЕРНЫМ ПОЛИПЕПТИДОМ

Номер коровы #	Надой молока Д10	Надой молока Д15	Повышение надоя	% повышения
3361	30	34	+4 фунта	13%
4222	32	40	+8 фунтов	25%
5961	40	55	+15 фунтов	38%
6141	20	29	+9 фунтов	45%
6142	30	25	+5 фунтов	17%
6540	24	25	+1 фунт	4%
Среднее значение	29,33	36,33	+7,0 фунтов	23,7%

Фиг.3А

ТРАДИЦИОННАЯ ОБРАБОТКА С ПОМОЩЬЮ BST

Номер коровы #	Перед обработкой (фунты)	Период после обработки (фунты)	% изменения
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%
Среднее значение	32,4	32,7	2%

Фиг.3В