



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년09월25일

(11) 등록번호 10-1555731

(24) 등록일자 2015년09월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07K 19/00 (2006.01) A01K 67/027 (2006.01)
A61K 38/31 (2006.01) A61P 37/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2010-7029180

(22) 출원일자(국제) 2008년06월25일
심사청구일자 2013년06월25일

(85) 번역문제출일자 2010년12월24일

(65) 공개번호 10-2011-0039517

(43) 공개일자 2011년04월19일

(86) 국제출원번호 PCT/US2008/068195

(87) 국제공개번호 WO 2009/157926

국제공개일자 2009년12월30일

(56) 선행기술조사문현

US06316004 B1

KR1019900700505 A

WO2005066344 A2

Biochem J. 1993, Vol. 290, pp.15-19.

(73) 특허권자

브라아쉬 바이오테크 엘엘씨

미국, 사우스다코타 57030, 개럿슨, 로즈 애비뉴
421

(72) 발명자

웬델슨, 앤드류 알.

미국, 캘리포니아 94089, 써니베일, 보르도 드라
이브 1230, 브라아쉬 바이오테크 엘엘씨

하퍼, 케이트 엔.

미국, 사우스다코타 57030, 개럿슨, 로즈 드라이
브 421

래릭, 제임스

미국, 캘리포니아 94089, 써니베일, 보르도 드라
이브 1230, 브라아쉬 바이오테크 엘엘씨

(74) 대리인

조인제

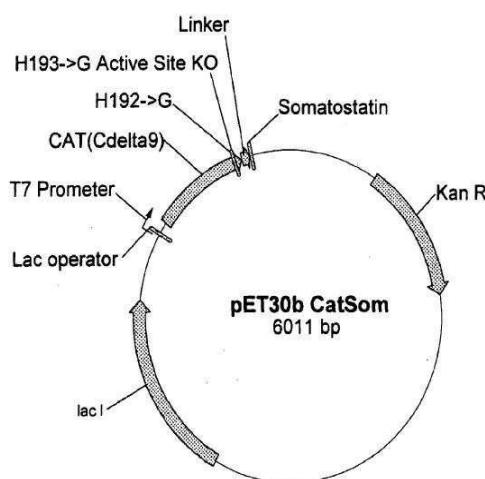
전체 청구항 수 : 총 14 항

심사관 : 이미옥

(54) 발명의 명칭 클로람페니콜 아세틸 트랜스페라아제(CAT)-결손성 소마토스타틴 응합 단백질 및 그것의 용도

(57) 요약

키메릭 소마토스타틴에 기초한 폴리펩티드, 상기 폴리펩티드를 암호화하는데 사용되는 폴리뉴클레오티드, 상기 폴리펩티드를 분리하고 생산하기 위한 방법 및 그것들의 용도가 제공된다. 게다가, 면역반응을 강화시키기 위한 저비용 보조제가 제공된다. 키메릭 소마토스타틴에 기초한 폴리펩티드 및 신규한 보조제 모두를 포함하는 백신이 포함되며, 가축 생산성을 촉진하는데 유용하다.

대 표 도 - 도1

명세서

청구범위

청구항 1

SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:7 및 SEQ ID NO:8로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 가지는 불활성화되고 절단된 클로람페니콜 아세틸 트랜스퍼라아제(chloramphenicol acetyl transferase) 폴리펩티드와 연결된 SEQ ID NO:1로 나타내는 소마토스타틴-14(somatostatin-14)의 아미노산 서열, 여기에서 상기 소마토스타틴-14는 스페이서(spacer)에 의하여 상기 불활성 클로람페니콜 아세틸 트랜스퍼라아제와 연결되어 있고, 여기에서 상기 스페이서는 SEQ ID NO:10 또는 SEQ ID NO:11의 아미노산 서열을 가지는, 소마토스타틴의 면역성을 가지는 것을 특징으로 하는 키메릭 폴리펩티드(chimeric polypeptide).

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 스페이서는 SEQ ID NO:10의 아미노산 서열을 가지는 것을 특징으로 하는 키메릭 폴리펩티드.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 불활성화되고 절단된 클로람페니콜 아세틸 트랜스퍼라아제 폴리펩티드는 SEQ ID NO:3의 아미노산 서열을 가지는 것을 특징으로 하는 키메릭 폴리펩티드.

청구항 4

삭제

청구항 5

제1항에 있어서,

SEQ ID NO:13의 아미노산 서열을 가지는 것을 특징으로 하는 키메릭 폴리펩티드.

청구항 6

약제학적으로 적합한 보조제와 함께 제1항의 키메릭 폴리펩티드를 포함하는 조성물.

청구항 7

보조제와 함께 제1항의 키메릭 폴리펩티드를 포함하며, 여기에서 상기 보조제는 에멀젼 프리믹스(emulsion premix)가 포함된 오일-인-워터(oil-in-water) 에멀젼을 포함하고, 여기에서 상기 오일-인-워터 에멀젼은 미네랄 오일(mineral oil), 트윈 80(Tween 80), 스펜 85(Span 85) 및 하나 또는 그 이상의 폴리머를 포함하고, 여기에서 상기 에멀젼 프리믹스는 오일-수성 기재(oil-aqueous base)에 고분자량 폴리머, 계면활성제 및 유화제(emulsifier)를 포함하는 조성물.

청구항 8

청구항 1의 키메릭 폴리펩티드 및 약제학적으로 적합한 보조제를 포함하는 면역 조성물을 젖소에 예방접종을 하는 것; 및

젖소의 우유 생산이 예방접종을 하지 않은 동일한 소의 우유 생산과 비교하여 증가될 동안 적어도 10일의 여유를 두는 것;

을 포함하는 젖소에서 우유 생산을 증가시키기 위한 방법.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 젖소는 단지 1회 투약량의 면역 조성물로 예방 접종된 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

제7항의 조성물을 사용하여 젖소에 예방접종을 하는 것; 및

젖소의 우유 생산이 예방접종을 하지 않은 동일한 소의 우유 생산과 비교하여 증가될 동안 적어도 10일의 여유를 두는 것;

을 포함하는 젖소에서 우유 생산을 증가시키기 위한 방법.

청구항 11

청구항 1의 키메릭 폴리펩티드 및 약제학적으로 적합한 보조제를 포함하는 면역 조성물을 사용하여 가축에 예방 접종을 하는 것; 및

가축의 살코기 생산이 예방접종을 하지 않은 유사한 가축에서의 살코기 생산에 비하여 증가될 동안 몇 주간의 여유를 두는 것;

을 포함하는 가축에서 살코기의 생산을 증가시키기 위한 방법.

청구항 12

(a) SEQ ID NO:3, 7 및 8로 이루어지는 군으로부터 선택된 아미노산 서열;

(b) SEQ ID NO:1의 아미노산 서열; 및

(c) SEQ ID NO:10 및 SEQ ID NO:11로 이루어지는 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 스페이서 (spacer);

를 포함하며, 여기에서 상기 스페이서가 상기 (a) 및 (b)의 아미노산 서열과 연결되는 것을 특징으로 하는 키메릭 폴리펩티드.

청구항 13

SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:7 및 SEQ ID NO:8로 이루어지는 군으로부터 선택되는 서열을 가지는 불활성화되고 절단된 클로람페니콜 아세틸 트랜스퍼라아제(chloramphenicol acetyl transferase) 폴리펩티드와 연결된 SEQ ID NO:1로 나타내지는 소마토스타틴-14(somatostatin-14)의 아미노산 서열을 포함하는 키메릭 폴리펩티드, 여기에서 상기 소마토스타틴-14는 스페이서에 의해 상기 불활성화된 클로람페니콜 아세틸 트랜스퍼라아제에 연결되어 있고; 여기에서, 상기 스페이서는 SEQ ID NO:10 또는 SEQ ID NO:11의 아미노산 서열을 가지고; 및

약제학적으로 적합한 보조제를 포함하는 면역 조성물을 젖소에 예방접종을 하는 것; 및

젖소의 우유 생산이 예방접종을 하지 않은 동일한 소의 우유 생산과 비교하여 증가될 동안 적어도 10일의 여유를 두는 것;

을 포함하는 젖소에서 우유 생산을 증가시키기 위한 방법.

청구항 14

청구항 7의 면역 조성물을 사용하여 가축에 예방접종을 하는 것; 및

가축의 살코기 생산이 예방접종을 하지 않은 유사한 가축에서의 살코기 생산에 비하여 증가될 동안 몇 주간의 여유를 두는 것;

을 포함하는 가축에서 살코기의 생산을 증가시키기 위한 방법.

청구항 15

제13항에 있어서,

상기 키메릭 폴리펩티드는 SEQ ID NO:13의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 키메릭 소마토스타틴에 기초한 폴리펩티드(chimeric somatostatin-based polypeptides), 상기 폴리펩티드를 암호화하는데 사용되는 폴리뉴클레오티드, 상기 폴리펩티드를 분리하고 생산하기 위한 방법 및 그것들의 용도에 관한 것이다. 본 발명은 또한 예를 들어, 다른 유사 항원뿐만 아니라 본 발명의 키메릭 소마토스타틴에 기초한 폴리펩티드의 강화된 면역성을 위한 신규한 보조제(adjuvant) 및 면역화 조성물(immunization composition)에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] (성장 호르몬 저해 호르몬 또는 GHIH로도 알려져 있는) 소마토스타틴은 소화계의 특정 부분뿐만 아니라 시상하부(hypothalamus)에서 생산된 웨티드 호르몬이다. 소마토스타틴은 일반적으로 G-단백질에 결합된(G-protein-coupled) 소마토스타틴 수용체와의 결합을 통하여 내분비계(endocrine system)의 조절에 관여한다. 이 소마토스타틴에 기초한 시그널링 캐스케이드(signaling cascade)는 신체의 전역에 걸쳐 다수의 작용을 야기한다.

[0003] 본 발명의 양상에 관련하여, 소마토스타틴은 뇌하수체 전엽(anterior pituitary)으로부터 성장 호르몬 및 갑상선 자극 호르몬(thyroid stimulating hormone)의 방출을 저해하는 것으로 알려져 있다(Patel YC and Srikant CB, Somatostatin and its receptors Adv Mol Cell Endocrinol, 1999. 343-73). 다른 호르몬들은 인슐린(insulin), 글루카곤(glucagon), 세크레틴(secretin), 가스트린(gastrin), 웨신(pepsin), 말레틴(maletin) 등을 포함하는 소마토스타틴에 의해 저해된다(Patel YC and Srikant CB Somatostatin and its receptors Adv Mol Cell Endocrinol, 1999. 343-73). 성장 및 음식의 이용에 필요한 아주 많은 인자들/호르몬들을 조절하기 위한 소마토스타틴의 능력은 소마토스타틴을 축산업 분야에서 동물의 성장을 조절하기 위한 주요 표적으로 만들었다, 즉 소마토스타틴을 저해하는 것은 표적 동물에 존재할 성장 호르몬의 농도를 증가시키며, 그것에 의하여 우유를 생산하고, 많은 양의 고기 등을 생산하는데 강화된 능력을 가지는 동물이 만들어진다.

[0004] 특히, 소마토스타틴에 대한 동물의 면역화는 표적 동물에서 소마토스타틴을 중화(neutralizing)시키는 수단으로서 알려져 있으며, 그것에 의하여 다양한 양상의 동물의 생산성, 예를 들어 젖소에서의 우유 생산성에 관한 소마토스타틴의 전형적인 저해 효과가 제거된다(Reichlin S., ed., 1987, Somatostatin, Basic and Clinical Status, Plenum Press, New York(pp 3-50, 121-136, 146-156, 169-182, 221-228, 267-274) Spencer G.S., 1985, Hormonal systems regulating growth, review, Livestock Production Science, 12, 31-46). 중요하게는, 이 소마토스타틴에 기초한 면역화 방법들은 동물에서 동화 호르몬(anabolic hormones), 예를 들어 성장 호르몬 등의 직접적인 사용을 피하고, 내인성 동화 인자(endogenous anabolic factors)의 농도에 작은 변화를 주며, 그것에 의하여 생태학적으로 순수한 식료품을 얻는다.

[0005] 소마토스타틴은 혈액 내에서 상대적으로 짧은 반감기를 가지는 것으로 알려져 있다. 소마토스타틴의 면역학적 효과를 강화시키기 위하여, 소마토스타틴을 표적 운반 단백질(carrier proteins)에 결합시킴으로써 단백질의 반감기를 강화시키기 위한 면역화 프로토콜을 개발하였다. 이 결합된 소마토스타틴 단백질들은 혈액 내에서 증가된 반감기 및 증가된 항원성(antigenicity)을 가지도록 설계되며, 따라서 (특히, 소마토스타틴을 제조하는 비용을 고려하여) 강화된 이점들을 제공한다. 예를 들면, 키메릭 소마토스타틴 단백질들은 미국 특허등록번호 제6,316,004호(및 대응하는 유럽 특허 EP0645454)에 기재되어 있으며, 여기에서 다양한 결합된 소마토스타틴-함유 단백질들이 다른 기존의 면역화 또는 동화 호르몬에 기초한 방법들과 비교하여 가축들의 생산성에 관해서 증가된 항원성 및 기능을 가짐을 보여주었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 그러나, 저용량(lower dose), 고항원성에 기초한 면역화 조성물 및 방법들은 축산업계에서의 전체적인 생산성 및 적시성(timeliness)을 향상시킬 필요가 있다. 본 발명은 이러한 더욱 항원 및 기능적으로 활성적인 소마토스타틴에 기초한 면역화 화합물, 조성물 및 방법들을 제공하는 것으로 한다.

[0007] 이러한 배경에 대하여 하기의 설명을 제공한다.

과제의 해결 수단

[0008] 본 발명은 신규한 폴리펩티드 및 그것을 암호화하며, 소마토스타틴의 강화된 면역성을 가지는 폴리뉴클레오티드를 제공한다. 본 발명의 폴리펩티드는 기능적으로 최적화된 링커(linker)를 통하여 실질적으로 불활성화된 클로람페니콜 아세틸 트랜스페라아제 단백질에 융합된 소마토스타틴-14를 포함한다. 본 발명의 키메릭 폴리펩티드는 하기에 더욱 상세하게 기재되는 바와 같이 축산업계에서 사용하는 데 매우 효과적이고 낮은 비용의 물질을 제공한다. 본 발명의 구현은 SEQ ID NOS: 1-14로 정의되는 것과 같은 아미노산 서열 및 핵산 서열을 포함한다.

[0009] 본 발명은 또한 내독소(endotoxin)를 포함하지 않으며 매우 기능적인 상태로 본 발명의 키메릭 폴리펩티드를 만들기 위한 생산 및 경제 방법을 제공한다. 내독소를 포함하지 않는 폴리펩티드는 어떤 표적 동물에 사용하기 위한 실질적이고 예기치 않은 이점을 제공하며, 여기에서 전형적으로 면역반응을 이끌어내기에 유리하다고 생각되는 적은 양의 내독소는 실제로 현저한 기능적 손실을 야기한다. 이것은 특히 본 발명의 폴리펩티드가 미국에서 나고 자란 젖소를 면역화시키는데 사용되는 경우이다. 게다가, 본 발명의 키메릭 폴리펩티드는 기준의 물질들에 비하여 강화된 기능을 나타내기 때문에, 표적 동물을 면역화시키는 데 더욱 적고 낮은 용량이 사용된다. 요구되는 양에 있어서의 이러한 감소는 또한 본 발명의 백신에서 내독소의 결과적인 감소를 제공한다. 본 발명의 키메릭 폴리펩티드의 내독소를 포함하지 않는 분리(isolation) 및 더욱 적은 양의 사용의 조합은 실질적으로 본원에서 사용될 내독소를 포함하지 않은 백신을 감안한다.

[0010] 본 발명은 또한 기준의 보조제 물질에 비하여 강화된 기능 및 안전성을 가지는 보조제 조성물을 제공한다. 보조제는 본원에서 동물로부터 유래된 물질들을 포함하지 않으며, 대부분의 잘 알려져 있는 화학 발암물질, 예를 들어 벤젠 등의 물질을 포함하지 않는다. 보조제 조성물을 본원에서 표적 항원과 결합하였을 경우 면역반응을 일으키는 데 예기치 못한 효과를 나타내었다.

[0011] 본 발명은 본 발명의 보조제 조성물과 함께 본 발명의 키메릭 폴리펩티드를 포함하는 백신을 더 제공한다. 본원에서 백신은 예방접종을 한 포유동물 및 조류, 예를 들어, 표적 가축들에서 면역반응을 유도하기 위하여 사용된다. 본원에서 사용하기 위한 예시적인 가축은 젖소, 돼지, 양, 염소, 칠면조, 토끼 및 수송아지를 포함한다. 몇몇 양상에 있어서, 본 발명의 폴리펩티드는 내독소와 적게 결합되거나 결합되지 않고 제조되고 정제된다. 이 백신들은 표적 동물에서 안전하고 강화된 면역반응을 일으키는데 최적화되어 있다.

[0012] 본 발명은 본 발명의 백신을 사용하는 표적 포유동물 및 조류에 예방접종하기 위한 방법을 더 포함한다. 예시적인 방법은 (동물 및 최종 수요자에게 모두) 안전하고 비용 효과적이며 매우 유용한 방법으로 우유 생산성을 강화시키기 위한 젖소의 예방접종을 가능하게 한다. 다른 예시적인 방법은 안전하고 비용효과적인 방법으로 표적 동물에서 고기(특히, 살코기) 생산을 강화시키기 위한 새끼돼지, 양, 칠면조, 염소, 토끼 또는 수송아지의 예방접종을 포함한다.

[0013] 본 발명의 이러한 다양한 다른 특징 및 이점들은 하기의 상세한 설명을 읽고 첨부된 청구항을 리뷰함으로써 명백해질 것이다.

발명의 효과

[0014] 본 발명의 키메릭 폴리펩티드는 기준의 물질들에 비하여 강화된 기능을 나타내기 때문에, 표적 동물을 면역화시키는 데 더욱 적고 낮은 용량이 사용되며, 표적 동물에서 안전하고 강화된 면역반응을 일으키는데 최적화된 백신을 제공한다.

도면의 간단한 설명

[0015] 도 1은 본 발명의 구현에 따른 pET30b CatSom 플라스미드의 예시적인 개략도이다. 상기 플라스미드는 카나마이신 저항성 마커(Kanamycin resistance marker), 락 오퍼레이터(Lac operator), T7 프로모터(T7 promoter), 본 발명의 구현에 따른 모든 CAT 코딩 서열(CAT coding sequence)을 포함하며, 본 발명에 따른 링커 영역(linker region) 및 본 발명에 따른 소마토스타틴 암호화 영역 또한 포함된다.

도 2는 본 발명의 코돈-최적화된(codon-optimized), CAT-결손성 소마토스타틴 폴리펩티드의 예측된 크기에 대응하는 28KD 밴드를 나타내는 예시적인 염색된 SDS-PAGE를 나타낸 것이다. 레인(lane) 1은 LB + IPTG(환원됨)을 나타내고, 레인 2는 LB(환원됨)를 나타내고, 레인 3은 LB + IPTG를 레인 4는 LB를 나타낸다.

도 3A 및 3B는 (실시예에 기재된 바와 같은 백신을 사용하여) 예방접종 되고 조절된 젖소(BSY)의 하루당 1 리터의 우유 생산을 나타내는 표이다. 각각의 소들은 각각의 표에 나타낸 바와 같이 특정 번호 식별(number

identification)을 가진다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0016] SEQ ID NO: 1
- [0017] AGCKNFFWKTFTSC
- [0018] SEQ ID NO: 15
- [0019] GCTGGCTGCAAGAATTCTCTGGAAGACTTCACATCCTGT
- [0020] SEQ ID NO: 2 (His192->GlyJ His193->Gly):
- [0021] Atggagaaaaat cactggataccaccgtt gatat ccaatggcatcgtaagaacat tttgaggcattcagtcagttgctaatgtacctataac
cagaccgtt cagctggatattacggcttttaagaccgtaaagaaaaataagcacaagtttacccgttattcacattctgcccgcgtatgaat
gtcatccgaattccgtatggcaatgaaagacggtagctggatggatagtgttacccctgttacaccgttccatgagcaaactgaaacgtt
tcatcgcttggagtgaataccacgacgatccggcagtttacacatatttcgaagatgtggcgttt
acggtagaaacctggctattccctaagggttattgagaatatgtttcgctcagccatccctgggtgagtttaccagtttggataaacgtgg
ccaatatggacaacttctcgccccgtttaccatggcaatattatacgcaaggcacaagggtgtatgccctggcattcagtttggatggcgg
tttggatggctccatgtcgccgtatgctaatgaactgcagcag
- [0022] SEQ ID NO: 3: (His192->Gly, His193->Gly):
- [0023] Mekkitgytvdisqwhrkehfeafqsvaqctynqtvqlidtaflktvknkhkfypafihilarlmnahpefrmamkdgelviwdsvhpcytvfheqtef
sslwseyhddfrqflhiysqdvacygenlayfpkgfienmffvsanpwsftsfdlnvanmdnffapvftmgkytqgdkvimplaiqvggavcdgfhvgrm
lnelqq
- [0024] SEQ ID NO: 4 (His 193->Gly)
- [0025] Atggagaaaaat cactggataccaccgtt gatat ccaatggcatcgtaagaacat tttgaggcattcagtcagttgctaatgtacctataac
cagaccgtt cagctggatattacggcttttaagaccgtaaagaaaaataagcacaagtttacccgttattcacattctgcccgcgtatgaat
gtcatccgaattccgtatggcaatgaaagacggtagctggatggatagtgttacccctgttacaccgttccatgagcaaactgaaacgtt
tcatcgcttggagtgaataccacgacgatccggcagtttacacatatttcgaagatgtggcgttt
acggtagaaacctggctattccctaagggttattgagaatatgtttcgctcagccatccctgggtgagtttaccagtttggataaacgtgg
ccaatatggacaacttctcgccccgtttaccatggcaatattatacgcaaggcacaagggtgtatgccctggcattcagtttcatggcgg
tttggatggctccatgtcgccgtatgctaatgaactgcagcag
- [0026] SEQ ID NO: 5 (1 His193->Ala)
- [0027] Atggagaaaaat cactggataccaccgtt gatat ccaatggcatcgtaagaacat tttgaggcattcagtcagttgctaatgtacctataac
cagaccgtt cagctggatattacggcttttaagaccgtaaagaaaaataagcacaagtttacccgttattcacattctgcccgcgtatgaat
gtcatccgaattccgtatggcaalgaaagacggtagctggatggatagtgttacccctgttacaccgttccatgagcaaactgaaacgtt
tcatcgcttggagtgaataccacgacgatccggcagtttacacatatttcgaagatgtggcgttt
acggtagaaacctggctattccctaagggttattgagaatatgtttcgctcagccatccctgggtgagtttaccagtttggataaacgtgg
ccaatatggacaacttctcgccccgtttaccatggcaatattatacgcaaggcacaagggtgtatgccctggcattcagtttcatgctggcgg
tttggatggctccatgtcgccgtatgctaatgaactgcagcag
- [0028] SEQ ID NO:6 (1 His+CAT wt)
- [0029] Atggagaaaaat cactggataccaccgtt gatat ccaatggcatcgtaagaacat tttgaggcattcagtcagttgctaatgtacctataac
cagaccgtt cagctggatattacggcttttaagaccgtaaagaaaaataagcacaagtttacccgttattcacattctgcccgcgtatgaat
gtcatccgaattccgtatggcaatgaaagacggtagctggatggatagtgttacccctgttacaccgttccatgagcaaactgaaacgtt
tcatcgcttggagtgaataccacgacgatccggcagtttacacatatttcgaagatgtggcgttt
acggtagaaacctggctattccctaagggttattgagaatatgtttcgctcagccatccctgggtgagtttaccagtttggataaacgtgg
ccaatatggacaacttctcgccccgtttaccatggcaatattatacgcaaggcacaagggtgtatgccctggcattcagtttcatggtggcgg
tttggatggctccatgtcgccgtatgctaatgaactgcagcag
- [0030] SEQ ID NO: 7 (one H->G):

- [0031] Mekkitgyttvdisqwhrkehfeafqsvaqctynqtvqlditaflktvkknkhkfyapafihilarlmnahpefrmamkdgelviwdsvhpcytvfheqtefsslwseyhddfrqflhiysqdvacygenlayfpkgfienmffvsanpwsftsfdhwandnffapvftmgkyytqgdkvimplaiqvhgavcdgfhvgrmlnelqq
- [0032] SEQ ID NO: 8: (H->A)
- [0033] Meldcitgyttvdisqwhrkehfeafqsvaqctynqtvqlditaflktvkknkhkfyapafihilarlmnahpefrmamkdgelviwdsvhpcytvflieqteftsslwseyhddfrqflhiysqdvacygenlayfpkgfienmffvsanpwsftsfdlnvanmdnffapvftmgkyytqgdkvimplaiqvhaavcdgfhvgrmlnelqq
- [0034] SEQ ID NO: 9
- [0035] tgggaactgcaccgttctggccacgcccgtccggaaattcatg
- [0036] SEQ ID NO: 10
- [0037] welhrsgprprprpiefm
- [0038] SEQ ID NO: 11
- [0039] welhrsgp(rp)nefm 여기에서, n>1
- [0040] SEQ ID NO: 12
- [0041] Atggagaaaaatactggatataccaccgttgatataccaatggcatcgtaaagaacatttgaggcattcagtcagttgctcaatgtacctataac
cagaccgtttagctggatattacggctttaaagaccgtaaagaaaaataagcacaagtttatccgccttattcacattctgcccgtatgaat
gctcatccgaattccgtatggcaatgaaagacggtagctggatattggatagtgttaccccttacaccgtttccatgagcaaactgaaacgttt
tcatcgctcggagtgaataccacgacgattccggcagtttacacatataccgaatgtggcgtt
acggtagaaacccgttccctaaagggttattgagaatattgtttcgtctagccatccctgggtgagtttaccagttttgatataacgtgg
ccaatatggacaacttctcgccccgtttcaccatggcaatattatacgcaaggcacaagggtgtatgcccgtggcattcaggttggcgg
tttgtatggctccatgtggccgtatgtaatgaactgcacgactggactgcaccgttctggccacgtccggatccacgtccggattca
tggccggctgcaagaacttcttgaaaaaccttacgagctgc
- [0042] SEQ ID NO: 13
- [0043] mekkitgyttvdisqwhrkehfeafqsvaqctynqWqlditaflktvkknkhkfyapafihilarhhpcytvfliqtefsslwseyhddfrqflhiysqdv
acygenlayfpkgfieruTiffvsanpwsftsfdlnvanmdnffapvftmgkyytqgdkvimplaiqvggavcdgfhvgrmlnelqqwelhrsgprprp
prprefiriagcknffwktftsc
- [0044] SEQ ID NO: 14
- [0045] mekkitgyttvdisqwhrkehfeafqsvaqctynqWqlditaflktvkknkhkfyapafihilarhhpcytvfliqtefsslwseyhddfrqflhiysqdv
acygenlayfpkgfieruTiffvsanpwsftsfdlnvanmdnffapvftmgkyytqgdkvimplaiqvlihavcdgfhvgrmlnelqqwelhrsgprprp
prprefiriagcknffwktftsc
- [0046] 본 발명의 구현은 키메릭 폴리펩티드 및 상기 폴리펩티드를 암호화하고 소마토스타틴의 강화된 면역성을 가지는 핵산 구조물을 제공한다. 본원에서의 구현은 키메릭 단백질을 제조하는 방법뿐만 아니라 표적 가축의 어떤 생산성을 증가시키고, 특히 젖소에서의 우유 생산성 및 소, 돼지, 양, 토끼, 염소, 수송아지 등의 고기 생산을 증가시키기 위하여 키메릭 단백질을 사용하기 위한 방법도 포함한다.
- [0047] 본 발명의 구현은 또한 표적 동물에서의 강화된 면역성, 예방접종 될 표적 동물에 대한 강화된 안전성 및 표적 동물의 사용자, 즉 예방 접종된 동물로부터의 생산품의 소비자에 대한 강화된 안전성을 위하여 본 발명의 키메릭 단백질과 함께 사용하기 위한 신규한 보조제를 포함한다.
- [0048] 하나의 양상에서, 본 발명은 소마토스타틴의 강화된 면역성을 위해 설계된 키메릭 소마토스타틴 단백질을 제공한다. 키메릭 소마토스타틴 단백질의 구현은 실질적으로 불활성화된 클로람페니콜 아세틸 트랜스페라아제 (chloramphenicol acetyl transferase; CAT)가 절단된 단백질에 링커 서열에 의해 연결된 소마토스타틴-14의 아미노산 서열을 포함한다. 몇몇의 경우에 있어서, 상기 링커(본원에서 스페이서(spacer)라고도 칭함)는 표적 숙주 세포에서 키메릭 폴리펩티드의 생산을 강화시키는데 최적화되어 있다. 다른 경우에 있어서, 방법들은 실

질적으로 내독소를 포함하지 않는 상태로 이 증가된 양의 키메릭 단백질을 생산하고 분리할 수 있게 한다.

[0049] 다른 양상에서, 본 발명은 (임의의 동물 유래의 단백질 또는 벤젠과 같은 화학물질을 포함하지 않는) 신규한 보조제 조성물 및 본 발명의 키메릭 소마토스타틴 단백질이 혼입된 백신을 제공한다. 구현은 예기치 못한 효과의 보조제/(전형적으로, 실질적으로 내독소를 포함하지 않는) 키메릭 소마토스타틴 단백질, 즉 예방 접종된 표적 가축들에서 항원성을 유도하기 위한 신규한 백신, 조성물을 포함한다. 어떤 구현에서, 상기 표적 가축은 젖소, 수송아지, 돼지, 염소 등이다. 비록 본 발명의 보조제가 본원에서 키메릭 소마토스타틴 단백질과 결합하는 것으로 기재되어 있으나, 본 발명의 보조제는 다른 백신과 함께, 다양한 표적 동물들, 예를 들어 인간, 돼지, 개, 고양이 등에서 사용될 수 있는 것으로 구상될 수 있음에 유의한다.

[0050] 다른 양상에서, 본 발명의 방법들은 강화된 생산성, 특히 젖소 및 다른 유사 가축들에서의 강화된 우유 생산을 얻기 위하여, 겨우 1회 분량의 이 신규한 백신을 사용하여 표적 가축을 예방 접종할 수 있게 한다. 이 향상된 투약 방법(더 적은 수의 예방접종 및 더 적은 농도의 키메릭 소마토스타틴)은 시간의 유효성 및 낮은 비용을 가능하게 하며, 유업(dairy industry)으로 확장되었을 때 가축 생산성에 있어서 현저한 향상을 나타낸다. 또한, 본원에서 상기 방법들은 건강 관리 산업(health care industry) 내에서 염려하는 즉, 표적 가축 및 최종 사용자 모두에 대한 재조합 성장 호르몬 치료의 사용 및 재조합 성장 호르몬의 배출물이 지하수 내로 방출되는 환경을 예방한다.

정의

[0052] 하기의 정의들은 본원에서 빈번하게 사용되는 어떤 용어의 이해를 용이하게 하기 위하여 제공되며, 본 발명의 명세 범위를 제한하고자 하는 것이 아니다.

[0053] 상기 용어 "아미노산(amino acid)"은 임의의 20개의 자연적으로 생성된 아미노산뿐만 아니라 임의의 변경된 아미노산 서열을 말한다. 변경은 번역후 처리과정(posttranslational processing)과 같은 자연적인 과정을 포함할 수 있거나, 당업계에 공지된 화학적 변경을 포함할 수 있다. 변경은 인산화(phosphorylation), 유비퀴틴화(ubiquitination), 아세틸화(acetylation), 아미드화(amidation), 글리코실화(glycosylation), 플라빈(flavin)의 공유 부착(covalent attachment), ADP-리보실화(ADP-ribosylation), 가교결합(cross-linking), 요오드화(iodination), 메틸화(methylation) 등을 포함하지만, 이로 제한되지는 않는다.

[0054] 상기 용어 "키메릭 폴리펩티드(chimeric polypeptide)" 또는 융합 단백질(fusion protein)은 1차 및 2차 폴리펩티드가 인 프레임(in frame)으로 발현되도록 하기 위하여, 부착된 제2차, 이종 폴리펩티드(heterologous polypeptide)를 가지는 1차 폴리펩티드를 말한다. 종종 상기 두 개의 폴리펩티드는 본 발명의 키메릭 폴리펩티드의 발현 및 기능을 최적화하기 위하여 링커 또는 스페이서 단편(segment)를 통하여 부착될 수 있다.

[0055] 상기 용어 "내독소(endotoxin)"는 그람 음성 세균의 세포벽에 결합되어 있는 독소를 말한다. 몇몇의 경우에 있어서, 상기 독소들은 그람 음성 세균 세포벽의 외막의 세균성 막 성분의 지질 다당류(lipopolysaccharide) 성분이다.

[0056] 상기 용어 "숙주 세포(host cell or cells)"는 생체 외(ex vivo) 배양에서 확립되는 세포를 말한다. 본원에 논의되는 숙주 세포들은 본 발명의 키메릭 단백질을 발현할 수 있는 것을 특징으로 한다. 본 발명의 양상에 유용한 적절한 숙주 세포의 예는 세균, 효모, 곤충 및 포유동물의 세포를 포함하지만 이로 제한되지는 않는다. 이와 같은 세포의 특정 예는 SF9 곤충 세포(Summers and Smith, 1987, Texas Agriculture Experiment Station Bulletin, p1555), *E.coli* 세포(BL21(DE3), Novagen), 효모(Pichia Pastoris, Invitrogen) 및 인간 간 세포(Hep G2(ATCC HB8065)를 포함한다.

[0057] 상기 용어 "핵산 서열(nucleic acid sequence)"은 디옥시리보핵산(deoxyribonucleic acid)의 가닥에 따른 디옥시리보뉴클레오티드(deoxyribonucleotide) 서열의 순서를 말한다. 이 디옥시리보뉴클레오티드의 순서는 폴리펩티드 사슬에 따른 아미노산의 순서를 결정한다. 상기 디옥시리보뉴클레오티드 서열은 아미노산 서열을 암호화 한다.

[0058] 상기 용어 "단백질(protein)", "펩티드(peptide)" 및 "폴리펩티드(polypeptide)"는 아미노산 폴리머 또는 두 개 또는 그 이상의 상호작용하거나 결합된 아미노산 폴리머의 세트를 나타내는데 상호교환적으로 사용된다.

[0059] 상기 용어 "실질적으로(substantially)"는 "대부분(great extent)"을 말하며, 예를 들어, 실질적으로 제거된다 는 것은 적어도 75%, 더욱 일반적으로는 적어도 80%, 85%, 90%, 95% 및 가장 일반적으로는 96%, 97%, 98%, 99%

의 표적 물질이 제거된다는 것을 의미하고; 실질적으로 불활성이라는 것은 적어도 75%, 더욱 일반적으로는 80%, 85%, 90%, 95% 및 가장 일반적으로는 96%, 97%, 98%, 99%의 효소가 불활성화된다는 것을 의미한다. 그와 같이, 실질적으로 불활성인 CAT 효소는 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 그 활성이 제거된 것이다. (CAT 활성은 공지의 기능성 검정법(functional assay)을 사용하여, 예를 들어 방사성 동위원소가 표지된 클로람페니콜에 대한 n-부티릴(n-Butyryl)의 결합 및 그 후의 액체 싼틸레이션 카운팅(liquid scintillation counting; LCS)에 의한 측정; 박층 크로마토그래피(thin chromatography)에 의해 [¹⁴C]아세틸-CoA에서 클로람페니콜로 이동해간 방사성 표지의 양을 측정함으로써(Molecular Cloning: A Laboratory Model, 3rd ed., J Sambrook and DW Russell, 2001. Cold Spring Harbor Press), 또는 다른 공지의 또는 유사 검정법을 사용하여 측정될 수 있다.)

[0060] 상기 용어 "벡터(vector)"는 하나의 세포에서 다른 세포로 DNA 단편(들)을 이동시키는 핵산 분자를 칭하는데 사용된다. 상기 용어 "비히클(vehicle)"은 때때로 벡터와 상호교환적으로 사용된다. 두 개의 일반적인 형태의 벡터는 플라스미드(plasmids) 및 바이러스(viral) 벡터이다.

0061] 소마토스타틴

[0062] 다수의 연구들이 소마토스타틴으로 면역화된 동물들이 10-20%의 평균 체중 증가량(average daily gain)을 가지고, 식욕이 9% 정도로 감소되며, 사료 이용의 효율이 11% 증가하였음을 보여주었다. 소마토스타틴으로 면역화된 동물 및 그 자손들 또한 정확한 비율을 가지며, 근육, 뼈 및 지방 사이의 동물의 중량 분포는 대조군 동물에서와 동일하다(Reichlin, 1987을 참조). 따라서, 소마토스타틴 면역화는 표적 동물의 생산성을 강화시키는 유용하고 안전한 방법을 제공한다. 이것은 특히 처리된 동물들로부터의 우유 또는 고기 내부의 호르몬 또는 동물들 자체의 안전성 또는 생태계, 특히 지하수에서의 호르몬의 증가에 대한 높은 문제를 가지는 재조합 성장 호르몬의 사용과 비교하였을 때의 경우이다.

[0063] 소마토스타틴-14는 시상하부 및 위장관에서 생산된 생물학적 활성 테트라데카펩티드(tetradecapeptide)이다. 상기 테트라데카펩티드의 아미노산 서열은 AGCKNFFWKFTFTSC(SEQ ID NO:1)이다. 소마토스타틴-14의 서열은 포유 동물 사이에서 매우 보존적이다(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). 상기 테트라데카펩티드는 핵산 서열 GCTGGCTGCAAGAATTCTCTGGAAAGACTTCACATCCTGT(SEQ ID NO:15)로 암호화되어 있다(다른 핵산 서열들은 SEQ ID NO:1을 코딩하는데 사용될 수 있다; 그러나, SEQ ID NO:15는 예시적인 목적으로 제공됨에 유의하라).

[0064] 소마토스타틴-14는 동물에서 성장 및 사료의 이용에 관련된 다수의 호르몬에 강한 저해 효과를 가지는 것으로 알려져 있다. (사실상 참조로서 본원에 통합되어 있는) 미국 특허등록번호 제6,316,004호에 이미 기재되어 있는 바와 같이, 소마토스타틴-14 및 소마토스타틴의 키메릭 형태는 일일 체중의 증가 및 적절한 경우, 우유 생산을 위한 동물의 면역화에 사용될 수 있다. 이 면역화 방법들은 기존의 보조제를 사용하여 수행되며, 본 발명의 소마토스타틴에 기초한 물질을 사용하지 않는다. 항-소마토스타틴 항체를 사용한 표적 동물들의 치료는 몹시 비용이 비싸고 기능적으로 뛰어나지 않으며, 그것에 의하여 비실용적인 것으로 직접 항체 치료는 없어졌다는 것에 유의하라(Muromtsev G.S., et al., 1990, Basics of agricultural biotechnology, Agropromizdat, Moscow, pp 102-106). 본 발명의 하나의 양상은 본원에 기재된 조성물 및 방법에 의해 형성된 항-소마토스타틴 항체가 표적 동물 내에서 감소하지만 소마토스타틴의 대부분의 저해 작용을 완전하게 제거하지는 않는다는 컨셉에 기초하고 있다. 이 과정은 면역화된 표적 동물에서 성장 및 생산성의 자연적이고 균형잡힌 증가를 야기한다.

[0065] 그와 같이, 본 발명의 양상은 표적 동물을 면역화시키는데 사용하기 위한 매우 면역성이 높은 물질을 제공함으로써 소마토스타틴에 기초한 면역화를 용이하게 한다. 이 소마토스타틴에 기초한 면역화 화합물은 발현 및 항원성에 최적화되어 있다. 몇몇의 구현에서, 소마토스타틴-14는 코돈-최적화된 CAT-결손성 소마토스타틴 키메릭 폴리펩티드로서 발현된다. 이 물질들은 다른 면역화에 기초한 백신들에 비하여 예기치 않은 향상을 제공한다.

0066] 신규한 코돈-최적화된, CAT-결손성 소마토스타틴 구조물

[0067] 본 발명의 하나의 양상은 최적화된 소마토스타틴 면역 활성을 가지는 키메릭 단백질을 암호화하는 분리된 핵산 분자들을 제공한다. 특히, 본 발명의 구현은 소마토스타틴에 대한 면역 활성을 가지는 CAT 융합 단백질을 암호화하는 분리된 핵산 분자들을 제공한다.

화하는 신규한 핵산 구조물을 포함한다. 이 폴리펩티드들은 면역화 방법에서 최적의 기능적 활성을 가지는 것으로 확인되었다.

[0068] 하나의 구현에서, 도 1에 나타낸 것과 같은 개략도를 가지는 구조물이 본 발명의 키메릭 폴리펩티드를 암호화하기 위하여 제공된다. 본 발명의 핵산 구조물은 일반적으로 10개의 C-말단 아미노산을 포함하지 않고, 아미노산으로 대체된 하나 또는 두 개의 히스티딘을 포함하는 불활성 CAT 효소를 암호화한다. CAT의 실질적인 불활성화는 주사된 표적 동물에서 CAT에 대한 부작용을 예방한다(또한 그것에 의하여 CAT 내성을 회피한다). 클로람페니콜은 축산업에서 일반적으로 사용되는 항생제이며, 소에서의 클로람페니콜에 대한 내성을 본 발명의 물질을 사용하여 예방접종을 한 동물의 안전성에 불리할 수 있다. 그와 같이, 불활성화된 CAT을 가지는 구조물은 예방접종된 동물에서 내성의 부작용(동물에 대한 해결하기 어려운 안전성 논쟁)이 없는 CAT의 면역성을 가진다.

[0069] 상기 CAT 효소는 His 193의 이미다졸기를 제거함으로써 불활성화된다(카노니컬 CAT_{III} 변이체(canonical CAT_{III} variant)에서의 His 193, 하기의 Lewendon et al을 참고하라). 다른 구현에서, CAT 효소는 His 193 양쪽 및 His 192 주변의 이미다졸기(각각 CAT_{III}에 대하여 His 195 및 His 194)를 제거함으로써 불활성화된다. CAT의 활성 부위로부터 필수 His 193(CAT_{III}에서의 His 195) 이미다졸기의 제거 및 알라닌, 글리신 또는 다른 아미노산으로의 치환은 CAT 효소의 실질적인 불활성화를 야기한다(Lewendon A et al. (1994)). 클로람페니콜 아세틸 트랜스페라아제의 축매성 히스티딘-195의 치환은 글루타메이트에 대한 일반적인 염기(general base)의 역할에 대한 증거이다(Biochemistry. 33(7):1944-50). 마지막으로, 본원에서의 구현은 또한 His 192(CAT_{III}에 대한 His 194) 단독의 이미다졸기의 제거를 통한 CAT 효소 불활성화를 포함할 수 있다. His 193에 관하여, 치환은 알라닌, 글리신 또는 다른 아미노산으로 치환될 수 있다.

[0070] 어떤 양상에 있어서, 하나 또는 그 이상의 치환된 히스티딘 아미노산은 (SEQ ID NO:3에서 아미노산 번호 192 및 193에 해당하는) SEQ ID NO:2의 위치 번호(position number) 574-576 및 577-579에 위치하는 핵산에 의하여 암호화된다. 어떤 구현에서, 본 발명의 핵산 서열은 SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5 및 SEQ ID NO:6을 포함한다. 본원의 구조물로 치환된 히스티딘을 포함하는 본 발명의 키메릭 단백질은 CAT 활성이 거의 없고, 종래에 존재하는 것들에 비하여 현저히 향상된 고면역성 단백질을 제공한다. 실질적으로 불활성화된 CAT 효소의 구현은 본 발명의 소마토스타틴 폴리펩티드에 부착된다. 이 부착은 (하기에 더욱 충분히 기재되는 바와 같이) 직접적으로 또는 링커를 사용하여 이루어질 수 있다.

[0071] 표적 부위(His 192 및/또는 His 193)의 불활성화는 부위-지정 돌연변이(site-directed mutagenesis) 및 합성 유전자 어셈블리(synthetic gene assembly)를 포함하는 많은 당업계에 공지된 방법들을 통하여 달성될 수 있다. 하나의 구현에서, 히스티딘 193을 암호화하는 핵산 서열은 알라닌, 글리신 또는 다른 아미노산을 암호화하도록 변경된다. 다른 구현에서, 히스티딘 192를 암호화하는 핵산 서열은 알라닌, 글리신 또는 다른 아미노산을 암호화하도록 변경된다. 192 및 193 키메릭 폴리펩티드를 위한 전형적인 결합 치환은 알라닌, 알라닌; 알라닌, 글리신; 글리신, 알라닌; 및 글리신, 글리신을 포함한다.

[0072] 본 발명의 구현은 또한 (193에서 his → gly, 193에서 his → ala 및 192 및 193 모두에서 his → glyd에 해당하는) SEQ ID NO:7, 8 및 3을 가지는 아미노산 서열을 포함하는 본 발명의 CAT 결손성 폴리펩티드에 대한 아미노산 서열을 포함한다.

[0073] 도 1에 나타낸 바와 같이, 실질적으로 활성이 없는 CAT 효소는 가변 길이 스페이서(variable length spacer)를 통하여 소마토스타틴-14와 연결될 수 있다. 상기 스페이서는 광범위한 표면상에서 암호화된 소마토스타틴을 제시하는데 필요하다. 본원에서의 스페이서의 구현은 본 발명의 링커 서열을 가지지 않는 구조물에 비하여 예기치 않은 향상을 나타내는 본 발명의 키메릭 폴리펩티드에서 최적의 프로테아제 내성(protease resistance) 및 최적의 에피토프 노출(epitope exposure) 및 혼입(inclusion)을 제공한다.

[0074] 따라서, 스페이서 구현은 다양한 미생물들, 특히 *E.coli*에서 CAT-결손성 소마토스타틴의 발현을 보장하기 위한 길이 및 구성에 최적화되어 있다. 미국 특허등록번호 제6,316,004호에 기재된 것과 같은 원래의 구조물은 회귀 *E.coli* 코돈(rare *E.coli* codon)을 가지는 스페이서에 포함되고, 2차 또는 보조 플라스미드(helper plasmid)로부터의 회귀 tRNA들의 공통발현(co-expression)이 요구된다. 본원의 스페이서 구현은 이러한 회귀 *E.coli* 코돈을 제거하여 2차 보조 플라스미드에 대한 필요성을 없애고, 종래 기술 이상의 향상을 이루었다.

[0075] 전형적인 구현에서, 상기 스페이서는 tgggactgcaccgtctggccacgcggccctcgccacgtccgaaattcatg(SEQ ID NO:9)의 핵산 서열을 가진다. 본 발명의 스페이서 중 하나의 예는 welhrsgprprprpcef(m(SEQ ID NO:10)의 아미-

노산 서열을 가진다. 본 발명의 스페이서에 대한 전형적인 아미노산 서열은 welhrsgp(rp)_nefm(SEQ ID NO:11)이며, 여기에서 $n > 1$ 이다. 상기에 언급한 바와 같이, 이러한 신규한 스페이서 서열들은 강화된 프로테아제 내성(그것에 의하여 미국 특허등록번호 제6,316,004에 기재된 구조물에 비하여 증가된 생산을 가능하게 한다) 및 최적의 소마토스타틴-14 노출을 제공한다. 최적으로 구성된 링커에 의해 실질적으로 불활성화된 CAT 효소(히스티틴 치환된 구조물)에 부착된 소마토스타틴-14의 조합은 강화된 생산성을 위하여 표적 동물을 면역화시키는 데 사용될 때 다른 기존의 물질들에 비하여 예기치 못한 놀라운 향상을 나타낸다.

[0076] 비록 기능에 있어서 그만큼 최상은 아니나, 다른 가변 길이의 링커 서열도 소마토스타틴-14를 실질적으로 불활성인 CAT 효소에 부착시키는데 사용될 수 있다. 게다가, 소마토스타틴-14의 실질적으로 불활성인 CAT 효소에 대한 직접적인 융합 또한 본원에서 사용될 수 있으며, 본 발명의 범위 내에 있는 것으로 고려될 수 있다.

벡터 및 숙주 세포

[0078] 본 발명은 또한 본 발명의 폴리뉴클레오티드 분자들을 포함하는 벡터뿐만 아니라 이와 같은 벡터로 형질전환된 숙주 세포에 관한 것이다. 본 발명의 임의의 폴리뉴클레오티드 분자들은 관심있는 종식 숙주에 대한 선택적 마커 및 복제 원점을 일반적으로 포함하는 벡터에 결합될 수 있다. 숙주 세포들은 이 벡터들을 포함하도록 유전적으로 조작되어 본 발명의 폴리펩티드를 발현한다. 일반적으로, 본원의 벡터들은 미생물 또는 바이러스 숙주 세포와 같은 적절한 전사 또는 번역 조절 서열과 작동가능하게 연결된 본 발명의 폴리뉴클레오티드 분자들을 포함한다. 조절 서열의 예는 전사 프로모터(transcriptional promoters), 오퍼레이터(operators) 또는 인핸서(enhancers), mRNA 리보솜 연결 부위(mRNA ribosomal binding sites), 및 전사 및 번역을 조절하는 적절한 서열을 포함한다. 뉴클레오티드 서열들은 본원의 조절 서열들이 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 암호화하는 키메리 폴리펩티드에 기능적으로 관련된 경우 작동가능하게 연결된다.

[0079] 전형적인 비히클은 플라스미드(plasmids), 효모 셔틀 벡터(yeast shuttle vectors), 바클로바이러스(baculovirus), 불활성화된 아데노바이러스(inactivated adenovirus) 등을 포함한다. 하나의 구현에서, 상기 비히클은 변경된 pET30b CatSom 플라스미드(도 1을 참조)이다. 본원에서 사용하기 위한 표적 숙주 세포는 박테리아 숙주, 예를 들어 *E.coli*, 효모, SF-9 곤충 세포, 포유동물 세포, 식물 세포 등을 포함한다.

[0080] 하나의 구현에서, 상기 조절 서열은 *E.coli* 또는 다른 미생물에서 본 발명의 키메리 폴리펩티드의 발현을 위한 T7lac, CAT, Trp 또는 T5 프로모터를 포함한다. 이 조절 서열들은 당업계에 잘 알려져 있으며, 적절하고 공지된 조건 하에서 사용된다.

[0081] 유전적으로 변경된 녹색 식물 세포가 발현에 이용될 경우, 플래닛 바이오테크놀로지사(planet biotechnology)에 의해 개발된 것과 같은 시스템 및 그 밖의 것들이 사용될 수 있다.

[0082] 본 발명의 다양한 플라스미드들은 표적 조절 서열의 이용을 통하여 본 발명의 키메리 폴리펩티드의 발현을 위하여 제작된다. 실례가 되는 플라스미드는 T7lac 프로모터(도 1을 참조)를 포함할 수 있다.

[0083] 표적 키메리 폴리펩티드의 발현을 위한 숙주 세포는 원핵생물, 효모 및 고등 진핵생물을 포함한다. 실례가 되는 원핵생물 숙주는 에스케리키아(*Escherichia*), 바실러스(*Bacillus*) 및 살모넬라(*Salmonella*)속 뿐만 아니라 슈도모나스(*Pseudomonas*) 및 스트렙토마이세스(*Streptomyces*)속의 박테리아를 포함한다. 전형적인 구현에서, 숙주 세포는 에스케리키아 속이며, 에스케리키아 콜라이(*Escherichia Coli*; *E.coli*)일 수 있다.

[0084] 하기의 실시예에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 구조물은 다양한 조건하에서 최적의 CAT 결손성 소마토스타틴의 발현을 제공한다. 이 구조물들은 특히 원핵생물 숙주 및 특히 에스케리키아 속의 박테리아에서의 발현에 효과적이다. 다양한 식물 발현 시스템들 또한 본 발명의 환경에서 사용될 수 있으며, 전형적으로 아그로박테리움 트라메피시에스(*Agrobacterium Trameficies*)를 사용한다.

내독소를 포함하지 않는 융합 단백질 정제

[0086] 본 발명의 양상은 동물의 예방접종 및 특히 어떤 경우에 있어서 미국에서 나고 자란 젖소인 가축의 예방접종에 사용하기 위한 내독소를 포함하지 않는 코돈-최적화된, CAT-결손성 소마토스타틴의 사용을 포함한다. 내독소를 포함하지 않는 물질은 미국에서 나고 자란 소에 특히 중요하다(예를 들어, 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. Paul을 참조).

[0087] 하나의 구현에서, 본 발명의 키메릭 면역성 소마토스타틴-포함 단백질은 적절한 소마토스타틴-함유 비히클로 표적 세포를 형질전환시킴으로써 제조된다. 상기에 언급한 바와 같이, 본원에 사용하기 위한 비히클은 선택된 표적 세포에서의 발현에 적합한 공지의 플라스미드 및 벡터 시스템을 포함한다.

[0088] 본 발명의 양상에서, 키메릭 면역성 소마토스타틴-포함 단백질은 표적 숙주 세포에서 발현된다. 키메릭 단백질 발현은 표적 조절 서열을 사용하여 수행된다. 어떤 양상에서, 상기 키메릭 폴리펩티드는 *E.coli*에서의 발현을 위하여 (특히, 본원에 기재된 스페이서 서열에 관하여) 최적화된다.

[0089] 그 후, 키메릭 단백질은 예를 들어, 리소자임 용해(lysozyme lysis), 봉입체(inclusion bodies)의 편차 원심분리(differential centrifugation), 분자체 크로마토그래피(sieve chromatography) 등을 포함하는 공지의 단백질 정제 기술에 따라 정제될 수 있다. 리폴딩(refolding) 방법은 알칼리성 pH에서 구아니딘 클로라이드(guanidine chloride) 및 우레아(urea)에서 수행되고 그 후 투석(dialysis) 및 동결건조(lyophilization)될 수 있다.

[0090] 하나의 구현에서, *E.coli* 세포는 코돈-최적화된, CAT-결손성 소마토스타틴을 함유하는 플라스미드-pET30b CatSom을 이용하여 형질전환되며, 상기 pET30b CatSom은 발현을 위한 적절한 *E.coli* 염기 조절 서열을 가진다. 어떤 경우에 있어서, 대략 10 리터의 이 세포들의 발효는 총 바이오매스(biomass) 중 적어도 500 그램, 어떤 경우에 있어서는 600 그램을 제공하며, 총 단백질의 약 4-6그램을 산출한다. 실버 및 쿠마시 블루 염색(silver and coomassie blue staining)으로부터 반 이상의 단백질이 키메릭 단백질일 수 있는 것으로 추정되었다(실시예 2 및 도 2를 참조).

[0091] 본원의 어떤 구현에서, 본 발명의 키메릭 단백질은 실질적으로 내독소를 포함하지 않은 상태로 형질전환된 숙주 세포로부터 정제된다. 실질적으로 동물의 면역반응이 제대로 발휘되지 못하게 하는 내독소 및 특히 어떤 동물, 특히 젖소에서의 내독소에 대한 다중 노출(미국에서 자고 나란 젖소에서의 유선염(mastitis) 및 내독소 쇼크(shock))은 본 발명이 예기치 않은 놀라운 결과를 얻을 수 있게 하였음을 깨달았다. 이러한 깨달음은 젖소의 예방접종에 있어서 내독소 1회 복용량 또는 수의 노출을 없애거나 낮추기 위한 시도를 하게 하였다. 이 내독소에 기초한 효과는 젖소가 다른 품종의 소로부터 파생되기 때문에 러시아 및 다른 나라에서 나고 자란 소에서 깨닫는 것보다 훨씬 적음에 유의하여야 한다(Holstein Association, 1 Holstein Place, Brattleboro, Vermont 05302-0808). 미국 젖소에서의 이러한 발견은 일반적으로 몇몇의 다른 유럽 마켓에서 소마토스타틴을 이용하여 예방접종할 때의 경우와 같이 백신이 동물의 면역반응을 최대화시키는데 도움을 주기 위하여 약간 적은 양의 내독소를 포함하여야만 한다는 예상에 반하는 것이다(US Patent No. 6,316,004).

[0092] 그와 같이, 본원의 어떤 구현은 백신에 사용하기 위한, 특히 축산업에서 사용되는 백신 및 미국 내의 축산업에서 사용되는 백신에 사용하기 위한, 실질적으로 내독소를 포함하지 않은 키메릭 단백질의 생산을 겨냥하고 있다. 어떤 구현에서 내독소의 레벨은 1 EU/ml이거나 그 이하이며, 다른 구현에서 내독소의 레벨은 실질적으로 제거되었다. 즉, 본 발명의 키메릭 폴리펩티드는 실질적으로 내독소를 포함하지 않는다.

[0093] 하나의 구현에서, 용해된 숙주 세포로부터 회수된 IB는 내독소가 전혀 없는 세척액, 즉 내독소를 포함하지 않는 물 또는 용액을 사용하여 여러 번 세척된다. 회수된 IP 펠릿(pellet)은 선택적으로 내독소의 레벨이 대략 1 EU/ml 이하가 될 때까지 세척될 수 있다(내독소 테스트는 MP Biochemicals, Charles River, etc로부터의 상용의 테스트 키트를 포함하는 하나 또는 그 이상의 공지의 검정법을 사용하여 수행될 수 있다). 어떤 구현에서, 상기 세척액은 내독소를 포함하지 않으며, 하나 또는 그 이상의 단백질 가수분해성 단백질 억제제(proteolytic protein inhibitor), 예를 들어 페닐메탄술포닐플루오라이드(phenylmethanesulphonyl fluoride; PMSF), 4-(2-아미노에틸)-벤젠술포닐 플루오라이드(4-(2-aminoethyl)-benzenesulphonyl fluoride; AEBSF) 등을 포함한다. 어떤 구현에서, 상기 세척액은 저해에 유효한 양의 PMSF, AEBSF 또는 PMSF와 AEBSF 둘의 조합을 가지는 인산 완충식염수(phosphate buffered saline; PBS)이다.

[0094] 어떤 양상에 있어서, 실질적으로 내독소를 포함하지 않는 펠릿은 우레아를 포함하는 pH 12.5에서 단백질 언폴딩 용액(protein unfolding solution)으로 처리될 수 있고, 아르기닌, 글리세롤 및/또는 수크로오스와 함께 감소된 몰농도의 우레아를 포함하는 단백질 리폴딩 용액(protein refolding solution)으로 리폴딩된다. 정제된 키메릭 단백질의 농도는 1 및 3 mg/ml 사이 및 전형적으로 약 1.4 내지 1.8 mg/ml 사이로 변경된다. 어떤 경우에 있어서, 실질적으로 내독소를 포함하지 않는 키메릭 단백질은 약 1.5 내지 5 mg/2ml 1회분 및 더욱 전형적으로는 2.0 내지 3.5 mg/2ml 1회분의 백신 제형으로 제공된다.

[0095] 다른 내독소 제거 방법은 본 발명의 범위 내에 있는 것으로 간주되며, 예를 들어 상용의 이온-교환 내독소 제거 컬럼, 소수성 컬럼 등을 포함할 수 있다(예를 들어, 머스탱(Mustang) E 또는 G 컬럼(Millipore)을 참조하라).

[0096] 강화된 면역반응 보조제

[0097] 본 발명의 구현은 체액성 면역반응(humoral immunity)의 유도를 강화하기 위한 새로운 보조제를 제공한다. 이 보조제는 체액성 면역반응의 유도에 대하여 기존의 물질들에 비하여 현저한 향상을 제공한다. 본원의 보조제는 많은 백신들에 사용될 수 있으나, 젖소, 돼지 또는 수송아지에서의 예방접종을 위한 본 발명의 폴리펩티드를 이용한 실시예로 나타나 있다.

[0098] 중요하게는, 본원의 보조제의 모든 성분들은 비동물성(non-animal origin) 성분들이므로, 오염될 가능성이 있는 보조제 성분들로부터 예방접종된 동물들의 교차-오염 가능성이 제거된다. 예를 들면, 본원의 구현은 동물성을 포함하지 않는 트윈 80(Tween 80)을 사용할 수 있다. 이것은 광우병(bovine spongiform encephalopathy; BSE) 또는 다른 솟과의 병(bovine ailments)에 대한 염려 때문에 표적 동물이 젖소일 경우 특히 중요하다. 이러한 염려들은 비동물성 보조제가 현저한 안전성의 이점을 제공하는 경우 인간의 치료에 등등하게 적합하다는 것에 유의하여야 한다. 부가적으로, 본원의 보조제 구현은 벤젠 및 다른 발암성 화합물을 포함하지 않는다. 이 구현들은 대부분의 기존의 보조제 화합물에서 가능하지 않았던 안전성의 이점을 제공한다. 예를 들어, 본원의 구현은 카보폴®974P(Carbopol®974P) 또는 벤젠을 포함하지 않는 폴리시클릭산(polymeric acid)을 사용할 수 있다.

[0099] 하나의 구현에서, 면역학적 보조제는 에멀젼 프리믹스(emulsioni premix) 내에 혼합된 선택된 항원과 함께 오일-인-워터(oil-in-water) 에멀젼을 포함한다.

[0100] 본원에서 사용하기 위한 실례가 되는 오일-인-워터 에멀젼은 미네랄 오일(mineral oil), 트윈 80(Tween 80), 스팬 85(Span 85) 및 표적 폴리머(벤젠을 포함하지 않는 폴리아크릴산)의 조합을 포함한다. 어떤 경우에 있어서, 상기 표적 폴리머는 카보머 호모폴리머 타입 B(Carbomer Homopolymer Type B)로 이루어진 군으로부터 선택된다. 전형적인 오일-워터 에멀젼은 약 8-10%의 미네랄 오일(v/v), 0.003 내지 0.004%의 트윈 80(v/v), 0.007 내지 0.008 스팬 85(v/v) 및 0.04 내지 0.06%의 폴리머(w/v)로 구성된다.

[0101] 본 발명의 실례가 되는 에멀젼 프리믹스는 대략 50% 오일-수성 기재(oil-aqueous base)로 고분자량 폴리머, 계면활성제 및 유화제(emulsifier)로 이루어진다. 본원에 사용하기 위한 고분자량 폴리머는 펜타에리트리톨(pentaerythritol)의 알릴 에테르(allyl ethers)와 가교결합된 아크릴산을 포함한다. 어떤 경우에 있어서, 상기 고분자량 폴리머는 약 29,000 및 40,000 사이의 브룩필드(Brookfield) RVT 점도를 가지며, 예를 들어 카보폴®974P(Carbopol®974P)(Noveon, Inc)이다.

[0102] 젖소 또는 다른 표적 가축들에서 최적화된 면역반응을 얻기 위한 방법

[0103] 본 발명의 조성물 및 방법에 따라서, 본원에 기재된 면역 조성물(내독소를 포함하지 않는, 코돈-최적화된, CAT-결손성 소마토스타틴 구조물)은 본 발명의 백신을 제공하기 위하여 상기에 기재된 바와 같이 신규한 보조제와 결합된다. 하나의 구현에 있어서, 내독소를 포함하지 않는 코돈-최적화된 CAT 결손성 소마토스타틴 구조물은 2.98mg/2ml의 총 투약량(5% 내지 25%의 보조제(v/v), 더욱 전형적으로는 10% 내지 20%의 보조제 및 더욱 전형적으로는 약 20%의 보조제)으로 투여된다. 다른 기존의 보조제들도 본 발명의 범위 내에 있는 것으로 간주되며, 본 발명의 코돈-최적화된 CAT-결손성 소마토스타틴 구조물과 함께 사용될 수 있으나, 최적의 결과는 본원의 신규한 보조제가 이러한 용량으로 사용될 경우 나타난다.

[0104] 신규한 소마토스타틴 구조물 및 보조제의 목적은 표적 동물, 전형적으로는 가축, 더욱 전형적으로는 젖소, 수송아지, 양, 돼지 또는 염소의 생산성을 증가시키기 위한 것이다.

[0105] 제조물은 근육내(intramuscularly) 또는 피하내(subcutaneously)로, 바람직하게는 12번보다 적게, 더욱 바람직하게는 6번보다 적게, 그리고 어떤 경우에 있어서는 단지 한번만 주사된다. 표적 동물에 한 번 이상의 주사가 필요한 경우, 전형적으로 다음 주사 전 14 내지 28일의 간격을 둔다. 상기에 언급한 바와 같이, 본원의 구현은 표적 동물에 대한 재조합 호르몬 처리의 사용을 피하고, 축산업계에서의 주요 이익을 제공한다(재조합 성장 호르몬은 소녀에서 사춘기의 이른 개시 및 처리된 소로부터의 거름이 지표 및 지하 환경 모두에 유해한 효과를 가

져올 수 있다는 다양한 환경적 염려와 관련이 있다).

[0106] 본 발명의 멀균 조성물은 피하내 또는 근육내 방법으로 투여될 수 있다. 전형적인 경우에 있어서, 투여 부위는 표적 동물의 목 또는 꼬리이나, 다른 부위도 이용될 수 있다. 거부반응(adverse reaction)이 동물의 움직이고, 먹고, 마시는 등의 능력을 방해하지 않도록 하는 그런 부위가 사용되어야만 한다는 것에 유의하라.

[0107] 상기에 언급한 바와 같이, 본원에 기재된 신규한 보조제를 사용하는 전형적으로 내독소를 포함하지 않은 상태의 본원의 백신은 젖소, 소, 돼지 등의 고기 및 우유 생산에 현저한 향상을 제공한다. 이 치료는 그러나 사료 섭취량(feed consumption) 증가를 동반하지는 않는다.

실시예

[0108] 하기의 실시예들은 실례를 위한 목적으로만 제공되며, 본 발명의 범위를 제한하고자 하는 것이 아니다.

실시예 1 : CAT-결손성 소마토스타틴 융합 단백질의 제작

[0111] 본 실시예는 본 발명의 구현에 따른 CAT-결손성 소마토스타틴 융합 단백질의 생산을 설명한다. His 192 및 193을 글리신 잔기로 치환하기 위하여, 플라스미드 pET30b-Cat-Som 상에서 부위-지정 돌연변이를 수행하였다(변경 후: Gly 192 및 Gly 193). His 193(및 His 192) 잔기의 불활성화는 프로토온을 받아들이기 위한 CAT 효소의 능력을 제거하였으며, 그것에 의하여 CAT의 완전한 불활성화가 이루어졌다.

[0112] (His 치환을 가지는) 동일한 pET30b-Cat-Som에서 스페이서는 공통발현된 tRNA 분자들의 부재하에서 *E. coli*에 의한 발현을 위하여 코돈에 최적화되었다.

[0113] 변경된 CAT-결손성 소마토스타틴 핵산 구조물을 SEQ ID NO:12로 나타내었다. 상기 CAT-결손성 소마토스타틴 융합 단백질 서열은 변경되지 않은 CAT-소마토스타틴 융합 단백질(SEQ ID NO:14)와 비교될 SEQ ID NO:13으로 기재하였다.

실시예 2 : 고농도로 발현될 수 있는 CAT-결손성 소마토스타틴 융합 단백질

[0115] 실시예 1에 기재된 것과 같은 코돈 최적화된 CAT-결손성 소마토스타틴 구조물을 BL21(DE3) 세포에서 융합 단백질을 발현하는 데 사용하였다. 형질전환된 세포들을 LB에서 배양하고, 대략 3시간 동안 0.4mM IPTG으로 유도시켰다. 밀도 OD 0.7의 1ml의 세포 배양액을 펠릿화시키고, 100 μl SDS 샘플 버퍼에서 10분간 70°C에서 가열하였다. 40 μl 샘플의 세포 추출물을 SDS PAGE의 레인에 로딩하였다.

[0116] 도 2에 나타낸 바와 같이, 코돈 최적화된 CAT-결손성 소마토스타틴 융합 단백질의 예측 사이즈에 대응하는 28KD의 밴드가 IPTG를 사용한 유도 후 레인 1(LB + IPTG, 환원됨) 및 3(LB + IPTG)에 보였다. 대조 레인 2(LB, 환원됨) 및 4(LB)에는 어떠한 발현도 보이지 않았다. 예상한 바와 같이, 표준 또는 환원된 환경 하에서 진행하였을 때의 융합 단백질 크기에 차이는 없었다.

실시예 3 : 내독소를 포함하지 않는, 코돈 최적화된 CAT-결손성 소마토스타틴을 함유하는 백신

[0118] 본 발명에 따른 실례가 되는 백신:

[0119] a. JH14(보조제) 24ml

[0120] 미네랄 오일 - 50%(v/v)

[0121] 트원 80 - 0.1694%(v/v)

[0122] 스웬 85 - 0.1915%(v/v)

[0123] 카보폴974NP - 0.125%(v/v)

[0124] b. 본 발명의 리폴딩된 단백질 95.6ml

[0125]	(2.96 mg/ml) - 실시예 2를 참조	
[0126]	c. 인산 완충 버퍼	35.6ml
[0127]	d. 항바이러스제/항진균제	0.36ml
[0128]		120ml

실시예 4 : 증가된 우유 생산을 제공하는 내독소를 포함하지 않는 키메릭 웨티드/보조제

젖소(미국에서 나오고 자란 - Holstein Crosses)의 랜덤 풀(random pool)을 확인하였으며, 각각 분만 후 31 내지 65일이었다(3rd 내지 5th 포유기). 수의사에 의해 최적의 건강을 가지도록 소들을 검사하고 결정하였다.

연구에 있어서 소의 평균 체중은 약 1,000 내지 1,200 lbs 였다. 6 포유기(six lactating) 소들을 JH14에 1.96mg/키메릭 단백질/2ml 투약량으로 치료하였다. 대안적으로, 9 포유기 소들에게는 기존의 rBST 처리를 하였다. 치료 및 우유 생산 연구는 대규모, 집적 우유 생산 착유장에서 수행하였다.

예방접종은 0일에 수행되었다. 항-SST 세럼 항체 및 IGF-1 세럼 레벨을 4주째에 테스트하고, 동물의 우유 생산량 및 일반적인 건강의 확인을 정기적인 스케줄에 따라 수행하였다.

본원에 기재된 본 발명의 조성물을 사용하여 예방 접종된 여섯 마리의 소들은 내독소 반응 또는 사료섭취 중지 없이 정상적인 모습이었다. 여섯 마리의 소 모두 1:14의 평균 역가(mean titer)와 함께 SST에 대하여 양성 혈청 반응(serologic response)을 보였다. 여섯 마리의 소의 우유 생산은 단지 한번의 예방접종만으로 얻어졌으며(도 3A를 참조), 23.7%의 평균 산출 증가를 나타내었다.

0일 및 14일에 기존의 rBST 주사를 사용하여 치료된 아홉 마리의 소들은 우유 생산성에 있어서 2%의 전반적인 평균 증가를 보였다(도 3B를 참조).

이 실시예에서의 데이터는 젖소에서 본 발명의 보조제와 함께 내독소를 포함하지 않는 구조물을 사용하는데 대한 유효성에 있어서 극적인 향상을 나타내었다. 이러한 결과는 rBST가 두 번 주사된 소들과 비교하여 동물의 건강 및 생산성에 대하여 극적으로 향상되었다.

실시예 5 : 치료된 암퇘지의 새끼돼지에서 증가된 고기 생산을 제공하는 내독소를 포함하지 않는 키메릭 웨티드/보조제

암퇘지의 랜덤 풀을 확인하고, 각각은 새끼를 낳기 전 적어도 35-36일째 였다. 각각의 암퇘지는 수의사에 의해 최적의 건강을 가지는 것으로 검사되고 결정되었다. 임신한 암퇘지를 본 발명의 백신(실시예 3을 참조)을 사용하여 2번, 출산 전 35-36일에 한번, 출산 전 8일째에 한번 예방접종하였다. 임신한 암퇘지의 대조군을 비교 목적으로 유지하였다(예방접종을 하지 않거나 멸균된 식염수로 예방접종을 하였다).

예방접종된 그룹으로부터 출산된 새끼돼지들은 더 높은 생존율 및 더 큰 평균 크기를 가질 것이다. 생존율의 비율을 강화시키는 새끼돼지의 크기의 증가에 있어서, 더욱 큰 새끼돼지는 암퇘지의 젖꼭지로부터 밀려날 가능성이 적다. 치료된 새끼돼지 및 대조군을 21일, 30일 및 75일에 체중을 재었다. 본 발명의 예방접종은 새끼돼지의 일일 체중을 75일의 기간 동안 평균 35%로 증가시켰다.

중요하게는, 새끼돼지의 생존율 및 체중은 재조합 성장 호르몬의 부재하에서 본 발명의 백신의 사용을 통하여 증가하였다. 이것은 재조합 호르몬 치료에 비하여 현저한 향상이다.

실시예 6 : 치료된 수송아지에서 고기 생산을 증가시키는 내독소를 포함하지 않는 키메릭 웨티드/보조제

1 내지 3개월령 수송아지의 랜덤 풀을 확인하고, 본 발명의 조성물을 주사하였다. 대략 10개월의 기간에 걸친 체중 증가를 관찰하고, 대조군과 비교하였으며, 상기 대조군은 본 발명의 백신 주사를 제외하고 주사된 그룹에 서와 같이 모든 점에서 동일하게 처리하였다. 각각의 수송아지를 치료 과정 동안 수의사에 의해 최적의 건강을 유지하도록 검사하고 측정하였다.

예방 접종된 군을 위한 본 발명의 주사는 0주, 4주 및 8주(총 3번의 예방접종)에 수행되었다. 예방접종은 18-

21 케이지의 cc 니들을 사용하여 목에 피하 내 또는 근육 내로 주었다. 2차 투여(booster)는 2mg/2ml의 키메릭 폴리펩티드를 포함하였다. 상기 키메릭 폴리펩티드는 본 발명의 글리신 아미노산으로 치환된 CAT에 히스티딘 잔기 모두 및 SEQ ID NO:3으로 기재된 것과 같은 최적화된 링커를 가지는 본원에 기재된 것과 같이 제조하였다.

[0143]

예방 접종된 수송아지 및 대조군 수송아지를 초기 체중을 얻기 위하여 각각 무게를 재었다. 본 발명의 예방 접종된 동물들은 대조군 동물에 비하여 15 내지 40%의 체중 증가를 보일 것으로 기대된다. 치료된 수송아지에 대한 평균 체중에 있어서 이러한 증가는 치료하지 않은 것에 비하여 현저한 이점을 나타낸다.

[0144]

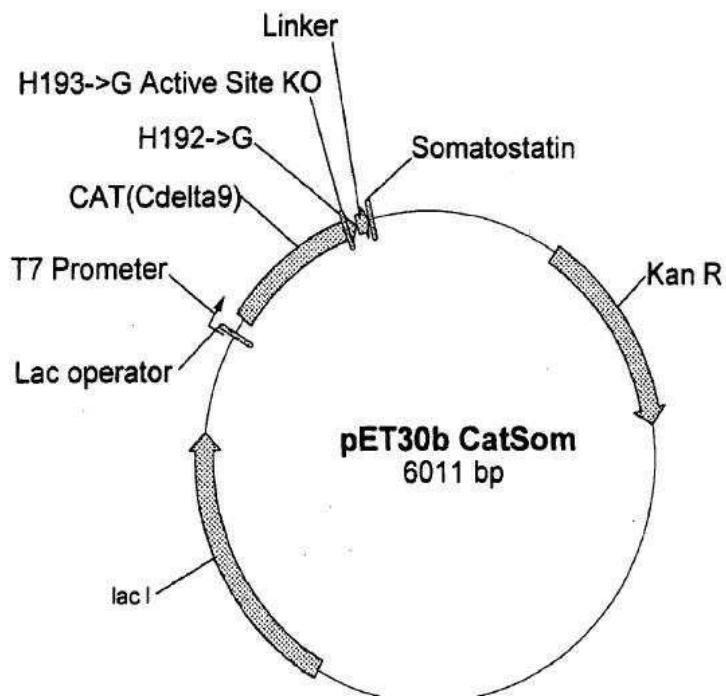
중요하게는, 치료된 수송아지로부터 얻은 고기는 재조합 성장 호르몬을 포함하지 않는다.

[0145]

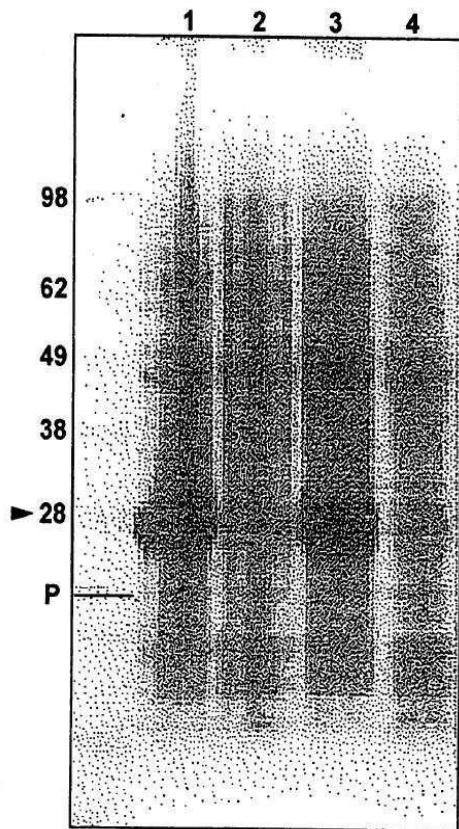
본 발명이 다수의 구현들을 참고로 상세히 나타내고 기재되었다 할지라도, 그 형태와 세부 항목의 변경이 본 발명의 취지 및 범위를 벗어나는 일 없이 본원에 기재된 다양한 구현들을 만들 수 있으며, 본원에 기재된 다양한 구현들은 청구항의 범위를 제한하고자 하는 것이 아님은 당업자에 의해 이해될 것이다.

도면

도면1



도면2



도면3

소 #	MY D10	MY D15	수율 증가	% 증가
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%
6540	24	25	+ 1 Lbs	4%
평균	29.33	36.33	+7.0 Lbs	23.7%

키메릭 폴리펩티드 처리됨

서 열 목록

- <110> BRAASCH BIOTECH LLC
<120> CHLORAMPHENICOL ACETYL TRANSFERASE (CAT)-DEFECTIVE SOMATOSTATIN
FUSION PROTEIN AND USES THEREOF
<130> PI10-0130

<160> 15

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 1

Ala Gly Cys Lys Asn Phe Phe Trp Lys Thr Phe Thr Ser Cys

1 5 10

<210> 2

<211> 630

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 2

atggagaaaa aaatcaactgg atataccacc gttgatataat cccaatggca tcgtaaagaa	60
cattttgagg catttcagtc agttgctcaa tgtacctata accagaccgt tcagctggat	120
attacggcct ttttaaagac cgtaaagaaa aataagcaca agtttatcc ggcctttatt	180
cacattttg cccgcctgat gaatgctcat ccggaattcc gtatggcaat gaaagacggt	240
gagctggta tatggatag tggcaccc ttttacacccg tttccatga gcaaactgaa	300
acgttttcat cgctctggag tgaataaccac gacgatttcc ggcagttct acacatatat	360

tcgcaagatg tggcgtgtta cggtaaaac ctggcctatt tccctaaagg gtttattgag	420
aatatgttt tcgtctcagc caatccctgg gtgagttca ccagtttga tttaaacgtg	480
gccaatatgg acaacttctt cggcccggtt ttcaccatgg gcaaatatttta tacgcaaggc	540
gacaagggtgc tggatggcgct ggcgatttagt gttgggtgtc ccgtttgtga tggctccat	600
gtcgcccgta tgcttaatga actgcagcag	630

<210> 3

<211> 210

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 3

Met Glu Lys Lys Ile Thr Gly Tyr Thr Thr Val Asp Ile Ser Gln Trp

1 5 10 15

His Arg Lys Glu His Phe Glu Ala Phe Gln Ser Val Ala Gln Cys Thr

20 25 30

Tyr Asn Gln Thr Val Gln Leu Asp Ile Thr Ala Phe Leu Lys Thr Val

35 40 45

Lys Lys Asn Lys His Lys Phe Tyr Pro Ala Phe Ile His Ile Leu Ala

50 55 60

Arg Leu Met Asn Ala His Pro Glu Phe Arg Met Ala Met Lys Asp Gly

65 70 75 80

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

85 90 95

Glu Gln Thr Glu Thr Phe Ser Ser Leu Trp Ser Glu Tyr His Asp Asp

100 105 110

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

115 120 125

Glu Asn Leu Ala Tyr Phe Pro Lys Gly Phe Ile Glu Asn Met Phe Phe

130 135 140

Val Ser Ala Asn Pro Trp Val Ser Phe Thr Ser Phe Asp Leu Asn Val

145 150 155 160

Ala Asn Met Asp Asn Phe Phe Ala Pro Val Phe Thr Met Gly Lys Tyr

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Gln Gln

210

<210> 4

<211> 630

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 4

atggagaaaa aaatcaactgg atataccacc gttgatataat cccaatggca tcgtaaagaa	60
cattttgagg catttcagtc agttgctcaa tgtacctata accagaccgt tcagctggat	120
attacggcct tttaaagac cgtaaagaaaa aataagcaca agtttatcc ggccttatt	180
cacattttg cccgcctgat gaatgctcat ccggaattcc gtatggcaat gaaagacggt	240
gagctggta tatggatag tggcacccct tttacaccg tttccatga gcaaactgaa	300
acgtttcat cgctctggag tgaataccac gacgattcc ggcagttct acacatataat	360

tcgcaagatg tggcgttta cggtgaaaac ctggcctatt tccctaaagg gtttattgag	420
aatatgttt tcgtctcagc caatccctgg gtgagttca ccagtttga tttaaacgtg	480
gccaatatgg acaacttctt cgcccccgtt ttcaccatgg gcaaataatata tacgcaaggc	540
gacaagggtgc tcatgccgtt ggcgatttcag gttcatggtg ccgttgcgtga tggctccat	600
gtcgccgta tgcttaatga actgcagcag	630

<210> 5

<211> 630

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 5

atggagaaaa aaatcaactgg atataccacc gttgatataat cccaatggca tcgtaaagaa	60
cattttgagg catttcagtc agttgctcaa tgtacctata accagaccgt tcagctggat	120
attacggcct tttaaagac cgtaaagaaaa aataagcaca agtttatcc ggccttatt	180
cacattttg cccgcctgat gaatgctcat ccggaattcc gtatggcaat gaaagacggt	240
gagctggta tatggatag tggcacccct tttacaccg tttccatga gcaaactgaa	300
acgtttcat cgctctggag tgaataccac gacgattcc ggcagttct acacatataat	360
tcgcaagatg tggcgttta cggtgaaaac ctggcctatt tccctaaagg gtttattgag	420
aatatgttt tcgtctcagc caatccctgg gtgagttca ccagtttga tttaaacgtg	480

gccaatatgg acaacttctt cgcccccgtt ttcaccatgg gcaaataatata tacgcaaggc	540
gacaagggtgc tcatgccgtt ggcgatttcag gttcatgctg ccgttgcgtga tggctccat	600
gtcgccgta tgcttaatga actgcagcag	630

<210> 6

<211> 630

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 6

atggagaaaa aaatcactgg atataccacc gttgatataat cccaatggca tcgtaaagaa	60
cattttgagg catttcagtc agttgctaa tgtacctata accagaccgt tcagctggat	120
attacggcct ttttaaagac cgtaaagaaa aataagcaca agtttatcc ggcctttatt	180

cacattttg cccgcctgat gaatgctcat ccggaaattcc gtatggcaat gaaagacgg	240
gagctggta tatggatag tggcacccct ttttccatga gcaaactgaa	300
acgtttcat cgctctggag tgaataccac gacgattcc ggcagttct acacatata	360
tcgcaagatg tggcgttta cggtaaaaac ctggcctatt tccctaaagg gtttattgag	420
aatatgttt tcgtctcagc caatccctgg gtgagttca ccagtttga tttaaacgtg	480
gccaatatgg acaacttctt cgcccccgtt ttcaccatgg gcaaataattt tacgcaaggc	540
gacaagggtgc tggatggcgtt ggcgatttcg gttcatggc ccgtttgtga tggctccat	600

gtcggcagaa tgcttaatga actgcagcag	630
----------------------------------	-----

<210> 7

<211> 210

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 7

Met Glu Lys Lys Ile Thr Gly Tyr Thr Thr Val Asp Ile Ser Gln Trp

1 5 10 15

His Arg Lys Glu His Phe Glu Ala Phe Gln Ser Val Ala Gln Cys Thr

20 25 30

Tyr Asn Gln Thr Val Gln Leu Asp Ile Thr Ala Phe Leu Lys Thr Val

35 40 45

Lys Lys Asn Lys His Lys Phe Tyr Pro Ala Phe Ile His Ile Leu Ala

50 55 60

Arg Leu Met Asn Ala His Pro Glu Phe Arg Met Ala Met Lys Asp Gly

65	70	75	80
Glu Leu Val Ile Trp Asp Ser Val His Pro Cys Tyr Thr Val Phe His			
85	90	95	
Glu Gln Thr Glu Thr Phe Ser Ser Leu Trp Ser Glu Tyr His Asp Asp			
100	105	110	
Phe Arg Gln Phe Leu His Ile Tyr Ser Gln Asp Val Ala Cys Tyr Gly			
115	120	125	
Glu Asn Leu Ala Tyr Phe Pro Lys Gly Phe Ile Glu Asn Met Phe Phe			
130	135	140	
Val Ser Ala Asn Pro Trp Val Ser Phe Thr Ser Phe Asp Leu Asn Val			
145	150	155	160
Ala Asn Met Asp Asn Phe Phe Ala Pro Val Phe Thr Met Gly Lys Tyr			
165	170	175	
Tyr Thr Gln Gly Asp Lys Val Leu Met Pro Leu Ala Ile Gln Val His			
180	185	190	
Gly Ala Val Cys Asp Gly Phe His Val Gly Arg Met Leu Asn Glu Leu			
195	200	205	
Gln Gln			
210			
<210>	8		
<211>	210		
<212>	PRT		
<213>	Artificial Sequence		
<220><223>	Synthetic		
<400>	8		
Met Glu Lys Lys Ile Thr Gly Tyr Thr Thr Val Asp Ile Ser Gln Trp			
1	5	10	15
His Arg Lys Glu His Phe Glu Ala Phe Gln Ser Val Ala Gln Cys Thr			
20	25	30	
Tyr Asn Gln Thr Val Gln Leu Asp Ile Thr Ala Phe Leu Lys Thr Val			
35	40	45	
Lys Lys Asn Lys His Lys Phe Tyr Pro Ala Phe Ile His Ile Leu Ala			

50	55	60
Arg Leu Met Asn Ala His Pro Glu Phe Arg Met Ala Met Lys Asp Gly		
65	70	75
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
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>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Synthetic	
<400>	9	
tgggaactgc accgttctgg tccacgcccc cgcctcgcc cacgtccgga attcatg		57
<210>	10	
<211>	19	
<212>	PRT	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Synthetic	

<400> 10

Trp Glu Leu His Arg Ser Gly Pro Arg Pro Arg Pro Arg Pro

1 5 10 15

Glu Phe Met

<210> 11

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<220><221> REPEAT

<222> (9)..(10)

<223> The pair of residues repeats at least once

<400> 11

Trp Glu Leu His Arg Ser Gly Pro Arg Pro Glu Phe Met

1 5 10

<210> 12

<211> 729

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400>

> 12

atggagaaaa aaatcactgg atataccacc gttgatataat cccaatggca tcgtaaagaa	60
cattttgagg catttcagtc agttgctcaa tgtacctata accagaccgt tcagctggat	120
attacggccct ttttaaagac cgtaaagaaa aataagcaca agtttatcc ggcctttatt	180
cacattcttg cccgcctgtat gaatgctcat ccggattcc gtatggcaat gaaagacggt	240
gagctggta tatggatag tttcacccct ttttacaccg ttttccatga gcaaactgaa	300
acgttttcat cgctctggag tgaataccac gacgattcc ggcagttct acacatatat	360
tcgcaagatg tggcgttta cggtgaaaac ctggcctatt tccctaaagg gtttattgag	420

aatatgttt tcgtctcagc caatccctgg gtgagttca ccagtttga tttaaacgtg	480
gccaatatgg acaacttctt cgcggccgtt ttcaccatgg gcaaatattt tacgcaaggc	540
gacaagggtgc tggatggcgtt ggcgattcag gttgggtgtg ccgttgtga tggctccat	600

gtcgccgta tgcttaatga actgcagcag tggaaactgc accgttctgg tccacgccc
 cgccctcgcc cacgtccgga attcatggcc ggctgcaaga acttctttg gaaaacctt
 acgagctgc

<210> 13

<211> 243

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 13

Met Glu Lys Lys Ile Thr Gly Tyr Thr Thr Val Asp Ile Ser Gln Trp

1 5 10 15

His Arg Lys Glu His Phe Glu Ala Phe Gln Ser Val Ala Gln Cys Thr

20 25 30

Tyr Asn Gln Thr Val Gln Leu Asp Ile Thr Ala Phe Leu Lys Thr Val

35 40 45

Lys Lys Asn Lys His Lys Phe Tyr Pro Ala Phe Ile His Ile Leu Ala

50 55 60

Arg Leu Met Asn Ala His Pro Glu Phe Arg Met Ala Met Lys Asp Gly

65 70 75 80

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

85 90 95

Glu Gln Thr Glu Thr Phe Ser Ser Leu Trp Ser Glu Tyr His Asp Asp

100 105 110

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

115 120 125

Glu Asn Leu Ala Tyr Phe Pro Lys Gly Phe Ile Glu Asn Met Phe Phe

130 135 140

Val Ser Ala Asn Pro Trp Val Ser Phe Thr Ser Phe Asp Leu Asn Val

145 150 155 160

Ala Asn Met Asp Asn Phe Phe Ala Pro Val Phe Thr Met Gly Lys Tyr

165 170 175

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

180	185	190
Gly Ala Val Cys Asp Gly Phe His Val Gly Arg Met Leu Asn Glu Leu		
195	200	205

210	215	220
Gln Gln Trp Glu Leu His Arg Ser Gly Pro Arg Pro Arg Pro Arg Pro		
Arg Pro Glu Phe Met Ala Gly Cys Lys Asn Phe Phe Trp Lys Thr Phe		
225	230	235
Thr Ser Cys		

<210> 14			
<211> 243			
<212> PRT			
<213> Artificial Sequence			
<220><223> Synthetic			
<400> 14			
Met Glu Lys Lys Ile Thr Gly Tyr Thr Thr Val Asp Ile Ser Gln Trp			
1	5	10	15

His Arg Lys Glu His Phe Glu Ala Phe Gln Ser Val Ala Gln Cys Thr			
20	25	30	
Tyr Asn Gln Thr Val Gln Leu Asp Ile Thr Ala Phe Leu Lys Thr Val			
35	40	45	
Lys Lys Asn Lys His Lys Phe Tyr Pro Ala Phe Ile His Ile Leu Ala			
50	55	60	
Arg Leu Met Asn Ala His Pro Glu Phe Arg Met Ala Met Lys Asp Gly			
65	70	75	80
Glu Leu Val Ile Trp Asp Ser Val His Pro Cys Tyr Thr Val Phe His			

85	90	95	
Glu Gln Thr Glu Thr Phe Ser Ser Leu Trp Ser Glu Tyr His Asp Asp			
100	105	110	
Phe Arg Gln Phe Leu His Ile Tyr Ser Gln Asp Val Ala Cys Tyr Gly			
115	120	125	
Glu Asn Leu Ala Tyr Phe Pro Lys Gly Phe Ile Glu Asn Met Phe Phe			

130	135	140	
Val Ser Ala Asn Pro Trp Val Ser Phe Thr Ser Phe Asp Leu Asn Val			
145	150	155	160
Ala Asn Met Asp Asn Phe Phe Ala Pro Val Phe Thr Met Gly Lys Tyr			
165	170	175	
Tyr Thr Gln Gly Asp Lys Val Leu Met Pro Leu Ala Ile Gln Val His			
180	185	190	
His Ala Val Cys Asp Gly Phe His Val Gly Arg Met Leu Asn Glu Leu			
195	200	205	
Gln Gln Trp Glu Leu His Arg Ser Gly Pro Arg Pro Arg Pro Arg Pro			
210	215	220	
Arg Pro Glu Phe Met Ala Gly Cys Lys Asn Phe Phe Trp Lys Thr Phe			
225	230	235	240
Thr Ser Cys			
<210> 15			
<211> 42			
<212> DNA			
<213> Artificial Sequence			
<220><223> Synthetic			
<400> 15			
gctggctgca agaatttctt ctggaagact ttcacatcct gt			42