



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA



Delegatura de Propiedad Industrial
División de Nuevas Creaciones

PCT

SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No.

10-2779

54. TÍTULO

PROCESO PARA LA PRODUCCION DE PROTEINA EXOGENA EN LA
LECHE DE MAMIFEROS TRANSGENICOS

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL

71. SOLICITANTE

STRRENBELD BIOTECHNOLOGIE NORTH AMERICA, INC.

DOMICILIO

WILMINGTON, DELAWARE, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

74. APODERADO

LUZ CLEMENCIA DE PAEZ
C.C. 35.456.344 de Usaquén

22. BOGOTÁ, D.C.,

PETITORIO

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-002779- -00000-0000

Fecha: 2010-01-13 15:43:56 Dep. 2020 DIR NULVASOR
Tra 11 PATENTE/II Lve. 378 FASE NACIONAL
Act 411 PRESENTACION Folios: 142

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

SOLICITUD DE:

1

☒ Patente de Invención.

☐ Patente de Modelo de Utilidad.

☒ Capítulo I.

☐ Capítulo II.

2

SOLICITANTE
(71)

Nombre: **STERRENBELD
BIOTECHNOLOGIE NORTH
AMERICA, INC.**

Sociedad constituida y existente bajo las
leyes del Estado de Delaware, Estados
Unidos de América.

Dirección: 1209 Orange Street,
Wilmington,
Delaware 19801,
Estados Unidos de América

Domicilio: Wilmington,
Delaware,
Estados Unidos de América

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐
Cual _____
Número _____

3

REPRESENTANTE
O APODERADO

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

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐
Cual _____
Número 35.456.344 T.P 23.555

4

INVENTOR (ES)
(72)

1. **Andrés BERCOVICH**
Valdenegro 3150 1st C,
Ciudad de Buenos Aires,
Argentina

3. **Carlos MELO**
Club De Campo Pueyrredon,
Ruta Panamericana Km 49, Pilar,
Provincia De Buenos Aires, CP 1629,
Argentina

5. **Norberto JUDEWICZ**
Manzanares 2088 4th A,
Ciudad de Buenos Aires,
Argentina

2. **Aida PRYNC**
Remedios De Escalada De San Martín
1086 7th,
Ciudad de Buenos Aires 1416,
Argentina

4. **Nahuel FERNANDEZ**
Combate De Los Pozos 1129,
Ciudad de Buenos Aires, CP 1222,
Argentina

6. **Marcelo CRISCUOLO**
Guevara 349,
Ciudad de Buenos Aires CP 1427,
Argentina

5

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/US2008/007400

Fecha: 13 de junio de 2008

Publicación Internacional No. WO 2008/156670 A1

Fecha: 24 de diciembre de 2008

6

Título (54)

PROCESO PARA LA PRODUCCIÓN DE PROTEÍNA EXÓGENA EN LA LECHE DE
MAMÍFEROS TRANSGÉNICOS

7

Clasificación Internacional (51) C12P 021/002

8 Prioridad SI ☒ NO ☐	(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
	US US	13 de junio de 2007 13 de junio de 2007	60/929,098 60/929,095

9

Comprobante de pago No.: 09-96,140

10- 199

10- 223

10- 318

Fecha: 21 de diciembre de 2009

5 de enero de 2010

5 de enero de 2010

5 de enero de 2010

10

Anexos:

☒

Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por \$ 554.000.oo.

☒

Comprobante de pago por 81 reivindicaciones adicionales después de la décima reivindicación por \$2.106.000.oo.

☒

Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.

☒

Poderes, si fuere el caso.

☐

Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.

☐

Declaraciones.

☒

Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)

☒

Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)

☐

Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA.

☐

Traducción del examen preliminar efectuado por la IPEA.

☐

De ser el caso, copia del contrato de acceso.

☐

De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.

☐

De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.

☒

Arte final 12x12

☐

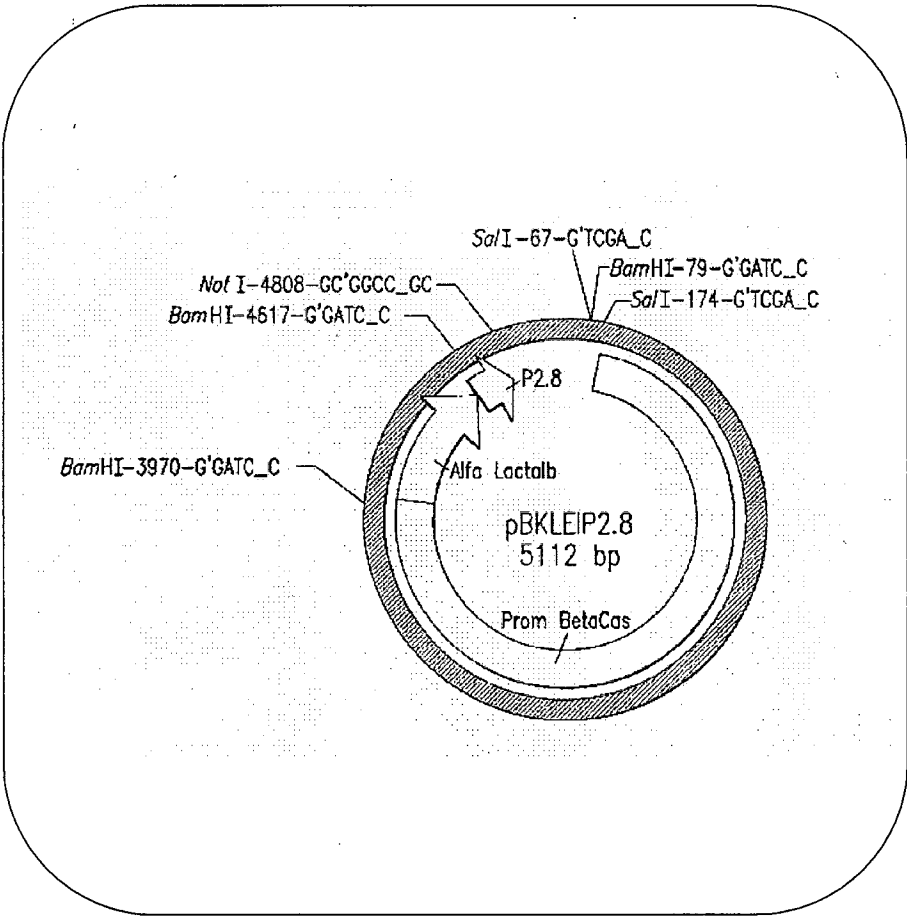
De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.

☒

Otros: VER HOJA DE DOCUMENTOS ANEXOS

11

FIGURA CARACTERÍSTICA



12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: LUZ CLEMENCIA DE PAEZ

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

66 JGG

4

DOCUMENTOS ANEXOS

1. ☒ Publicación Internacional WO 2008/156670 A1

Descripción:

Páginas 33 en el idioma original

Páginas 50 en español

Reivindicaciones: Número (s) 91

Figuras: Número (s) 4

2. ☒ Forma PCT/ISA/210. Informe de Búsqueda Internacional.
3. ☒ Extracto de publicación.

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

ESCRIBANIA PAMPLIEGA

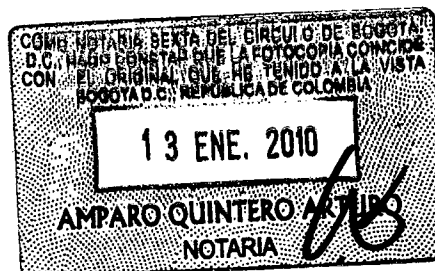
Avenida Córdoba 1215, 5 piso, Of. 9
C.P. C1055AAC
Buenos Aires - ARGENTINA

Telefax: (0054) (011) 4816-9444
E - MAIL : escribaniapampliega@speedy.com.ar

RECIBI, de STERRENBELD BIOTECHNOLOGIE NORTH AMERICA INC., la suma de Pesos TRESCIENTOS TREINTA Y CINCO en concepto de pago de la factura N° 773. Buenos Aires, 24 de noviembre de 2006.-



Trinidad Bourdieu



ESCRIBANIA PAMPLIEGA **C**

de Tomás Pampliega

CORDOBA 1215 5° 9
Tel./Fax: 4816-9444
(1055) Capital Federal

RESPONSABLE MONOTRIBUTO

Nº 0001- 00000773

24 Nov. 6
Buenos Aires, ... de 200

FACTURA

CUIT: 20-25385625-5
ING. BR.: EXENTO
INICIO DE ACTIVIDADES: 04 / 2004

Señor / es **S TERRENBELD BIOTECHNOLOGIE NORTH AMERICA INC.**

IVA

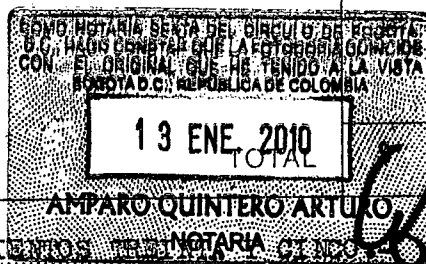
Domicilio CUIT

Por la Escritura de Poder Especial pasada al folio
2522.-

Sellos, Matriz y Testimonio, Derechos . Honorarios
Legalizacio Colegio de Escribanos y Apostilla (2)

\$ 335.-

ORIGINAL: BLANCO DUPLICADO: AMARILLO

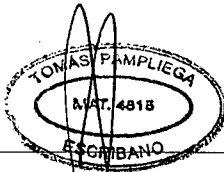


335.-

La presente factura importa la suma de **PESOS TRESCIENTOS TREINTA Y CINCO**



ACTUACION NOTARIAL
LEY 404



N 007057005

CECBA - LEY 404 GCBA
LEGALIZACION
061120494177



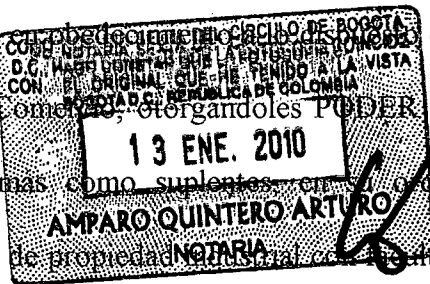
10:54:06
\$20.00
20/11/2006

CECBA - LEY 404 GCBA
APOSTITILLA
061121050965



10:59:36
\$39.00
21/11/2006

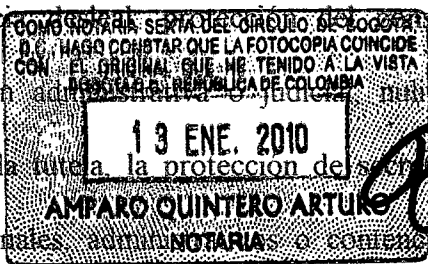
1 FOLIO 2522-PRIMERA COPIA-PODER ESPECIAL: STERRENBELD
2 BIOTECHNOLOGIE NORTH AMERICA, INC., a FERRERO, Emilio y OTROS.-
3 ESCRITURA NUMERO MIL DOSCIENTOS SESENTA Y SEIS.- En la Ciudad
4 de Buenos Aires, Capital de la Republica Argentina, a dieciséis de noviembre de dos
5 mil seis, ante mi, Escribano Autorizante comparece don Marcelo Luis ARGÜELLES
6 UGARTEBURU, argentino, casado, Documento Nacional de Identidad 4.555.043,
7 vecino de Capital Federal, mayor de edad, hábil, de mi conocimiento, doy fe, quien
8 manifiesta actuar en nombre y representación y en su carácter de Director de la
9 entidad que gira en Wilmington, Condado de New Castle; Estado de Delaware
10 Estados Unidos de Norteamérica bajo la denominación de "STERRENBELD
11 BIOTECHNOLOGIE NORTH AMERICA, INC", sin acreditar la personería y
12 carácter invocado y DICE: Que STERRENBELD BIOTECHNOLOGIE NORTH
13 AMERICA, INC.", Ratifica las solicitudes de patente No. 06039628 y No
14 06039644 presentadas por Emilio FERRERO el día 26 de abril de 2006 y nombra a
15 Emilio FERRERO, TPA 31929; Gonzalo PERDOMO, TPA. 831; Luz Clemencia de
16 PAEZ, TPA. 23555 y Daniel PEÑA, TPA. 65620, domiciliados en la Carrera 4
17 número 72 35, Bogotá, Colombia y en el documento No. 06039628 en el parágrafo
18 1 del artículo 543 del Código de Comercio, otorgandoles PODER ESPECIAL, el
19 primero como principal y los demas como suplentes, en su orden, como sus
20 representantes en todos los asuntos de propiedad, para recibir
21 notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales. El primer
22 representante suplente reemplazará al principal en caso de ausencia o impedimento
23 temporal o definitivo de aquel. La misma regla se aplicará cuando el segundo
24 representante suplente haya de reemplazar al primero, o el tercero al segundo. En
25 tales casos, el representante principal, o el primero, o segundo suplente, en su caso





N 007057005

o ambos, declararán su intención de no ejercer la representación mediante
declaración autenticada por Notario Público en Colombia, o por Notario u otro
Funcionario Público, o Cónsul de Colombia en el extranjero, y si se tratara de
impedimento, con el certificado respectivo. Si alguno de los nombrados faltare
definitivamente, el siguiente tomará su lugar. Cuando cesare la ausencia o
impedimento del representante principal, o de su primero o segundo suplentes, en su
caso, podrán ejercer la representación, en su orden, uno u otros según el caso,
asumiéndola por el solo hecho de ejercerla, cesando en ese momento el ejercicio de
la representación por el primero, segundo o tercer suplente en su caso. Además
confiere PODER ESPECIAL a los abogados arriba nombrados, para obtener
protección de la propiedad industrial de la mandante y contra la competencia desleal,
a cuyo efecto quedan autorizados para representar a la sociedad ante cualesquiera
entidades o personas, ejerzan o no jurisdicción, especialmente ante las del orden
administrativo, contencioso administrativo y judicial, así como los tribunales de
arbitramento, en todo lo concerniente a los siguientes asuntos: a) Obtención de
patentes de invención, modelos de utilidad y diseños industriales, el registro de
marcas de fábrica, colectivas, defensivas, de servicio, lemas comerciales, nombres
comerciales, enseñas, nombres de dominio, variedades vegetales y denominaciones
de origen: Su renovación, traspaso, cambio de nombre o domicilio, cancelación
voluntaria: y el registro de licencias de uso de esos derechos; b) Las acciones de
competencia, nulidad, protección del consumidor, oposiciones u observaciones,
cancelación administrativa o judicial, medidas cautelares, concesión de
licencias, la tutela, la protección de derechos industriales y en general los juicios
civiles, penales administrativos o contencioso - administrativos relacionados con
estos derechos: acciones y procesos que promovamos o se nos promuevan. Y para





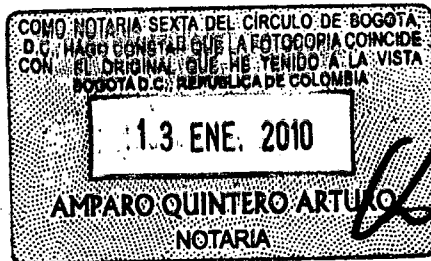
ACTUACION NOTARIAL

LEY 404



N 007057006

que en todos los asuntos arriba determinados, puedan sustituir este mandato, transigir, conciliar, admitir los hechos del proceso, desistir, cancelar, recibir, renunciar y ratificar los actos de agentes oficios.- LEIDA y ratificada, así la otorga y firma, ante mi, doy fe.- Marcelo Luis ARGÜELLES UGARTEBURU.- Hay un sello.- Ante mi: Maximo Pampliega.- CONCUERDA con su escritura matriz que pasó al folio 2522 del Registro Notarial 553, de mi Adscripción.- PARA LOS APODERADOS expido la primera copia en dos sellos de Actuación Notarial numerados N007057005 y el presente que sello y firmo en Buenos Aires a 17 de noviembre de 2006.-





N 007057006

BUENOS AIRES

26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50

COMO NOTARIA DEL CIRCULO DE BOGOTA
D.C. HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COMUNDE
CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
BOGOTA D.C. REPUBLICA DE COLOMBIA
13 ENE. 2010
AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA



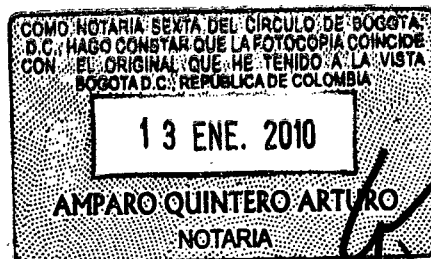
L 007310906

EL COLEGIO DE ESCRIBANOS de la Ciudad de Buenos Aires, Capital Federal de la República Argentina, en virtud de las facultades que le confiere la ley vigente, LEGALIZA la firma y sello del escribano **TOMAS PAMPLIEGA** obrantes en el documento anexo, presentado en el día de la fecha bajo el N° **061120494177/B** La presente legalización no juzga sobre el contenido y forma del documento.



Buenos Aires, Lunes 20 de Noviembre de 2006

ESC. MARIO ALBERTO CONFORTI
COLEGIO DE ESCRIBANOS
CONSEJERO





REPUBLICA ARGENTINA

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)



A 00093248

APOSTILLE

1. PAÍS: REPUBLICA ARGENTINA

El presente documento público

2. Ha sido firmado por ~~MARIO ALBERTO CONFORTI~~

3. Quien actúa en calidad de ~~CONSEJERO~~

COLEGIO DE ESCRIBANOS DE LA CIUDAD DE BUENOS AIRES

4. Lleva el sello / timbre de ~~COLEGIO DE ESCRIBANOS DE LA CIUDAD DE BUENOS AIRES~~

5. En ~~LA CIUDAD DE BUENOS AIRES~~ 6. El día ~~21/11/2006~~

7. Por ~~EL~~ ~~COLEGIO DE ESCRIBANOS~~ ~~DE LA CIUDAD DE BUENOS AIRES~~

MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES, COMERCIO INTERNACIONAL Y CULTO

(Convenio 02/09/2003)

8. Bajo el número: 061121050965

9. Sello / Timbre



10. Firma

ESC. ALADE BRAS COYENA
COLEGIO DE ESCRIBANOS
LEGALIZADOR

COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA D.C. HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA BOGOTA D.C. REPUBLICA DE COLOMBIA

13 ENE. 2010

AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA



ACTUACION NOTARIAL

LEY 404



N 007057039

CECBA - LEY404 GCBA

LEGALIZACION

061122499451

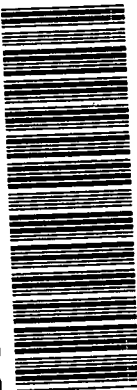


10:53:45
\$20.00
22/11/2006

CECBA - LEY404 GCBA

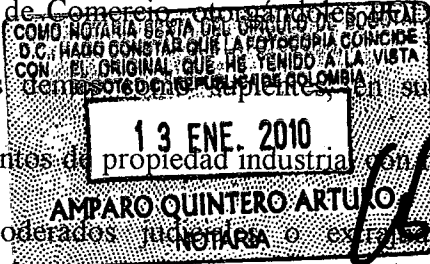
APOSTILLA

061123051153



11:18:59
\$39.00
23/11/2006

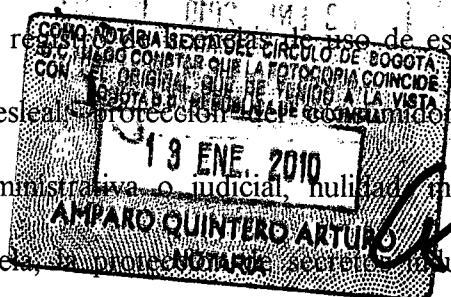
FOLIO 2522-SEGUNDA COPIA-PODER ESPECIAL: STERRENBELD BIOTECHNOLOGIE NORTH AMERICA, INC., a FERRERO, Emilio y OTROS.- ESCRITURA NUMERO MIL DOSCIENTOS SESENTA Y SEIS.- En la Ciudad de Buenos Aires, Capital de la República Argentina, a dieciséis de noviembre de dos mil seis, ante mi, Escribano Autorizante comparece don Marcelo Luis ARGÜELLES UGARTEBURU, argentino, casado, Documento Nacional de Identidad 4.555.043, vecino de Capital Federal, mayor de edad, hábil, de mi conocimiento, doy fe, quien manifiesta actuar en nombre y representación y en su carácter de Director de la entidad que gira en Wilmington, Condado de New Castle, Estado de Delaware, Estados Unidos de Norteamérica bajo la denominación de "STERRENBELD BIOTECHNOLOGIE NORTH AMERICA, INC", sin acreditar la personería y carácter invocado y DICE: Que STERRENBELD BIOTECHNOLOGIE NORTH AMERICA, INC.", Ratifica las solicitudes de patente No. 06039628 y No. 06039644 presentadas por Emilio FERRERO el día 26 de abril de 2006 y nombra a Emilio FERRERO, TPA 31929; Gonzalo PERDOMO, TPA. 831; Luz Clemencia de PAEZ, TPA. 23555 y Daniel PEÑA, TPA. 65620, domiciliados en la Carrera 4 número 72 35, Bogotá, Colombia y en obediencia a lo dispuesto en el parágrafo 1 del artículo 543 del Código de Comercio, otorgandoles PODER ESPECIAL, el primero como principal y los demás como suplentes, en su orden, como sus representantes en todos los asuntos de propiedad industrial con facultad para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales. El primer representante suplente reemplazará al principal en caso de ausencia o impedimento temporal o definitivo de aquel. La misma regla se aplicará cuando el segundo representante suplente haya de reemplazar al primero, o el tercero al segundo. En tales casos, el representante principal, o el primero, o segundo suplente, en su caso,

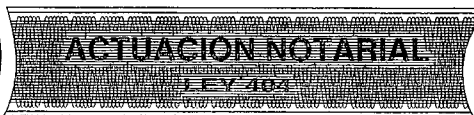




N 007057039

o ambos. declararán su intención de no ejercer la representación mediante
declaración autenticada por Notario Público en Colombia, o por Notario u otro
Funcionario Público, o Cónsul de Colombia en el extranjero, y si se tratara de
impedimento, con el certificado respectivo. Si alguno de los nombrados faltare
definitivamente, el siguiente tomará su lugar. Cuando cesare la ausencia o
impedimento del representante principal, o de su primero o segundo suplentes, en su
caso, podrán ejercer la representación, en su orden, uno u otros según el caso,
asumiéndola por el solo hecho de ejercerla, cesando en ese momento el ejercicio de
la representación por el primero, segundo o tercer suplente en su caso. Además
confiere PODER ESPECIAL a los abogados arriba nombrados, para obtener
protección de la propiedad industrial de la mandante y contra la competencia desleal,
a cuyo efecto quedan autorizados para representar a la sociedad ante cualesquiera
entidades o personas, ejerzan o no jurisdicción, especialmente ante las del orden
administrativo, contencioso administrativo y judicial, así como los tribunales de
arbitramento, en todo lo concerniente a los siguientes asuntos: a) Obtención de
patentes de invención, modelos de utilidad y diseños industriales, el registro de
marcas de fábrica, colectivas, defensivas, de servicio, lemas comerciales, nombres
comerciales, enseñas, nombres de dominio, variedades vegetales y denominaciones
de origen: Su renovación, traspaso, cambio de nombre o domicilio, cancelación
voluntaria: y el registro de esos derechos; b) Las acciones de
competencia desleal, oposición al derecho de prioridad, oposiciones u observaciones,
cancelación administrativa o judicial, nulidad, medidas cautelares, concesión de
licencias, la tutela, la protección de secretos industriales y en general los juicios
civiles, penales, administrativos o contencioso - administrativos relacionados con
estos derechos: acciones y procesos que promovamos o se nos promuevan. Y para



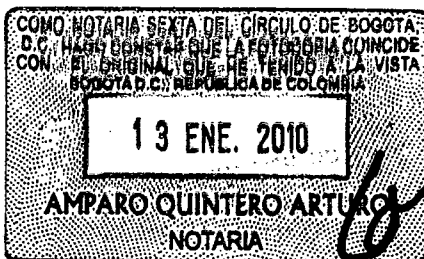


N 007057040

que en todos los asuntos arriba determinados, puedan sustituir este mandato, transigir, conciliar, admitir los hechos del proceso, desistir, cancelar, recibir, renunciar y ratificar los actos de agentes oficios.- LEIDA y ratificada, así la otorga y firma, ante mi, doy fe.- Marcelo Luis ARGÜELLES UGARTEBURU.- Hay un sello.- Ante mi: Maximo Pampliega.- CONCUERDA con su escritura matriz que pasó al folio 2522 del Registro Notarial 553, de mi Adscripción.- PARA LOS APODERADOS expido la segunda copia en dos sellos de Actuación Notarial numerados N007057039 y el presente que sello y firmo en Buenos Aires a 21 de noviembre de 2006.-

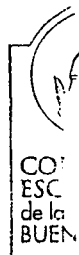


[Handwritten signature]

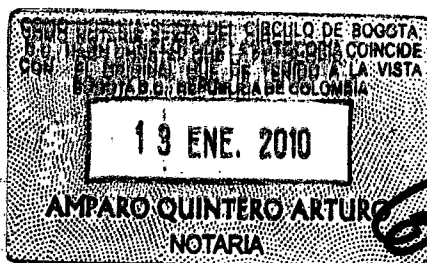


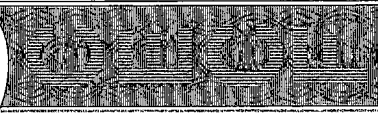


N 007057040



26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50





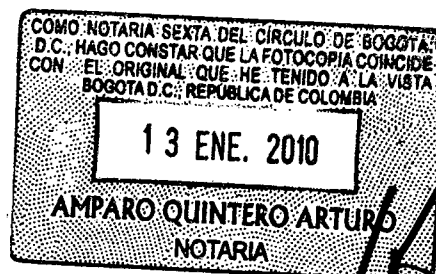
L 007315891

EL COLEGIO DE ESCRIBANOS de la Ciudad de Buenos Aires, Capital Federal de la República Argentina, en virtud de las facultades que le confiere la ley vigente, LEGALIZA la firma y sello del escribano TOMAS PAMPLIEGA obrantes en el documento anexo, presentado en el día de la fecha bajo el N° 061122499451/A La presente legalización no juzga sobre el contenido y forma del documento.



Buenos Aires, Miércoles 22 de Noviembre de 2006

ESC. AMADEO GRAS GOYENA
COLEGIO DE ESCRIBANOS
LEGALIZADOR





APOSTILLE



REPUBLICA
ARGENTINA

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

A 00093448

1. PAÍS: REPUBLICA ARGENTINA _____

El presente documento público _____

2. Ha sido firmado por AMADEO GRAS GOYENA _____

3. Quien actúa en calidad de LEGALIZADOR _____

4. Lleva el sello / timbre de COLEGIO DE ESCRIBANOS DE LA CIUDAD DE BUENOS AIRES _____

5. En LA CIUDAD DE BUENOS AIRES 6. El día 23/11/2006 _____

7. Por EL COLEGIO DE ESCRIBANOS DE LA CIUDAD DE BUENOS AIRES _____

MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES, COMERCIO INTERNACIONAL Y CULTO

(Convenio 02/09/2003) _____

8. Bajo el número: **061123051153**

9. Sello / Timbre

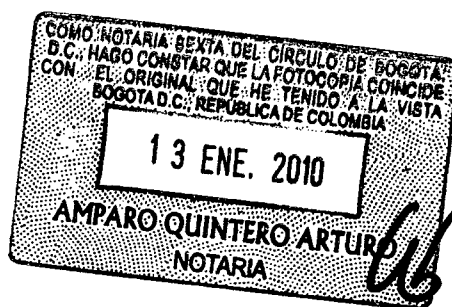


10. Firma

ESC LILIANA S. FUKS
COLEGIO DE ESCRIBANOS
LEGALIZADORA

COLEGIO DE ESCRIBANOS
CIUDAD DE BUENOS AIRES

GRAFICA LATINA S.R.L.



(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
24 December 2008 (24.12.2008)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2008/156670 A1

(51) International Patent Classification:
C12P 21/02 (2006.01) B01D 15/04 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/US2008/007400

(22) International Filing Date: 13 June 2008 (13.06.2008)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/929,098 13 June 2007 (13.06.2007) US
60/929,095 13 June 2007 (13.06.2007) US

(71) Applicant (for all designated States except US): **STER-RENBELD BIOTECHNOLOGIE NORTH AMERICA, INC.** [US/US]; 1209 Orange Street, Wilmington, DE 19801 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): **BERCOVICH, Andrés** [AR/AR]; Valdenegro 3150 1st C, Ciudad De Buenos Aires (AR). **PRYNC, Aida** [AR/AR]; Remedios De Escalada De San Martin 1086 7th, Ciudad De Buenos Aires, 1416 (AR). **MELO, Carlos** [AR/AR]; Club De Campo Pueyrredon, Ruta Panamericana Km 49, Pilar, Provincia De Buenos Aires, CP 1629 (AR). **FERNANDEZ, Nahuel** [AR/AR]; Combate De Los Pozos 1129, Ciudad De Buenos Aires, CP 1222 (AR). **JUDEWICZ, Norberto** [AR/AR];

Manzanares 2088 4th A, Ciudad De Buenos Aires (AR). **CRISCUOLO, Marcelo** [AR/AR]; Guevara 349, Ciudad De Buenos Aires, CP 1427 (AR).

(74) Agents: **JACKMAN, Peter, A.** et al.; Sterne, Kessler, Goldstein & Fox P.L.L.C., 1100 New York Avenue, N.W., Washington, DC 20005-3934 (US).

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

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

Published:
— with international search report

(54) Title: PROCESS FOR PRODUCING EXOGENOUS PROTEIN IN THE MILK OF TRANSGENIC MAMMALS

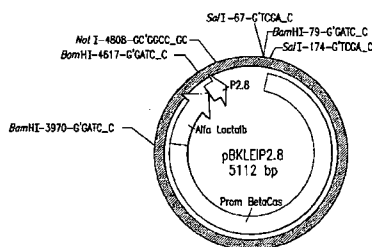


FIG. 4

(57) Abstract: The invention relates to a non-human transgenic mammal that is useful for the production of a protein of interest that may be toxic to the mammal. The mammal is characterized by the fact that it is transgenic for the production in its milk of an inactive form of the protein of interest, preferably recombinant human insulin. It is not possible to produce recombinant human insulin in transgenic mammals since this molecule has a certain degree of biological activity in the mammals and could be toxic to the mammal. Thus, the invention involves cloning a genetic construct comprising a sequence encoding a modified human insulin precursor under the control of a beta casein promoter in an expression vector. It also involves transfecting the expression plasmid into fetal bovine somatic cells, such as fibroblasts, and enucleating bovine oocytes by nuclear transfer to generate transgenic embryos. The invention gives rise to transgenic bovine that will be able to produce a modified human insulin precursor in their mammary glands. Afterwards, the milk of these transgenic mammals can be collected, the modified human insulin precursor can be converted in vitro into recombinant human insulin, and the recombinant human insulin can be purified to homogeneity as a pure biopharmaceutical product.

PROCESS FOR PRODUCING EXOGENOUS PROTEIN IN THE MILK OF TRANSGENIC MAMMALS

Background of the Invention

- [0001] Protein factors and hormones involved in human health care have been currently produced by the pharmaceutical industry by extraction or by recombinant technology in past decades. Expression of genetic constructs involving the desired genes were successfully accomplished in bacteria, yeast or mammalian cell lines. However, the use of mammalian cell cultures to obtain complex proteins, such as those which require a proper glycosylation pattern, involves high cost procedures.
- [0002] Recombinant DNA technology has been used increasingly over the past decade for the production of commercially important biological materials. To this end, the DNA sequences encoding a variety of medically important human proteins have been cloned. These include insulin, plasminogen activator, alpha1-antitrypsin and coagulation factors VIII and IX. At present, even with the emergent recombinant DNA techniques, these proteins are usually purified from blood and tissue, an expensive and time consuming process which may carry the risk of transmitting infectious agents such as those causing AIDS and hepatitis.
- [0003] Although the expression of DNA sequences in bacteria to produce the desired medically important protein looks like an attractive proposition, in practice the bacteria often prove unsatisfactory as hosts because in the bacterial cell foreign proteins are unstable and are not processed correctly.
- [0004] Recognizing this problem, the expression of cloned genes in mammalian tissue culture has been attempted and has in some instances proved a viable strategy. However, batch fermentation of mammalian cells is an expensive and technically demanding process.
- [0005] There is therefore a need for a high yield, low cost process for the production of biological substances such as correctly modified eukaryotic polypeptides. The absence of agents that are infectious to humans would be an advantage in such a process.
- [0006] The possibility of obtaining transgenic mammals, like cattle, for a desired gene, with the aim of getting large amounts of a human protein in milk, has been of great

interest to the industry. Several groups in the literature report their success on producing human serum albumin, alpha anti-trypsin, and some other examples in transgenic cows or goats.

[0007] Many experiments have been previously performed in mice or rats, and transgene expression was always preferred to be confined to the mammary glands since beta casein or lactalbumin promoters were employed, which respond only to mammary gland transcription factors in lactating females.

[0008] The expression of a heterologous protein exclusively in milk is meant to avoid undesired influence on the health of the host mammal and provide an easy method for purification.

[0009] Expression of heterologous proteins in bacteria or cell culture may be prevented or impeded due to a toxic effect of the recombinant protein on the host mammal. Many examples can be found in the literature where a certain protein, even a naturally non-toxic one, cannot be expressed in a particular system because it is harmful to the host, even causing its death. The cause of death may be the high concentration of the protein inside the cell, the high concentration of secreted protein or a specific interaction with the protein and some cellular component that causes cytopathic activity in the foreign host.

[0010] Several methods have been developed to overcome these drawbacks to achieve heterologous gene expression of toxic proteins, including using fusion proteins, modifying the original protein sequence, separately expressing the different polypeptides of a protein, etc. (See *Protein Expression and Purification*, 2001 Aug; 22(3):422-9).

[0011] A similar effect may result when expressing recombinant proteins in transgenic cattle. In the generation of a transgenic mammal, a cell is transfected to obtain a transgenic clone carrying the heterologous gene of interest and is then used to generate the transgenic mammal. This process generally leads to the insertion of the sequence of interest in the host genome, an event that in turn should lead to the expression of the heterologous protein in the target tissue or gland if a specific promoter was used, or systemically if a general promoter was employed. The level of protein expression will depend on a variety of factors, including the location within the genome where the insertion took place.

- 3 -

- [0012] Even when the gene expression is directed by a tissue specific promoter, leakage of the foreign protein into the peripheral circulation system has been observed in many different mammalian species with several proteins (See *Life Sciences*, 2006 Jan 25;78(9):1003-9. Epub 2005 Sep 15; and *Journal of Biotechnology*, 2006 Jul 13;124(2):469-72. Epub 2006 May 23). This leakage may have relevant biological consequences depending on the level of expression, level of leakage, nature of the heterologous protein, relation between species (host and foreign protein) and the ability of the heterologous protein to interact with host receptors. Given the similarity to the host homologous protein, some of these transgenically expressed proteins may exert their natural biological activity on the foreign host and may cause a pathological effect that could cause the death of the mammal (See *Endocrinology* 1997 Jul ;138(7):2849-55). In addition, it is possible that the heterologous protein does not affect the mammal's health through an interaction with the corresponding homologous host receptors, but through a toxic, non-specific effect that occurs when some heterologous proteins are expressed in bacteria.
- [0013] This invention provides innovative solutions to the drawbacks currently associated with expressing a protein in transgenic mammals that has a toxic effect on the mammals.

SUMMARY OF THE INVENTION

- [0014] The invention relates to a non-human mammal which is useful for the production of a protein of interest that may be toxic to the mammal. This mammal is characterized by the fact that it is transgenic for the production in its milk of an inactive form of the protein of interest. The inactive form of the protein of interest is a form of the protein of interest that is not toxic to the non-human transgenic mammal that expresses the protein of interest. As used herein, toxic means causing serious harm or death. An inactive form of the protein of interest may have some biological activity in the non-human transgenic mammal that expresses the inactive form of the protein of interest; however, the inactive form of the protein of interest is not toxic to the non-human transgenic mammal (*i.e.*, the mammal does not die and does not suffer serious harm). The inactive form of the protein can be activated *in vitro*. This inactive protein, possibly a non-natural species of the

- 4 -

protein, may be, but is not limited to, a recombinant modified human insulin precursor. The protein of interest may be, but is not limited to, recombinant human insulin. The non-human transgenic mammal may be, but is not limited to, a mammal of bovine species.

[0015] The invention further relates to a plasmid that provides for the expression of the inactive form of the protein of interest in the mammary cells of mammals in which the expression is regulated by the beta casein promoter.

[0016] The present invention further relates to a method of production, employing non-human transgenic mammals, of a protein of interest that may be toxic to the non-human transgenic mammals. The potential toxicity of the protein is avoided by expressing the protein as an inactive protein. This inactive protein, possibly a non-natural species of the protein, may be, but is not limited to, a recombinant modified human insulin precursor. The protein of interest may be, but is not limited to, recombinant human insulin. The non-human transgenic mammal may be, but is not limited to, a mammal of bovine species.

[0017] The invention also relates to a method of producing recombinant insulin, comprising making a non-human transgenic mammal that produces a recombinant modified insulin precursor in its milk, obtaining the milk from the non-human transgenic mammal, purifying the precursor from the milk, subjecting the purified precursor to enzymatic cleavage and transpeptidation in order to yield recombinant insulin, and purifying the recombinant insulin. The recombinant insulin may be, but is not limited to, recombinant human insulin. The transgenic mammal may be, but is not limited to, a mammal of bovine species.

BRIEF DESCRIPTION OF THE FIGURES

[0018] Figure 1 shows a scheme of expression plasmid p β mhuIP, containing the genetic sequence which encodes the modified human insulin precursor (mhuIP) and a promoter that directs its expression to mammary cells.

[0019] Figure 2 shows a scheme Start Construction, comprising the sequence encoding mhuIP.

[0020] Figure 3 shows a scheme of expression plasmid pNJK IP, containing the genetic sequence which encodes the modified human insulin precursor (mhuIP), a promoter that

directs its expression to mammary cells, and a fragment of the coding sequence of the chicken β globin insulator.

[0021] Figure 4 shows a scheme of expression plasmid p β KLE IP, containing the genetic sequence which encodes the modified human insulin precursor (mhuIP), a promoter that directs its expression to mammary cells, a large portion of the coding sequence of the bovine alfa lactalbumin gene, and an enterokinase cleavage site.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

[0022] The invention relates to a non-human mammal which is useful for the production of a protein of interest that may be toxic to the mammal. That mammal is characterized by the fact that it is transgenic for the production of an inactive form of the protein of interest in its milk. The term inactive protein refers to a form of the protein of interest that is not toxic to the non-human transgenic mammal that expresses the protein of interest. In a further embodiment of the invention, the term inactive protein refers to a protein that lacks biological activity without further post-translational modification. Examples of inactive proteins include precursor proteins (*i.e.*, propeptides), proteins that contain modifications (*i.e.*, amino acid substitutions, additions or deletions when compared to the native protein) that render the protein biologically inactive without further processing, or modified precursor proteins (*i.e.*, propeptides that contain amino acid substitutions, additions or deletions when compared to the native propeptide). In other words, the potential toxicity of the protein of interest is avoided by expressing the protein as an inactive protein that does not kill a non-human transgenic mammal that expresses the protein of interest. This inactive protein, possibly a non-natural species of the protein, may be, but is not limited to, precursors, modified precursors or modified forms of the following: antibodies, hormones, growth factors, enzymes, clotting factors, apolipoproteins, receptors, drugs, pharmaceuticals, bioceuticals, nutraceuticals, oncogenes, tumor antigens, tumor suppressors, cytokines, viral antigens, parasitic antigens, and bacterial antigens. Preferably, the inactive protein is a recombinant modified insulin precursor that does not cause hypoglycemia in a non-human transgenic mammal that expresses the modified insulin precursor. More preferably, the inactive

protein is a recombinant modified mammalian insulin precursor, and most preferably, a recombinant modified human insulin precursor. The protein of interest may be, but is not limited to, a recombinant insulin, more preferably, a recombinant mammalian insulin, and, most preferably, recombinant human insulin. This non-human mammal may be, but is not limited to, a mammal of bovine species. Other species of transgenic mammals may be, but are not limited to, porcine species, ovine species, caprine species, or rodent species.

[0023] Insulin is the primary hormone responsible for controlling the transport, utilization and storage of glucose in the body. The β -cells of the pancreas secrete a single chain precursor of insulin, known as proinsulin. Proinsulin is made up of three domains: an amino-terminal B chain, a carboxyl-terminal A chain, and a connecting peptide in the middle known as the C peptide. Proteolysis of proinsulin results in removal of certain basic amino acids in the proinsulin chain along with the connecting peptide (C peptide) to yield the biologically active polypeptide insulin.

[0024] In embodiments, a modified protein is a form of the protein that is not the naturally occurring form of the protein. In embodiments, the modified insulin precursor contains an amino-terminal B chain and a carboxyl-terminal A chain. However, the modified insulin precursor contains a modified C peptide. In the modified insulin precursor, the amino acids encoding the connecting C peptide that is found in naturally occurring proinsulin is replaced by amino acids that are not found in naturally occurring proinsulin. In embodiments, the modified C peptide contains the following three amino acids: Ala-Ala-Lys. Furthermore, the modified insulin precursor may contain a modified B chain. In embodiments, the modified B chain contains all but the C-terminal amino acid of the naturally occurring B chain.

[0025] In further embodiments, the modified insulin precursor is a modified human insulin precursor consisting of 53 amino acids, with a molecular weight of about 6 kD. The modified human insulin precursor contains a modified B chain that has amino acids 1-29 of the naturally occurring B chain, and a modified C peptide with three amino acids, Ala-Ala-Lys. The modified human insulin precursor may be subjected to enzymatic

- 7 -

cleavage and transpeptidation in order to yield human insulin, which is essential for the treatment of diabetes and its applications are well established.

[0026] The invention also relates to a non-human mammal which is transgenic for the production of a recombinant modified human insulin precursor in its milk, characterized by the fact that the recombinant modified human insulin precursor does not render the mammal non-viable.

[0027] The invention further relates to a transgenic mammal of bovine species that is useful for the production of recombinant human insulin. Human insulin is known to be active in cattle. Cattle that express human insulin in its mature form might be expected to exhibit symptoms associated with hypoglycemia since transgenic protein can leak into the bloodstream. Therefore, transgenic cattle that express recombinant human insulin may be non-viable. However, the present invention overcomes this limitation and allows for expression in a transgenic mammal of a protein that may be toxic to the transgenic mammals. The present invention expresses an inactive form of a protein of interest. The inactive protein is purified from the milk of the transgenic mammal, and converted *in vitro* into the mature (*i.e.*, active) form of the protein. Undoubtedly, a mammal, such as a cow, which is useful as a means of producing a therapeutic protein (*e.g.*, human insulin) that when expressed is harmful to the mammal constitutes an unexpected and innovative contribution.

[0028] The invention further relates to a non-human transgenic mammal that produces a recombinant modified insulin precursor in its milk, whose genome comprises an integrated plasmid, the plasmid comprising a nucleic acid sequence encoding a modified insulin precursor operably linked to a promoter that directs the expression of the sequence in mammary cells of the mammal. The non-human mammal may be, but is not limited to, a mammal of bovine species. Other species of transgenic mammals may be, but are not limited to, porcine species, ovine species, caprine species, or rodent species. The modified insulin precursor may be a modified mammalian insulin precursor, more preferably, a modified human insulin precursor, a modified bovine insulin precursor, a modified porcine insulin precursor, a modified ovine insulin precursor, a modified caprine insulin precursor, a modified rodent insulin precursor, and most preferably a modified human insulin precursor. The promoter may be a beta casein promoter.

Suitable beta casein promoters include, but are not limited to, a bovine beta casein promoter or a caprine beta casein promoter. Other beta casein promoters include, but are not limited to, a porcine beta casein promoter, an ovine beta casein promoter, or a rodent beta casein promoter. The integrated plasmid may also contain an antibiotic resistance gene such as the neomycin resistance gene. Further, the integrated plasmid may be p β mhuIP. The integrated plasmid can also be pNJK IP or p β KLE IP.

[0029] The invention further relates to a non-human transgenic mammal in which the above described integrated plasmid is found in both the somatic cells and the germ cells of the mammal.

[0030] The invention further relates to a non-human transgenic mammal of bovine species that produces a recombinant modified human insulin precursor in its milk, whose genome comprises an integrated plasmid, the plasmid comprising a nucleic acid sequence encoding the modified human insulin precursor and a beta casein promoter that directs expression of the sequence in mammary cells of the mammal. Suitable beta casein promoters include, but are not limited to, a bovine beta casein promoter or a caprine beta casein promoter. Other beta casein promoters may be, but are not limited to, a porcine beta casein promoter, an ovine beta casein promoter, or a rodent beta casein promoter. The integrated plasmid may contain an antibiotic resistance gene such as the neomycin resistance gene. Further, the integrated plasmid may be p β mhuIP. The integrated plasmid can also be pNJK IP or p β KLE IP.

[0031] The invention also relates to a plasmid comprising a nucleic acid sequence encoding a modified insulin precursor operably linked to a beta casein promoter and an antibiotic resistance gene that allows for the selection of antibiotic resistant cells. Suitable beta casein promoters include, but are not limited to, a bovine beta casein promoter or a caprine beta casein promoter. Other beta casein promoters include, but are not limited to, a porcine beta casein promoter, an ovine beta casein promoter, or a rodent beta casein promoter. In embodiments, the antibiotic resistance gene is a neomycin resistance gene that allows for the selection of geneticin resistant cells. An example of such a plasmid is p β mhuIP, as shown in Figure 1. Additional examples of such a plasmid are pNJK IP, as shown in Figure 3, and p β KLE IP, as shown in Figure 4.

- [0032] The invention further relates to a plasmid comprising a nucleic acid sequence encoding a modified insulin precursor in which the modified insulin precursor is a modified mammalian insulin precursor. The modified mammalian insulin precursor may be a modified human insulin precursor, a modified bovine insulin precursor, a modified porcine insulin precursor, a modified ovine insulin precursor, a modified caprine insulin precursor, or a modified rodent insulin precursor. In embodiments, the modified mammalian insulin precursor is a modified human insulin precursor.
- [0033] The invention further relates to a plasmid comprising a nucleic acid sequence encoding a modified insulin precursor that does not cause hypoglycemia in a non-human transgenic mammal that expresses the modified insulin precursor.
- [0034] The invention further relates to a plasmid comprising a nucleic acid sequence encoding a modified human insulin precursor that contains a modified C peptide. In the modified human insulin precursor, the amino acids encoding the connecting C peptide that is found in naturally occurring human proinsulin is replaced by amino acids that are not found in naturally occurring proinsulin. In embodiments, the modified C peptide contains the following three amino acids: Ala-Ala-Lys. Furthermore, the modified human insulin precursor may contain a modified B chain. In embodiments, the modified B chain contains amino acids 1-29 of the naturally occurring B chain.
- [0035] The invention further relates to a plasmid comprising a nucleic acid sequence encoding a modified insulin precursor, which further comprises one or more additional genetic elements that will enhance the stability of the plasmid, enhance the stability of the mRNA transcribed from the plasmid, decrease degradation of the modified insulin precursor, and/or increase the expression of the modified insulin precursor. Suitable genetic elements include, but are not limited to, a regulatory element (*e.g.*, a promoter, an enhancer, an insulator, or a transcription termination site), a fragment of the coding sequence of a gene that is not insulin, or the coding sequence of a gene that is not insulin. In embodiments, the genetic element is a fragment of the coding sequence of the chicken β globin insulator. An example of of such a plasmid is pNJK IP, as shown in Figure 3. In other embodiments, the genetic element is a fragment of the coding sequence of the bovine alfa lactalbumin gene. An example of of such a plasmid is pBKLE IP, as shown in Figure 4.

25

- 10 -

- [0036] The plasmids p β mhulP, pNJK IP and p β KLE IP were deposited under the terms of the Budapest Treaty. The name and address of the depository are DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, Germany. p β mhulP was deposited at the DSMZ on April 4, 2008 and given DSMZ Deposit Number DSM 21359. pNJK IP was deposited at the DSMZ on April 4, 2008 and given DSMZ Deposit Number DSM 21360. p β KLE IP was deposited at the DSMZ on June 12, 2008.
- [0037] The invention further relates to a method of transfecting the above described genetic constructs. In embodiments, the above described genetic constructs are transfected into mammalian cells by inserting the genetic constructs into liposomes and contacting the liposomes with the mammalian cells. The liposomes may be cationic lipids.
- [0038] Methods of selection of neomycin resistant cells in appropriate media are known to those of skill in the art. Such cells must be picked carefully, so as to avoid cell damage.
- [0039] The invention also relates to a method of nuclear transfer of cells arrested in G₀, or at different times of the cell cycle, into enucleated mammalian oocytes, most preferably bovine oocytes.
- [0040] The invention relates to a method of transgenic embryo transfer into the hormone stimulated uterus of a mammal, most preferably the uterus of a cow .
- [0041] The invention further relates to a method of making a non-human transgenic mammal comprising cloning a nucleic acid sequence encoding the inactive protein of interest into a plasmid whereby the sequence is operably linked to a promoter that will direct the expression of the sequence in mammary cells, resulting in an expression plasmid; transfecting somatic cells with the expression plasmid so that the plasmid is incorporated into the genome of the cells, resulting in transgenic somatic cells; enucleating a mature oocyte, resulting in an enucleated oocyte; fusing one transgenic somatic cell with the enucleated oocyte resulting in a monocell embryo; implanting the embryo in the uterus of a receptive mammal; and monitoring the pregnancy through the birth of the transgenic mammal. The inactive protein of interest may be a modified insulin precursor that does not cause hypoglycemia in the mammal. The modified insulin

- 11 -

precursor is preferably a modified mammalian insulin precursor, more preferably, a modified human insulin precursor, a modified bovine insulin precursor, a modified porcine insulin precursor, a modified ovine insulin precursor, a modified caprine insulin precursor, or a modified rodent insulin precursor, and, most preferably, a modified human insulin precursor. The non-human transgenic mammal may be, but is not limited to, a mammal of bovine species. Other species of transgenic mammals may be, but are not limited to, porcine species, ovine species, caprine species, or rodent species. The promoter may be a beta casein promoter. Suitable beta casein promoters include, but are not limited to, a bovine beta casein promoter or a caprine beta casein promoter. Other beta casein promoters include, but are not limited to, a porcine beta casein promoter, an ovine beta casein promoter, or a rodent beta casein promoter. The plasmid may also contain an antibiotic resistance gene such as the neomycin resistance gene. Further, the expression plasmid may be p β mhulP. The expression plasmid may also be pNJK IP or p β KLE IP.

[0042] The invention further relates to a method of making a non-human transgenic mammal that expresses an inactive form of the protein of interest comprising a nucleic acid sequence encoding a modified insulin precursor that contains a modified C peptide. In the modified insulin precursor, the amino acids encoding the connecting C peptide that is found in naturally occurring proinsulin is replaced by amino acids that are not found in naturally occurring proinsulin. In embodiments, the modified C peptide contains the following three amino acids: Ala-Ala-Lys. Furthermore, the modified insulin precursor may contain a modified B chain. In embodiments, the modified B chain contains all but the C-terminal amino acid of the naturally occurring B chain.

[0043] The invention further relates to a method of making a non-human transgenic mammal that expresses an inactive form of the protein of interest in which the somatic cells may be fibroblasts. Additionally, the transgenic somatic cells may be isolated from a female transgenic that expresses an inactive form of the protein of interest in its milk. The transgenic somatic cells may be fibroblasts.

[0044] The invention further relates to a method of making a non-human transgenic mammal that expresses an inactive form of the protein of interest in which the nucleic

acid sequence encoding the inactive form of the protein of interest is found in both the somatic cells and the germ cells of the mammal

[0045] The invention further relates to a method of making a non-human transgenic mammal of bovine species that produces a recombinant modified human insulin precursor in its milk, whose genome comprises an integrated plasmid, the plasmid comprising a nucleic acid sequence encoding the modified human insulin precursor and a beta casein promoter that directs expression of the sequence in mammary cells of the mammal. Suitable beta casein promoters are described above. The integrated plasmid may contain an antibiotic resistance gene such as the neomycin resistance gene. Further, the integrated plasmid may be p β mhuIP. The integrated plasmid may also be pNJK IP or p β KLE IP.

[0046] The invention further relates to a method of producing an inactive form of a protein of interest comprising making a non-human transgenic mammal which produces the inactive form of the protein of interest in its milk; obtaining the milk from the non-human transgenic mammal; purifying the inactive protein from the milk; converting the inactive form of the protein of interest *in vitro*; and purifying the protein of interest, wherein the protein of interest may be toxic to the non-human transgenic mammal. The inactive protein may be, but is not limited to, precursors, modified precursors or modified forms of the following: antibodies, hormones, growth factors, enzymes, clotting factors, apolipoproteins, receptors, drugs, pharmaceuticals, bioceuticals, nutraceuticals, oncogenes, tumor antigens, tumor suppressors, cytokines, viral antigens, parasitic antigens, and bacterial antigens. Preferably, the inactive protein may be a recombinant modified insulin precursor, more preferably, a recombinant modified mammalian insulin precursor, and most preferably, a recombinant modified human insulin precursor. The non-human transgenic mammal may be, but is not limited to, a mammal of bovine species. Other species of transgenic mammals may be, but are not limited to, porcine species, ovine species, caprine species, or rodent species.

[0047] The invention also relates to a method of producing an inactive form of a protein of interest in a non-human transgenic mammal that is made by a process that comprises cloning a nucleic acid sequence encoding the inactive form of the protein of interest into a

plasmid whereby the sequence is operably linked to a promoter that will direct the expression of the sequence in mammary cells, resulting in an expression plasmid; transfecting somatic cells, optionally fibroblasts, with the plasmid so that the plasmid is incorporated into the genome of the somatic cells, resulting in transgenic somatic cells; enucleating a mature oocyte, resulting in an enucleated oocyte; fusing one transgenic somatic cell with the enucleated oocyte resulting in a monocell embryo; implanting the embryo in the uterus of a receptive mammal; and monitoring the pregnancy through the birth of the transgenic mammal. The inactive protein of interest may be a modified insulin precursor that does not cause hypoglycemia in the mammal. The modified insulin precursor is preferably a modified mammalian insulin precursor, more preferably, a modified human insulin precursor, a modified bovine insulin precursor, a modified porcine insulin precursor, a modified ovine insulin precursor, a modified caprine insulin precursor, or a modified rodent insulin precursor, and, most preferably, a modified human insulin precursor. The non-human transgenic mammal may be, but is not limited to, a mammal of bovine species. Other species of transgenic mammals may be, but are not limited to, porcine species, ovine species, caprine species, or rodent species. The promoter may be a beta casein promoter. Suitable beta casein promoters are described above. The plasmid can also contain an antibiotic resistance gene such as the neomycin resistance gene. Further, the expression plasmid may be p β mhulP. The plasmid can also contain one or more additional genetic elements that will enhance the stability of the plasmid, enhance the stability of the mRNA transcribed from the plasmid, decrease degradation of the modified insulin precursor, and/or increase the expression of the modified insulin precursor. Suitable genetic elements include, but are not limited to, a regulatory element (*e.g.*, a promoter, an enhancer, an insulator, or a transcription termination site), a fragment of the coding sequence of a gene that is not the protein of interest, or the coding sequence of a gene that is not the protein of interest. The expression plasmid can be pNJK IP or p β KLE IP.

[0048] In embodiments, the non-human transgenic mammal that expresses an inactive form of the protein of interest is cloned using a nucleic acid sequence encoding a modified insulin precursor that contains a modified C peptide. In the modified insulin precursor, the amino acids encoding the connecting C peptide that is found in naturally

- 14 -

occurring proinsulin is replaced by amino acids that are not found in naturally occurring proinsulin. In embodiments, the modified C peptide contains the following three amino acids: Ala-Ala-Lys. Furthermore, the modified insulin precursor may contain a modified B chain. In embodiments, the modified B chain contains all but the C-terminal amino acid of the naturally occurring B chain.

[0049] In further embodiments, the non-human transgenic mammal that expresses an inactive form of the protein of interest is made by a process in which the somatic cells may be fibroblasts. Additionally, the transgenic somatic cells may be isolated from a female transgenic that expresses an inactive form of the protein of interest in its milk. The transgenic somatic cells may be fibroblasts.

[0050] In further embodiments, the nucleic acid sequence encoding the inactive form of the protein of interest is found in both the somatic cells and the germ cells of the non-human transgenic mammal that expresses the inactive form of the protein of interest.

[0051] The invention further relates to a method of producing an inactive form of human insulin in a non-human transgenic mammal that produces a recombinant modified human insulin precursor in its milk, whose genome comprises an integrated plasmid, the plasmid comprising a nucleic acid sequence encoding the modified human insulin precursor and a beta casein promoter that directs expression of the sequence in mammary cells of the mammal. Suitable beta casein promoters are described above. The integrated plasmid may contain an antibiotic resistance gene such as the neomycin resistance gene. Further, the integrated plasmid may be p β mhuiP. The integrated plasmid can also contain one or more additional genetic elements that will enhance the stability of the plasmid, enhance the stability of the mRNA transcribed from the plasmid, decrease degradation of the modified insulin precursor, and/or increase the expression of the modified insulin precursor. Suitable genetic elements include, but are not limited to, a regulatory element (e.g., a promoter, an enhancer, an insulator, or a transcription termination site), a fragment of the coding sequence of a gene that is not insulin, or the coding sequence of a gene that is not insulin. The integrated plasmid may be pNJK IP or p β KLE IP.

[0052] Additionally, the invention relates to a method of purifying an inactive form of the protein of interest from the milk of a transgenic mammal that produces the inactive

- 15 -

protein in its milk. The purification method can include chromatography and filtration steps. Different types of chromatography can be employed, and include ion exchange chromatography or reverse phase chromatography. The ion exchange chromatography can be cation exchange chromatography. Further, multiple chromatography steps may be performed.

[0053] The invention further relates to a method of purifying an inactive form of a protein of interest from milk of a non-human transgenic mammal that produces the inactive protein in its milk, comprising obtaining the milk from the non-human transgenic mammal, clarifying the milk of the non-human transgenic mammal, resulting in clarified milk, and subjecting the clarified milk to chromatography, resulting in pure inactive protein. The chromatography steps may include ion exchange chromatography or reverse phase chromatography. The ion exchange chromatography may be cation exchange chromatography. The reverse phase chromatography may use reverse phase matrix such as C4 or C18 reverse phase matrixes. Further, multiple chromatography steps may be performed.

[0054] The invention further relates to a method of purifying an inactive form of a protein of interest from milk of a non-human transgenic mammal which produces the inactive protein in its milk, comprising obtaining the milk from the non-human transgenic mammal, clarifying the milk of the non-human transgenic mammal, resulting in clarified milk, subjecting the clarified milk to cation exchange chromatography, resulting in a cation exchange chromatographed material, subjecting the cation exchange chromatographed material to reverse phase chromatography, resulting in pure inactive protein.

[0055] The inactive protein of interest may be a recombinant modified insulin precursor, preferably, a recombinant modified mammalian insulin precursor, more preferably, a recombinant modified human insulin precursor, a recombinant modified bovine insulin precursor, a recombinant modified porcine insulin precursor, a recombinant modified ovine insulin precursor, a recombinant modified caprine insulin precursor, or a recombinant modified rodent insulin precursor, and, most preferably, a recombinant modified human insulin precursor. Additionally, the modified insulin precursor does not cause hypoglycemia in the non-human transgenic mammal that expresses the modified

insulin precursor. In the modified insulin precursor, the amino acids encoding the connecting C peptide that is found in naturally occurring proinsulin is replaced by amino acids that are not found in naturally occurring proinsulin. In embodiments, the modified C peptide contains the following three amino acids: Ala-Ala-Lys. Furthermore, the modified insulin precursor may contain a modified B chain. In embodiments, the modified B chain contains all but the C-terminal amino acid of the naturally occurring B chain. The non-human transgenic mammals can be, but are not limited to, mammals of bovine species. Other species of transgenic mammals may be, but are not limited to, porcine species, ovine species, caprine species or rodent species.

[0056] The invention further relates to a method of converting an inactive form of the protein of interest into the mature (*i.e.*, active) form of the protein of interest, and then purifying the protein of interest. The conversion can include enzymatic cleavage of the precursor of the protein of interest. The enzymatic cleavage can involve trypsinolysis. The purification of the protein of interest can include chromatography steps. These chromatography steps may include reverse phase chromatography. The reverse phase chromatography may use reverse phase matrix such as C4 or C18 reverse phase matrixes. Further, multiple chromatography steps may be performed.

[0057] The invention further relates to a method of converting a recombinant modified insulin precursor into recombinant insulin, and then purifying the recombinant insulin. The conversion can include enzymatic cleavage and transpeptidation of the recombinant modified insulin precursor. The enzymatic cleavage can involve trypsinolysis. The purification of the recombinant insulin can include chromatography steps. These chromatography steps may include reverse phase chromatography or ion exchange chromatography. Further, multiple chromatography steps may be performed.

[0058] The invention also relates to a method of converting a recombinant modified insulin precursor into recombinant insulin, and then purifying the recombinant insulin. This method comprises subjecting the recombinant modified insulin precursor to trypsinolysis and transpeptidation, resulting in a trypsinized and transpeptidated material, subjecting the trypsinized and transpeptidated material to a first reverse phase chromatography, resulting in a first reverse phase chromatographed material, subjecting the first reverse phase chromatographed material to a second reverse phase

chromatography, resulting in a second reverse phase chromatographed material, and subjecting the second reverse phase chromatographed material to a third reverse phase chromatography, resulting in pure recombinant insulin. The steps of reverse phase chromatography include the use of reverse phase matrixes, preferably C4 or C18 reverse phase matrixes.

[0059] The recombinant insulin and the recombinant modified insulin precursor may be, respectively, a recombinant mammalian insulin and a recombinant modified mammalian insulin precursor, more preferably, recombinant human insulin and a recombinant modified human insulin precursor, recombinant bovine insulin and a recombinant modified bovine insulin precursor, recombinant porcine insulin and a recombinant modified porcine insulin precursor, recombinant ovine insulin and a recombinant modified ovine insulin precursor, recombinant caprine insulin and a recombinant modified caprine insulin precursor, or recombinant rodent insulin and a recombinant modified rodent insulin precursor, respectively, and, most preferably, recombinant human insulin and a recombinant modified human insulin precursor. Additionally, the modified insulin precursor does not cause hypoglycemia in the non-human transgenic mammal that expresses the modified insulin precursor. In the modified insulin precursor, the amino acids encoding the connecting C peptide that is found in naturally occurring proinsulin is replaced by amino acids that are not found in naturally occurring proinsulin. In embodiments, the modified C peptide contains the following three amino acids: Ala-Ala-Lys. Furthermore, the modified insulin precursor may contain a modified B chain. In embodiments, the modified B chain contains all but the C-terminal amino acid of the naturally occurring B chain.

[0060] The invention further relates to a method of producing a protein of interest comprising making a non-human transgenic mammal that produces an inactive form of the protein of interest in its milk, obtaining the milk from the non-human transgenic mammal, purifying the inactive from milk, *in vitro* converting the inactive protein by subjecting the purified inactive protein to enzymatic cleavage, and finally purifying the protein of interest.

[0061] The invention further relates to a method of producing recombinant insulin comprising making a non-human transgenic mammal that produces a recombinant

modified insulin precursor in its milk, obtaining the milk from the non-human transgenic mammal, purifying the recombinant modified insulin precursor from milk, *in vitro* converting the precursor into recombinant insulin by subjecting the purified precursor to enzymatic cleavage and transpeptidation, and finally purifying the recombinant insulin.

[0062] Furthermore, the invention also relates to a method of producing recombinant insulin, comprising making a non-human transgenic mammal which produces a recombinant modified insulin precursor in its milk, obtaining the milk from the non-human transgenic mammal, clarifying the milk, resulting in clarified milk, subjecting the clarified milk to cation exchange chromatography, resulting in a cation exchange chromatographed material, subjecting the cation exchange chromatographed material to reverse phase chromatography, resulting in pure recombinant modified insulin precursor, subjecting the pure recombinant modified insulin precursor to trypsinolysis and transpeptidation, resulting in a trypsinized and transpeptidated material, subjecting the trypsinized and transpeptidated material to a first reverse phase chromatography, resulting in a first reverse phase chromatographed material, subjecting the first reverse phase chromatographed material to a second reverse phase chromatography, resulting in a second reverse phase chromatographed material, and subjecting the second reverse phase chromatographed material to a third reverse phase chromatography, resulting in pure recombinant insulin.

[0063] The recombinant insulin and the recombinant modified insulin precursor may be, respectively, a recombinant mammalian insulin and a recombinant modified mammalian insulin precursor, more preferably, recombinant human insulin and a recombinant modified human insulin precursor, recombinant bovine insulin and a recombinant modified bovine insulin precursor, recombinant porcine insulin and a recombinant modified porcine insulin precursor, recombinant ovine insulin and a recombinant modified ovine insulin precursor, recombinant caprine insulin and a recombinant modified caprine insulin precursor, or recombinant rodent insulin and a recombinant modified rodent insulin precursor, respectively, and, most preferably, recombinant human insulin and a recombinant modified human insulin precursor. The non-human transgenic mammal may be, but is not limited to, a mammal of bovine species. Other species of transgenic mammals may be, but are not limited to, porcine species, ovine species,

34

- 19 -

caprine species or rodent species. The steps of reverse phase chromatography include the use of reverse phase matrixes, preferably C4 or C18 reverse phase matrixes.

[0064] The following examples are illustrative, but not limiting, of the various aspects and features of the present invention.

Example 1

Construction of the expression plasmid

[0065] A construct was generated that contained a large portion of the bovine beta casein gene promoter, including a short fragment of the 5' non-coding beta casein gene region, fused to the coding sequence of a modified human insulin precursor. The short non-translated fragment is a fragment of the first exon of the beta casein gene. The beta casein region employed was about 3.8 kb.

[0066] The construction of the expression plasmid p β mhuIP (see FIG 1) was carried out by inserting the coding sequence of the modified human insulin precursor (mhuIP) and a large portion of the bovine beta casein promoter gene (corresponding to 3,800 bp from the 5' region of the beta casein bovine gene) into an adequate vector. This promoter ensures the tissue specific and developmentally regulated expression of genes under its control, in this case heterologous modified human insulin precursor.

[0067] For a proper selection of transgenic cells, a gene encoding Neomycin Phosphotransferase was included in the plasmid. This gene allows for the selection of transgenic cells with the antibiotic Geneticin, and it is under the control of the SV40 promoter.

[0068] Other constructs can be derived from the original one to improve transfected cell selection or DNA integration efficiency into the bovine cell genome.

[0069] Constructs were analyzed by restriction enzyme analysis and DNA sequencing. The ability of the constructs to express mhuIP was previously tested in a mammary gland cell line by fluorescent antibody recognition.

[0070] The preparation of the plasmid p β mhuIP is described below in detail.

35

- 20 -

Preparation of p β mhuIP

- [0071] A Start Construction was generated, which includes the sequence encoding mhuIP (human proinsulin containing a modified C peptide). mhuIP is similar to human proinsulin except that the C peptide in mhuIP is shorter than the C peptide found in naturally occurring proinsulin.
- [0072] Figure 2 depicts a scheme of the Start Construction. At the beginning, a region encoding a bovine signal peptide can be found, followed by the sequence encoding the B Chain of insulin (lacking the C-terminal amino acid). Then, a region encoding a spacer of three amino acids, Ala-Ala-Lys, can be found, which is followed by the sequence encoding the full A Chain of insulin, and finally a region encoding the mRNA poly A. The three amino acid spacer, Ala-Ala-Lys, replaces the C peptide found in naturally occurring proinsulin.
- [0073] The Start Construction was generated by rebuilding the mhuIP sequence from 6 overlapping, chemically synthesized oligonucleotides containing the recognition sites for restriction enzymes Bam HI and Not I. The primers sequences are shown below:
- [0074] **Ins1:**
5'-ACTGGGATCCATGGCCCTGTGGACACGCCTGCGGCCCTGCTGGCCCTGCT
GGCGC TCTGGCCCCCCCCCGGCCG-3'
- [0075] **Ins2:**
5'-CTCCGCACACCAGGTACAGCGCCTCCACCAGGTGGGAGCCACACAG
ATGCTGGTTG ACGAAGGCGCGGGCCGGGGGGGGG-3'
- [0076] **Ins3:**
5'-ACCTGGTGTGCGGAGAGCGCGGCTTCTTCTACACGCCCAAGGCTGCTAAGG
GCATT G TGGAACAATGCTGTACCAG-3'
- [0077] **Ins4:**
5'-GTGTGGGGCTGCCTGCAGGCTGCGTCTAGTTGCAGTAGTTCTCCAGC
TGGTAGAGG GAGCAGATGCTGGTACAGCA-3'
- [0078] **Ins5:**
5'-CAGGCAGCCCCACACCCGCCGCTCCTGCACCGAGAGAGATGGAAT
AAAGCCCTTG AACCAGCCCTGCTGTGCCGTCTGT-3'

36

- 21 -

[0079] **Ins6:**

5'-TGACGCGGCCGCAGCGTGGAGAGAGCTGGGAGGGGCTCACAACAG
TGCCGGAAG
TGGGGCTTGGCCCAGGGCCCCCAAGACACACAGCAGGCACAGCA-3'

[0080] The rebuilding process was performed by PCR. PCR products were generated from mixes of primers Ins1 and Ins2 (product f12), Ins3 and Ins4 (product f34) and Ins5 and Ins6 (product f56). The same process was then performed using f12 and f34 overlapping fragments in a single mix, which renders the product f14. Finally, the f14 product was used in a PCR in a mix containing f56 to amplify a fragment of approximately 410 bp, comprising the full length mhuIP (fragment f16).

[0081] Once the fragment f16 was obtained, it was cloned into an adequate vector and transformed into competent *E. coli* bacterial cells for further amplification of the cloning vector with its corresponding insert. The vector was derived from pBKCMV. pBKCMV is an expression vector available from Invitrogen Co. (Carlsbad, CA), which encodes a CMV promoter, a neomycin resistance gene, and a kanamycin resistance gene. The CMV promoter was replaced with a 3.8 kb bovine beta casein promoter and fragment f16 was cloned into the resulting vector using the Bam HI and Not I restriction sites.

[0082] After amplification, restriction tests were performed in order to check the identity of the cloned insert. Final confirmation was achieved by sequencing.

[0083] Afterwards, the Start Construction was directionally inserted (Bam HI / Not I) in a plasmid vector downstream to a bovine beta casein promoter of 4 kB. The plasmid vector also contained a neomycin resistance gene. The resulting vector, p β mhuIP, which is the final construct, contained the beta casein promoter, the sequence encoding mhuIP, and the neomycin resistance gene.

[0084] Human proinsulin is made up of three domains: an amino-terminal B chain (30 amino acids), a carboxyl-terminal A chain (21 amino acids), and a connecting peptide in the middle known as the C peptide (31 amino acids). mhuIP differs from the naturally occurring form of human proinsulin in that the C-terminal amino acid of the B chain has been removed and the amino acids encoding the C peptide have been replaced with three amino acids that are normally not found in the C peptide, Ala-Ala-Lys. Mature human insulin, which is made up of only the A chain and the B chain, is formed after cleavage of

37

- 22 -

the C peptide. A transgenic mammal expressing human proinsulin is nonviable because host peptidases can cleave and remove the C peptide, forming mature insulin. As described above, expression of mature human insulin in a non-human transgenic mammal may kill the mammal because the mature human insulin may leak into the blood stream of the mammal. In contrast, a non-human transgenic mammal made using p β mhuIP expresses a modified human insulin precursor that will not cause the transgenic mammal to develop any significant hypoglycemia and will not be toxic to the transgenic mammal. Without being limited to the following, because the region encoding the three amino acid spacer of the modified human insulin precursor differs from the C peptide found in naturally occurring human proinsulin, host peptidases do not recognize and cleave the three amino acid spacer. Consequently, the modified human insulin precursor remains inactive and does not cause hypoglycemia in the transgenic animal, which is an important advantage of the claimed invention.

[0085] Clones were selected which contain beta casein promoter and mhuIP properly fused to express mhuIP only under the control of this promoter.

[0086] The size of this expression plasmid is about 8.4 kbp.

Transfection of somatic cells

[0087] The plasmid p β mhuIP was then used for transfecting a primary culture of somatic cells, using calcium phosphate or a liposome method. Fetal calf fibroblasts were generally employed for the transfection.

[0088] The transfected cells were selected by adding Geneticin to the culture. After a period of 2 to 8 weeks, the cells that were resistant to Geneticin were suitable for being used as donor cells to obtain transgenic clones. Transfected selected cells were analyzed by PCR to verify that the cells contained the expression cassette..

Example 2

Oocyte enucleation and metaphase nuclear transfer in mature enucleated oocytes

Collection and *in vitro* Maturation of bovine oocytes

- 23 -

[0089] Bovine oocytes were aspirated from slaughterhouse ovaries and matured in TCM-199 + 5% FCS + 3 mM HEPES + antimycotics. The selected oocytes were then placed in TCM-199 + Roscovitine, under atmosphere of 5 % CO₂ at 39°C for 20 hs. Afterwards, oocytes were placed in TCM-199 + 5%FCS + FSH (follicle-stimulating hormone) + antibiotics under atmosphere of 5 % CO₂ at 39°C for 24 hs. Mature oocytes were denuded by vortexing for 2 minutes in PBS with 1 mg/ml bovine testis hyaluronidase.

[0090]

Example 3

Nuclear transfer with cumulus cells

Enucleation

[0091] Oocytes were mechanically enucleated using a Narishige hydraulic micromanipulators and Nikon Diaphot microscopy. Enucleation was performed with 20 µm beveled and sharpened pipettes. Oocytes were previously stained with 5 µg/ml bisbenzimidine (Hoechst 33342¹) dye for 20 minutes. Metaphases were enucleated by visualization of the stained chromosomes under ultraviolet light. Metaphase chromosomes were assessed after aspiration inside the pipette. A transgenic somatic cell was transferred into the perivitelline space and tightly opposed to the enucleated oocyte.

Fusion, activation and embryo culture

[0092] A transgenic somatic cell and an enucleated oocyte were manually aligned in the fusion chamber so that the membranes to be fused were parallel to the electrodes. This was done using a glass embryo-handling pipette.

[0093] Fusion was performed using one electrical pulse of 180 volts/cm for 15 µs (BTX Electro Cell Manipulator 200)² and monitored with a BTX Optimizer-Graphic Pulse Analyzer. The chamber for pulsing embryos consisted of two 0.5 mm stainless steel wire

¹ Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA.

² BTX Inc., San Diego, Ca, USA.

- 24 -

electrodes mounted 0.5 mm apart on glass microscope slide. Three hours after fusion, activation was induced by incubation in TL-HEPES with 5 μ M ionomycin for 4 min and in TCM-199 with 2 mM 6-DMAP for 3 hours.

- [0094] The activated oocytes were then cultured in SOF medium under atmosphere of 5% CO₂ + 5% O₂ + 90% N₂ for 6.5 days, until development of blastocysts.
- [0095] Afterwards, embryo transfer into surrogate cows took place. Generally, two blastocysts per recipient cow were non-surgically transferred, and pregnancies at 30-35 days were determined by ultrasonography.
- [0096] The implanted cows were allowed to normally pass the pregnancy up to a natural delivery. Eventually a chirurgic approach (Caesarea) could be used for delivery. The newborns were fed with Ig rich colostrum during the first 48 hours, and then synthetic, later natural (all of them free of animal origin compounds) foods were used.

Example 4

Tests performed on transgenic calves

- [0097] In the current example, we present a full description of the tests performed on a particular transgenic calf, which was obtained as a result of the procedure described in Examples 1 to 3. Nonetheless, it should remain clear that the same set of assays could be performed on bovine that are born as a consequence of other methods for obtaining transgenic calves, such as subcloning of transgenic females, superovulation of a transgenic female followed by artificial insemination, or artificial insemination of transgenic or non-transgenic females with semen from a bull which is transgenic for the desired protein.
- [0098] It was proved by means of PCR reactions performed on DNA purified from the calf's white blood cells, using DNA from non-transgenic jersey calves as the negative control, that bovine beta casein promoter and the sequence encoding modified human insulin precursor are included in the transgenic calf cells genome. They can be found together as a unique DNA fragment that is different from the homologue beta casein gene of the calf.

[0099] It was corroborated, by using a Pharmacia automatic sequencer, that the inserted sequence corresponds to the sequence encoding the modified human insulin precursor contained in the cloning plasmid. The inserted sequence includes the secretion signal and terminator. The bovine beta casein promoter that controls the expression of the modified human insulin precursor sequence in our calf was sequenced, too. All those elements coincide exactly with the expected theoretical sequence from the genetic construct used to transform the cells out of which the clones were generated.

Example 5

Purification of recombinant mhuIP from milk, conversion of mhuIP into human insulin and purification of human insulin

[0100] An amount of recombinant mhuIP protein, necessary for the development of the purification procedure of the precursor from milk, was obtained from fermentation of transformed *Pichia pastoris*. For this purpose, the sequence encoding mhuIP was subcloned in an expression vector downstream a yeast secretion signal sequence, under the control of a promotor inducible by methanol, and transformed in yeast cells.

[0101] After that, selection of a proper clone was performed and a liquid culture was made from the selected clone.

[0102] Fermentation of the transformed yeast clone was made in a medium containing glycerol as the carbon source, oligoelements. Methanol was used for induction. This fermentation rendered 0.5 grams of mhuIP per liter of culture.

[0103] Once the fermentation was over, purification steps were carried out to achieve a pure product.

[0104] The initial goal was to obtain pure recombinant mhuIP from the yeast culture. Thus, the supernatant of a transformed *Pichia pastoris* culture was diluted tenfold with purified water and its pH was adjusted to 3.0 using Glacial Acetic Acid. The conductivity of this solution was verified so that it did not exhibit a value higher than 7 mS/cm. A purification process was afterwards performed, in order to obtain the starting material for the development of the purification process of the recombinant mhuIP from milk of transgenic mammals, and its ulterior conversion into recombinant human insulin.

41

- 26 -

- [0105] First, the aforementioned solution was subjected to a cationic exchange chromatography step employing SP Sepharose FF resin (Amersham), at a flow rate of 100 cm/h. Loading (10 mL of supernatant were loaded per mL of resin) and equilibration of the column were performed employing 5% Acetic acid. For the elution of the protein a gradient of 5% Acetic acid:1M NaCl at pH 3 was applied, starting from a 100:0 ratio of the solutions until a 0:100 ratio of the solutions in a total volume of 25 volumes of the column was reached.
- [0106] In a second purification step, the eluate from the cationic exchange chromatography was subjected to reverse phase chromatography. The previous eluate was diluted fivefold with purified water, and the pH was adjusted to 3 with trifluoroacetic acid (TFA).
- [0107] The resulting solution was loaded into a column containing C4 Baker Wide Pore resin. The flow was set at a rate of 100 cm/h. For loading and equilibration, 0.1% TFA/water was used. For elution, a gradient 0.1 % TFA/water - Acetonitrile was applied, starting from a 100:0 ratio of the solutions until a 0:100 ratio in a total volume of 50 volumes of the column was reached.
- [0108] The overall yield of the previous purification steps was approximately 42 % and mhuIP with a purity degree higher than 95% was obtained.
- [0109] A process comprising the purification of the recombinant mhuIP from milk (since the transgenic mammals will secrete the precursor in their milk), the conversion of the recombinant mhuIP into recombinant human insulin and the final purification of recombinant human insulin was developed. The starting material for this development was obtained by mixing the pure recombinant mhuIP (obtained from *Pichia pastoris*, as described above) with regular cow milk.
- [0110] An exhaustive purification process was developed. This process comprised the steps of: obtaining the skim of the milk by means of tangential filtration and dilution of the obtained eluate to achieve a better solubility of recombinant mhuIP eventually retained in the micelles of casein (clarification); and passage of this solution through a cationic exchange chromatography column. The resulting solution was subjected to a reverse phase chromatography (C4) step and fractions rich in recombinant mhuIP were afterwards subjected to trypsinolysis and transpeptidation. Finally, purification of the

92

- 27 -

recombinant human insulin took place, since it is mandatory, when manufacturing a biopharmaceutical product, that the protein of interest should be purified to homogeneity in order to avoid the presence of possible contaminants in the product.

- [0111] The procedure for the purification of the recombinant mhuIP from milk, the later conversion into recombinant human insulin and the final purification of recombinant human insulin, comprises the following steps in order: (a) tangential flow filtration (clarification), (b) cationic exchange chromatography, (c) reverse phase chromatography (C4), (d) trypsinolysis and transpeptidation, (e) reverse phase chromatography (C4), (f) reverse phase chromatography (C4) and (g) reverse phase chromatography (C18).

Clarification

- [0112] Fresh milk was mixed with a sufficient amount of pure recombinant mhuIP, produced in *P. pastoris* as described previously. Afterwards, the product was subjected to a tangential flow filtration step. Filter pore size was 0.1 μm and the process yield was 80%.

Cationic Exchange Chromatography

- [0113] The material resulting from the previous step was chromatographed employing a cationic exchange matrix. The pH of the solution to be chromatographed was adjusted to 3.0 with Glacial Acetic Acid. The conductivity was checked so that it was not higher than 7 mS/cm.
- [0114] This chromatography step was performed employing SP Sepharose FF resin (Amersham) at a flow rate of 100 cm/h. Loading and equilibration of the column was performed employing 5% Acetic acid. For the elution of the protein a gradient of 5% Acetic acid - 1M NaCl at pH 3 was applied, starting from a 100:0 ratio of the solutions until a 0:100 ratio of the solutions in a total volume of 25 volumes of the column was reached.
- [0115] The chromatography step had a yield of 90%. The selected recombinant mhuIP containing fractions were assayed for total proteins (by Bradford method) and for the protein of interest (by Western Blot), and stored at 2 - 8 °C.

- 28 -

Reverse Phase Chromatography (1)

- [0116] The material resulting from the previous step was then subjected to reverse phase chromatography employing C4 Baker Wide Pore resin. The flow was set at a rate of 100 cm/h. For loading and equilibration, 0.1 % TFA/water was used. For elution, a gradient of 0.1 % TFA/water - Acetonitrile was applied, starting from a 100:0 ratio of the solutions until a 0:100 ratio of the solutions in a total volume of 50 volumes of the column was reached.
- [0117] This step had a yield of 68%.

Trypsinolysis and Transpeptidation

- [0118] The material resulting from the previous step was treated with trypsin.
- [0119] For trypsinolysis, a 10 mM mhuIP solution was incubated with Trypsin (in a concentration of 200 μ M) at 12 °C for 24 hours
- [0120] Once the incubation was finished, the transpeptidation reaction was performed in order to add the Threonine in position 30 of the B Chain of human insulin. For this purpose, a solution containing 0.8 M Thr-Obu, 50% DMF/EtOH (1:1), 26 % H₂O, Acetic acid, 10 mM mhuIP, and 200 μ M Trypsin was prepared, and the transpeptidation reaction was allowed to progress until completion.
- [0121] Once the transpeptidation step had finished, the resulting solution was subjected to three successive reverse phase chromatography steps in order to yield pure recombinant human insulin.

Reverse Phase Chromatography (2)

- [0122] The material resulting from the previous step was subjected to reverse phase chromatography.
- [0123] First, a dilution of the material of the previous digestion was up to 0.125 mg/mL using 50 mM NaH₂PO₄, pH 5.0. Afterwards, 50 μ L of Acetic acid per 100 mL of solution was added. The sample was then clear, the pH was around 4.5, and the sample was ready to be loaded.

- 29 -

- [0124] Buffers compositions are described below:
- [0125] Mobile Phase A (MPA): 210 mL sulfate buffer + 790 mL of purified water (conductivity around 48 mS)
- [0126] Mobile Phase B (MPB): 105 mL sulfate buffer + 40 % Acetonitrile, purified water q.s.p. to 1 L.
- [0127] 1 L of sulfate buffer contains 132.1 gr. of NH_4SO_4 , 14 mL of H_2SO_4 and its pH is adjusted at 2.00.
- [0128] After loading, the elution was performed at a flow rate of 100 cm/h as follows: first, a gradient MPA-MPB was applied, starting from a 100:0 ratio of the solutions until a 55:45 ratio of the solutions in a total volume of 135 mL was reached; afterwards, another gradient MPA-MPB was applied, starting from a 55:45 ratio of the solutions until a 25:75 ratio of the solutions in a total volume of 360 mL was reached; and, last, a final gradient MPA-MPB was applied, starting from a 25:75 ratio of the solutions until a 0:100 ratio of the solutions in a total volume of 50 mL was reached.
- [0129] The obtained fraction contains recombinant human insulin with a purity of over 98 % and the yield of this step is around 85%.

Reverse Phase Chromatography (3)

- [0130] The material resulting from the previous step was conditioned for this step by adjusting its pH to 7.4.
- [0131] The resulting solution was then chromatographed employing a C4 Baker Wide Pore matrix. The flow was set at a rate of 100 cm/h. For loading and equilibration, 0.1% TFA/water was used. For elution, a gradient of 0.1 % TFA/water - Acetonitrile was applied, starting from a 100:0 ratio of the solutions until a 0:100 ratio of the solutions in a total volume of 50 volumes of the column was reached.
- [0132] This step had a yield of approximately 65%.

Reverse Phase Chromatography (4)

- [0133] The material obtained in the previous step was conditioned for a final reverse phase chromatography step by adjusting its pH to 3.0.

- 30 -

- [0134] The conditioned material was then chromatographed employing a C18 reverse phase matrix. The flow was set at a rate of 100 cm/h. For loading and equilibration, 0.1% TFA/water was used. For elution, a gradient of 0.1 % TFA/water - Acetonitrile was applied, starting from a 100:0 ratio of the solutions until a 0:100 ratio of the solutions in a total volume of 50 volumes of the column was reached.
- [0135] This step had a yield of approximately 61 %.

Example 6

Construction of the expression plasmid pNJK IP

- [0136] An alternative construct to express mhuIP in transgenic bovine mammary glands was generated, containing a large portion of the caprine beta casein gene promoter, fused to a fragment of the coding sequence of the chicken β globin insulator. Insulators are DNA sequence elements that shield a promoter from nearby regulatory elements, including nearby silencing sequences that inhibit gene expression. This alternative construct containing the chicken β globin insulator was generated in order to block inhibition of the beta casein promoter by any nearby silencing sequences.
- [0137] The construction of this alternative plasmid was carried out, first, by excising from pBC1, which is a commercial vector available from Invitrogen Co. (Carlsbad, CA), a 15 kb fragment containing: a 2.4 kb fragment of the chicken β globin insulator, a 3.1 kb caprine beta casein promoter sequence, including the introns and the nontranslatable exons from the caprine beta casein gene, a Xho I cloning site between the introns and the nontranslatable exons from the caprine beta casein gene, and the poly A signal and the flanking regions from the 3' beta casein genomic sequence.
- [0138] This 15 kb fragment was cloned into the backbone of p β mhuIP. First, the 3.8 kb bovine beta casein promoter and the mhuIP fragment from p β mhuIP was excised. The 15 kb fragment was inserted into this vector using the Sal I and Not I restriction sites. Then, the 410 bp mhuIP fl6 fragment was cloned into the Xho I cloning site located in the 15 kb fragment (between the introns and the nontranslatable exons from the caprine beta casein gene, as described above).

[0139] The resulting vector (pNJK IP, Figure 3) was transformed into competent *E. coli* bacterial cells for further amplification of the cloning vector with its corresponding insert.

[0140] After amplification, restriction site analysis was performed to check the orientation of the mhuIP fl6 fragment insert. Final confirmation was achieved by sequencing.

Example 7

Construction of the expression plasmid p β KLE IP

[0141] An alternative construct to express mhuIP in transgenic bovine mammary glands was generated, containing a large portion of the bovine beta casein gene promoter, including a short non-translated fragment of the first exon of the beta casein gene, fused to the coding sequence of a large portion of the bovine alfa lactalbumin gene, followed by an enterokinase cleavage site, which is followed by the coding sequence of the modified human insulin precursor (mhuIP). This alternative construct expresses an alfa lactalbumin-mhuIP fusion protein. Because of its larger sequence, this alternative construct should yield mRNA with higher stability. In addition, because alfa lactalbumin is a protein naturally expressed in the bovine mammary gland, this alternative construct should minimize mhuIP degradation and increase mhuIP expression

[0142] In order to generate this construct, first, a PCR reaction was performed using DNA from leucocytes of bovine peripheral blood as template, to clone a large portion of the alfa lactalbumin gene. The PCR product comprised about 700 bp of alfa lactalbumin up to the end of the second exon and included the alfa lactalbumin signal sequence.

[0143] The first PCR reaction employed the following oligonucleotides:

[0144] NES: GGA GGT GAG CAG TGT GGT GAC

[0145] ALB: GAA GTT ACT CAC TGT CAC AGG AGA

[0146] Then, a second PCR reaction was performed, employing the following oligonucleotides:

[0147] SIG: TCA CCA AAA TGA TGT CCT TTG TC

[0148] LAC: TGT CAC AGG AGA TGT TAC AGA

- 32 -

- [0149] Through this procedure, a 620 bp fragment was obtained and cloned into pUC using the Sma I restriction site (pUC alpha lactalbumin).
- [0150] The mhuIP gene bearing fragment was obtained by PCR from an in-house IP cloning plasmid, with the following oligonucleotides:
- [0151] EKB: tag gct agc gat gat gat aaa ttc gtt aac
- [0152] cag cac ctg
- [0153] CadAr: tca gcg gcc gc tta gtt gca gta gtt
- [0154] The resultant resultant 260 bp fragment included a short sequence coding for the enterokinase recognition site upstream from the coding sequence of mhuIP. The enterokinase cleavage site allows the separation of the IP from the rest of the peptide. The 260 bp fragment was then digested with NheI and inserted into compatible Xba I restriction sites in pUC alpha lactalbumin. A resultant construct was selected in which the 260 bp fragment was positioned downstream from the alpha lactalbumin gene in the correct orientation. This construct has the coding sequence of a large portion of the bovine alpha lactalbumin gene, including the alpha lactalbumin signal sequence, followed by an enterokinase recognition site, which is further followed by the coding sequence of the modified human insulin precursor (mhuIP).
- [0155] pUC alpha lactalbumin plasmid was first digested with EcoRI, and the resulting cohesive end was Klenow treated. In addition, NotI digestion was performed and the resulting gene fragment was isolated. The pBK plasmid bearing beta casein promoter was digested in the unique BamHI site located at the 3' end of the said promoter region, for the alpha lactalbumin gene fusion to be ligated. Therefore, BamHI site was also blunted to ligate to the EcoRI blunted end from the fragment, but NotI digestion of pBK plasmid was done before to provide homologous ends to the NotI end of the insert.
- [0156] p β KLE IP was then transformed into competent *E. coli* bacterial cells for further amplification of the cloning vector with its corresponding insert.
- [0157] After amplification, final confirmation was achieved by sequencing.
- [0158] Having now fully described the invention, it will be understood by those of ordinary skill in the art that the same can be performed within a wide and equivalent range of conditions, formulations and other parameters without affecting the scope of the

- 34 -

WHAT IS CLAIMED IS:

1. A method of producing insulin comprising:
 - a) making a non-human transgenic mammal that produces a modified insulin precursor in its milk;
 - b) obtaining the milk from the non-human transgenic mammal;
 - c) purifying the modified insulin precursor from the milk, resulting in a pure modified insulin precursor;
 - d) converting the pure modified insulin precursor into the insulin; and
 - e) purifying the insulin.
2. The method of claim 1, wherein the non-human transgenic mammal is made by a process comprising:
 - a) cloning a nucleic acid sequence that encodes the modified insulin precursor into a plasmid whereby the sequence is operably linked to a promoter that will direct the expression of the sequence in mammary cells, resulting in an expression plasmid;
 - b) transfecting somatic cells with the expression plasmid so that the plasmid is incorporated into the genome of the somatic cells, resulting in transgenic somatic cells;
 - c) enucleating a mature oocyte, resulting in an enucleated oocyte;
 - d) fusing one of the transgenic somatic cells with the enucleated oocyte resulting in a monocell embryo;
 - e) implanting the embryo in the uterus of a receptive mammal; and
 - f) monitoring the pregnancy through the birth of the transgenic mammal.

- 35 -

3. The method of claim 2, wherein the promoter is a beta casein promoter, and wherein the modified insulin precursor is a modified mammalian insulin precursor.
4. The method of claim 3, wherein the modified mammalian insulin precursor is a modified human insulin precursor, a modified bovine insulin precursor, a modified porcine insulin precursor, a modified ovine insulin precursor, a modified caprine insulin, or a modified rodent insulin precursor.
5. The method of claim 4, wherein the modified mammalian insulin precursor is a modified human insulin precursor.
6. The method of claim 5, wherein the expression plasmid further comprises a neomycin resistance gene.
7. The method of claim 6, wherein the expression plasmid is p β mhuIP.
8. The method of claim 6, wherein the expression plasmid is pNJK IP.
9. The method of claim 6, wherein the expression plasmid is p β KLE IP.
10. The method of claim 2, wherein the mammal is a bovine that produces a modified human insulin precursor in its milk, whose genome comprises an integrated plasmid, wherein the plasmid comprises a sequence encoding the modified human insulin precursor and a beta casein promoter which directs expression of the sequence in mammary cells of the mammal.
11. The method of claim 10, wherein the plasmid further comprises a neomycin resistance gene.
12. The method of claim 11, wherein the plasmid is p β mhuIP.
13. The method of claim 11, wherein the plasmid is pNJK IP.
14. The method of claim 2, wherein the mammal is a bovine that produces a fusion protein comprising a fragment of alfa lactalbumin, an enterokinase cleavage site and a modified

- 36 -

human insulin precursor in its milk, whose genome comprises an integrated plasmid, wherein the plasmid comprises a sequence encoding the fusion protein and a beta casein promoter which directs expression of the sequence in mammary cells of the mammal.

15. The method of claim 14, wherein the plasmid further comprises a neomycin resistance gene.
16. The method of claim 15, wherein the plasmid is p β KLE IP.
17. The method of claim 2, wherein the somatic cells are fibroblasts.
18. The method of claim 2, wherein the transgenic somatic cells are obtained by isolation from a female transgenic for the production of the modified insulin precursor in its milk.
19. The method of claim 18, wherein the transgenic somatic cells are fibroblasts.
20. The method of claim 1, 2 or 18, wherein the mammal is of bovine species, porcine species, ovine species, caprine species or rodent species.
21. The method of claim 20, wherein the mammal is of bovine species.
22. The method of claim 1, 2 or 18, wherein the insulin and the modified insulin precursor are, respectively, mammalian insulin and modified mammalian insulin precursor.
23. The method of claim 22, wherein the mammalian insulin and the modified mammalian insulin precursor are, respectively, human insulin and modified human insulin precursor, bovine insulin and modified bovine insulin precursor, porcine insulin and modified porcine insulin precursor, ovine insulin and modified ovine insulin precursor, caprine insulin and modified caprine insulin, or rodent insulin and modified rodent insulin precursor.
24. The method of claim 23, wherein the mammalian insulin and the modified mammalian insulin precursor are, respectively, human insulin and modified human insulin precursor.

52

- 37 -

25. The method of claim 1, 2 or 18, wherein the modified insulin precursor does not cause hypoglycemia in the non-human transgenic animal.
26. The method of claim 25, wherein the modified insulin precursor comprises a modified C peptide.
27. The method of claim 26, wherein the modified C peptide comprises amino acids that are not normally found in naturally occurring proinsulin.
28. The method of claim 27, wherein the modified C peptide comprises the following three amino acids: Ala-Ala-Lys.
29. The method of claim 26, wherein the modified insulin precursor further comprises a modified B chain.
30. The method of claim 29, wherein the modified B chain comprises all but the C-terminal amino acid of the naturally occurring B chain.
31. The method of claim 1, 2 or 18, wherein the sequence encoding the modified insulin precursor, operably linked to a promoter that directs the expression of the nucleic acid sequence in mammary cells, is found in somatic cells and germ cells of the mammal.
32. A method of purifying a modified insulin precursor from milk of a non-human transgenic mammal that produces the modified insulin precursor in its milk, comprising:
 - a) clarifying the milk of the non-human transgenic mammal, resulting in clarified milk; and
 - b) subjecting the clarified milk to chromatography, resulting in pure modified insulin precursor.
33. The method of claim 32, wherein the chromatography is ion exchange chromatography or reverse phase chromatography.
34. The method of claim 33, wherein multiple chromatography steps are performed.

- 38 -

35. The method of claim 33, wherein the ion exchange chromatography is cation exchange chromatography.
36. A method of purifying a modified insulin precursor from milk of a non-human transgenic mammal that produces the modified insulin precursor in its milk, comprising:
 - a) clarifying the milk of the non-human transgenic mammal, resulting in clarified milk;
 - b) subjecting the clarified milk to cation exchange chromatography, resulting in a cation exchange chromatographed material; and
 - c) subjecting the cation exchange chromatographed material to reverse phase chromatography, resulting in pure modified insulin precursor.
37. The method of claim 32 or 36, wherein the modified insulin precursor is a modified mammalian insulin precursor.
38. The method of claim 37, wherein the modified mammalian insulin precursor is modified human insulin precursor, modified bovine insulin precursor, modified porcine insulin precursor, modified ovine insulin precursor, modified caprine insulin precursor, or modified rodent insulin precursor.
39. The method of claim 38, wherein the modified mammalian insulin precursor is modified human insulin precursor.
40. The method of claim 32 or 36, wherein the non-human transgenic mammal is of bovine species.
41. The method of claim 32 or 36, wherein the non-human transgenic mammal is a pig, sheep, goat or rodent.
42. The method of claim 32 or 36, wherein the modified insulin precursor does not cause hypoglycemia in the non-human transgenic animal.

- 39 -

43. The method of claim 42, wherein the modified insulin precursor comprises a modified C peptide.
44. The method of claim 43, wherein the modified C peptide comprises amino acids that are not normally found in naturally occurring proinsulin.
45. The method of claim 44, wherein the modified C peptide comprises the following three amino acids: Ala-Ala-Lys.
46. The method of claim 43, wherein the modified insulin precursor further comprises a modified B chain.
47. The method of claim 46, wherein the modified B chain comprises all but the C-terminal amino acid of the naturally occurring B chain.
48. A method of converting a modified insulin precursor into insulin, and purifying the insulin, comprising:
 - a) subjecting the modified insulin precursor to an enzymatic cleavage and a transpeptidation, resulting in a cleaved and transpeptidated material,
 - b) subjecting the cleaved and transpeptidated material to chromatography, resulting in pure insulin.
49. The method of claim 48, wherein the enzymatic cleavage is trypsinolysis.
50. The method of claim 48, wherein the chromatography is reverse phase chromatography.
51. The method of claim 50, wherein multiple chromatography steps are performed.
52. The method of claim 51, wherein three chromatography steps are performed.
53. The method of claim 52, wherein the chromatography steps comprise the use of reverse phase matrixes.

- 40 -

54. The method of claim 53, wherein the reverse phase matrixes are C4 or C18 reverse phase matrixes.
55. A method of converting a modified insulin precursor into insulin, and purifying the insulin, comprising:
- a) subjecting the modified insulin precursor to trypsinolysis and transpeptidation, resulting in a trypsinized and transpeptidated material;
 - b) subjecting the trypsinized and transpeptidated material to a first reverse phase chromatography, resulting in a first reverse phase chromatographed material;
 - c) subjecting the first reverse phase chromatographed material to a second reverse phase chromatography, resulting in a second reverse phase chromatographed material; and
 - d) subjecting the second reverse phase chromatographed material to a third reverse phase chromatography, resulting in pure insulin.
56. The method of claim 55, wherein the reverse phase chromatography steps comprise the use of reverse phase matrixes.
57. The method of claim 56, wherein the reverse phase matrixes are C4 or C18 reverse phase matrixes.
58. The method of claim 48 or 55, wherein the insulin and the modified insulin precursor are, respectively, mammalian insulin and modified mammalian insulin precursor.
59. The method of claim 58, wherein the mammalian insulin and the modified mammalian insulin precursor are, respectively, human insulin and modified human insulin precursor, bovine insulin and modified bovine insulin precursor, porcine insulin and modified porcine insulin precursor, ovine insulin and modified ovine insulin precursor, caprine insulin and modified caprine insulin precursor, or rodent insulin and modified rodent insulin precursor.

56

- 41 -

60. The method of claim 59, wherein the mammalian insulin and the modified mammalian insulin precursor are, respectively, human insulin and a modified human insulin precursor.
61. The method of claim 48 or 55, wherein the modified insulin precursor does not cause hypoglycemia in the non-human transgenic animal.
62. The method of claim 61, wherein the modified insulin precursor comprises a modified C peptide.
63. The method of claim 62, wherein the modified C peptide comprises amino acids that are not normally found in naturally occurring proinsulin.
64. The method of claim 63, wherein the modified C peptide comprises the following three amino acids: Ala-Ala-Lys.
65. The method of claim 62, wherein the modified insulin precursor further comprises a modified B chain.
66. The method of claim 65, wherein the modified B chain comprises all but the C-terminal amino acid of the naturally occurring B chain.
67. The method of claim 1, wherein the purification of the modified insulin precursor from milk comprises:
 - a) clarifying the milk of the non-human transgenic mammal, resulting in clarified milk; and
 - b) subjecting the clarified milk to chromatography, resulting in pure modified insulin precursor.
68. The method of claim 67, wherein the chromatography is ion exchange chromatography or reverse phase chromatography.
69. The method of claim 68, wherein multiple chromatography steps are performed.

70. The method of claim 68, wherein the ion exchange chromatography is cation exchange chromatography.
71. The method of claim 1, wherein the conversion of the modified insulin precursor into the insulin, comprises:
- a) subjecting the modified insulin precursor to an enzymatic cleavage and a transpeptidation, resulting in a cleaved and transpeptidated material;
 - b) subjecting the cleaved and transpeptidated material to chromatography, resulting in pure insulin.
72. The method of claim 71, wherein the enzymatic cleavage is trypsinolysis.
73. The method of claim 71, wherein the chromatography is reverse phase chromatography.
74. The method of claim 73, wherein multiple chromatography steps are performed.
75. The method of claim 74, wherein three chromatography steps are performed.
76. The method of claim 75, wherein the chromatography steps comprise the use of reverse phase matrixes.
77. The method of claim 76, wherein the reverse phase matrixes are C4 or C18 reverse phase matrixes.
78. A method of producing insulin, comprising:
- a) making a non-human transgenic mammal that produces a modified insulin precursor in its milk;
 - b) obtaining the milk from the non-human transgenic mammal;
 - c) clarifying the milk, resulting in clarified milk;

SG

- 43 -

d) subjecting the clarified milk to cation exchange chromatography, resulting in a cation exchange chromatographed material;

e) subjecting the cation exchange chromatographed material to reverse phase chromatography, resulting in pure modified insulin precursor;

f) subjecting the pure modified insulin precursor to trypsinolysis and transpeptidation, resulting in a trypsinized and transpeptidated material;

g) subjecting the trypsinized and transpeptidated material to a first reverse phase chromatography, resulting in a first reverse phase chromatographed material;

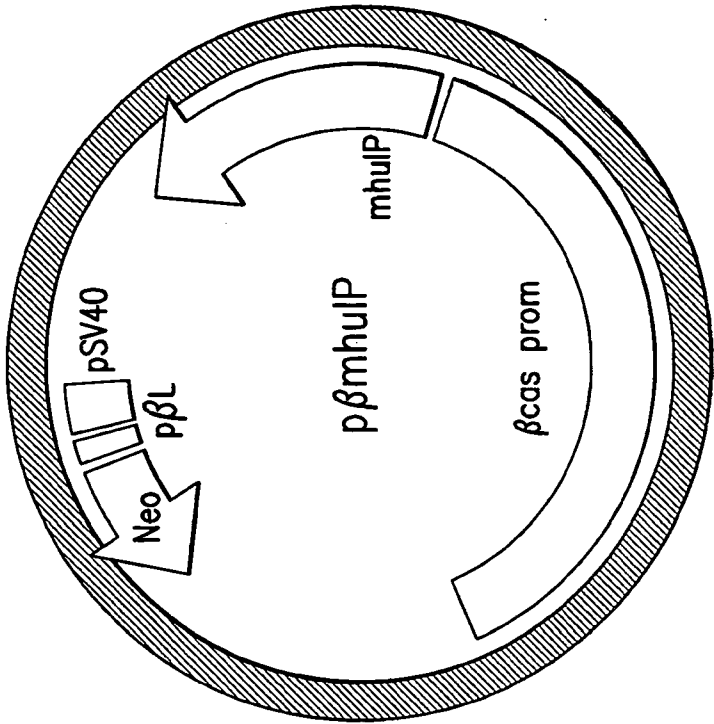
h) subjecting the first reverse phase chromatographed material to a second reverse phase chromatography, resulting in a second reverse phase chromatographed material; and

i) subjecting the second reverse phase chromatographed material to a third reverse phase chromatography, resulting in pure insulin.

79. The method of claim 78, wherein the reverse phase chromatography steps comprise the use of reverse phase matrixes.
80. The method of claim 79, wherein the reverse phase matrixes are C4 or C18 reverse phase matrixes.
81. The method of claim 78, wherein the insulin and the modified insulin precursor are, respectively, mammalian insulin and modified mammalian insulin precursor.
82. The method of claim 81, wherein the mammalian insulin and the modified mammalian insulin precursor are, respectively, human insulin and modified human insulin precursor, bovine insulin and modified bovine insulin precursor, porcine insulin and modified porcine insulin precursor, ovine insulin and modified ovine insulin precursor, caprine insulin and modified caprine insulin precursor, or rodent insulin and modified rodent insulin precursor.

- 44 -

83. The method of claim 82, wherein the mammalian insulin and the modified mammalian insulin precursor are, respectively, human insulin and modified human insulin precursor.
84. The method of claim 78, wherein the non-human transgenic mammal is of bovine species.
85. The method of claim 78, wherein the non-human transgenic mammal is a pig, sheep, goat or rodent.
86. The method of claim 78, wherein the modified insulin precursor does not cause hypoglycemia in the non-human transgenic animal.
87. The method of claim 86, wherein the modified insulin precursor comprises a modified C peptide.
88. The method of claim 87, wherein the modified C peptide comprises amino acids that are not normally found in naturally occurring proinsulin.
89. The method of claim 88, wherein the modified C peptide comprises the following three amino acids: Ala-Ala-Lys.
90. The method of claim 87, wherein the modified insulin precursor further comprises a modified B chain.
91. The method of claim 90, wherein the modified B chain comprises all but the C-terminal amino acid of the naturally occurring B chain.



Plasmid pβmhulP

FIG. 1

3/4

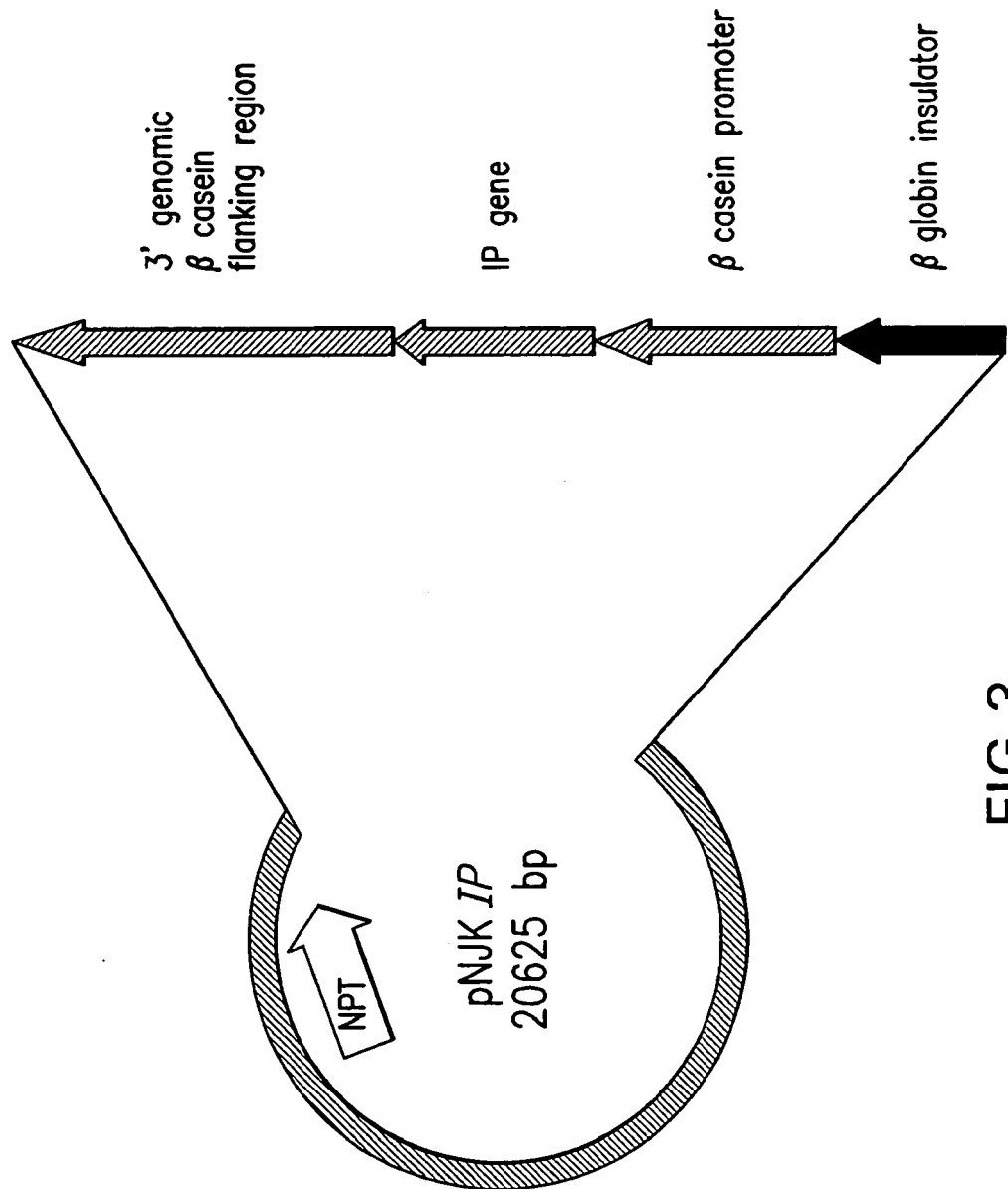


FIG.3

63

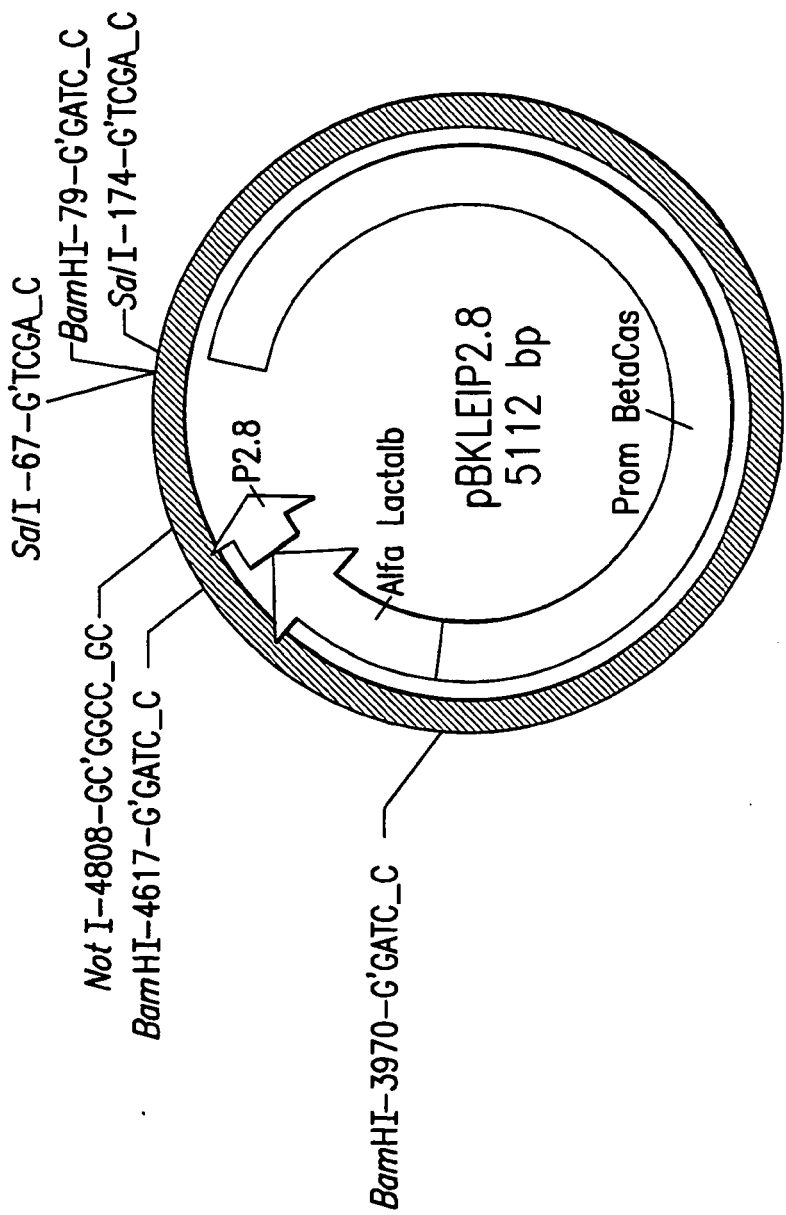


FIG.4

PROCESO PARA LA PRODUCCIÓN DE PROTEÍNA EXÓGENA EN LA LECHE
DE MAMÍFEROS TRANSGÉNICOS

ANTECEDENTE DE LA INVENCION

5

[0001] Los factores de la proteína y las hormonas involucradas en el cuidado de la salud humana se han producido habitualmente en la industria farmacéutica mediante la extracción o por medio de tecnología recombinante en las décadas pasadas. La expresión de las construcciones genéticas que involucran los genes

10 deseados que fueron exitosamente logrados en bacterias, levaduras o líneas celulares de mamíferos. Sin embargo, el uso de cultivos celulares de mamíferos para obtener proteínas en complejo, tal como aquellas que requieren un patrón de glicosilación adecuado, involucran procedimientos de alto costo.

15

[0002] La tecnología de ADN recombinante se ha utilizado de manera creciente durante la pasada década para la producción de materiales biológicos comercialmente importantes. Para este fin, se han clonado las secuencias de ADN que codifican una variedad de proteínas humanas médicamente importantes. Estas incluyen insulina, activador de plasminógeno, alfa 1-antitripsina y los

20 factores de coagulación VIII y IX. Actualmente, aún con las técnicas de ADN recombinante emergentes, estas proteínas se purifican usualmente de la sangre y el tejido, un proceso costoso y que consume tiempo el cual puede llevar el riesgo de transmitir agentes infecciosos tales como aquellos que originan el SIDA y la hepatitis.

25

[0003] Aunque la expresión de las secuencias de ADN en bacterias para producir las proteínas médicamente importantes deseadas parece una propuesta

atractiva, en la práctica las bacterias a menudo prueban ser insatisfactorias como huéspedes debido a que las proteínas extrañas a las células bacterianas son inestables y no se procesan de manera correcta.

5 [0004] Reconociendo este problema, se ha intentado la expresión de genes clonados en cultivos de tejido de mamíferos y en algunos casos se ha probado como una estrategia viable. Sin embargo, la fermentación en tanga de las células de mamífero es un proceso costoso y de exigencia técnica.

10 [0005] Existe por lo tanto necesidad de un proceso de bajo costo y alto rendimiento para la producción de sustancias biológicas tales como los polipéptidos eucarióticos correctamente modificados. La ausencia de agentes que sean infecciosos a los humanos sería una ventaja en tales procesos.

15 [0006] La posibilidad de obtener mamíferos transgénicos, como ganado, para un gen deseado, con el objeto de conseguir grandes cantidades de proteína humana en la leche, ha sido de gran interés para la industria. Varios grupos en la literatura reportan su éxito en la producción de sero albúmina humana, anti-tripsina alfa, y algunos otros ejemplos de vacas o cabras transgénicas.

20

[0007] Muchos experimentos se han efectuado previamente en ratones o ratas, y la expresión del transgen se prefiere siempre que se confinara a las glándulas mamarias en razón a que se emplearon promotores de beta caseína o lactoalbúmina, que corresponden solamente a los factores de transcripción de la
25 glándula mamaria en hembras lactantes.

[0008] La expresión de una proteína heteróloga exclusivamente en la leche pretende evitar la influencia indeseada en la salud del mamífero huésped y suministrar un método fácil para purificación.

5 [0009] La expresión de proteínas heterólogas en bacterias o cultivos de células se puede evitar o impedir debido a un efecto tóxico de la proteína recombinante sobre el mamífero huésped. Se pueden encontrar muchos ejemplos en la literatura donde una cierta proteína, aún una naturalmente no tóxica, no se puede expresar en un sistema particular porque es riesgosa para el huésped, aún produciendo su
10 muerte. La causa de la muerte puede ser la alta concentración de la proteína dentro de la célula, la alta concentración de la proteína secretada o una interacción específica con la proteína y algún componente celular que origina actividad citopática en el huésped extraño.

15 [0010] Se han desarrollado varios métodos para solucionar estos inconvenientes para lograr una expresión de gen heteróloga de proteínas tóxicas, incluyendo el uso de proteínas de fusión, modificar la secuencia original de la proteína, expresar separadamente los diferentes polipéptidos de una proteína, etc. (Ver *Protein Expression and Purification*, 2001 Aug; 22(3):422-0).

20

[0011] Un efecto similar puede resultar cuando se expresan proteínas recombinantes en ganado transgénico. En la generación de un mamífero transgénico, se transfecta una célula para obtener un clon transgénico que lleva el gen heterólogo de interés y luego se utiliza para generar el mamífero transgénico.

25 Este proceso generalmente conduce a la inserción de la secuencia de interés en el genoma del huésped, un evento que a su vez debe conducir a la expresión de la proteína heteróloga en el tejido o glándula objetivo si se utiliza un promotor

específico, o sistemáticamente si se emplea un promotor general. El nivel de expresión de la proteína dependerá de una variedad de factores, incluyendo la localización dentro del genoma donde tuvo lugar la inserción.

5 [0012] Aún cuando la expresión del gen está dirigida a un promotor específico de tejido, se ha observado escape de la proteína externa hacia el sistema de circulación periférico en muchas diferentes especies de mamíferos con varias proteínas (Ver *Life Sciences*, 2006 Jan 25;78(9):1003-9. Epub 2005 Sep 15; y *Journal of Biotechnology*, 2006 Jul 13;124(2):469-72. Epub 2006 May 23). Este
10 escape puede tener consecuencias biológicas relevantes dependiendo del nivel de expresión, el nivel de escape, la naturaleza de la proteína heteróloga, la relación entre especies (proteína huésped y extraña) y la capacidad de la proteína heteróloga a interactuar con los receptores huésped. Dada la similaridad con la proteína homóloga huésped, algunas de estas proteínas transgénicamente
15 expresadas pueden ejercer su actividad biológica natural sobre el huésped extraño y pueden originar un efecto patológico que podría causar la muerte del mamífero (Ver *Endocrinology* 1997 Jul; 138(7):2849-55). Además, es posible que la proteína heteróloga no afecte la salud del mamífero a través de una interacción con los correspondientes receptores huéspedes homólogos, sino a través de un efecto
20 tóxico, no específico que ocurra cuando se expresan en bacterias algunas proteínas heterólogas.

[0013] Esta invención suministra soluciones innovadoras a los inconvenientes habitualmente asociados con expresar una proteína en mamíferos transgénicos
25 que tengan un efecto tóxico sobre los mamíferos.

RESUMEN DE LA INVENCION

[0014] La invención se relaciona con un mamífero no humano que es útil para la producción de una proteína de interés que puede ser tóxica para el mamífero.

5 Este mamífero se caracteriza por el hecho de que es transgénico para la producción en su leche de una forma inactiva de la proteína de interés. La forma inactiva de la proteína de interés es una forma de proteína de interés que no es tóxica al mamífero transgénico no humano que expresa la proteína de interés. Como se utiliza aquí, tóxica significa que causa serio riesgo o muerte. Una forma

10 inactiva de la proteína de interés puede tener alguna actividad biológica en el mamífero transgénico no humano que expresa la forma inactiva de la proteína de interés; sin embargo, la forma inactiva de la proteína de interés no es tóxica para el mamífero transgénico no humano (es decir, el mamífero no muere y no sufre daños serios). La forma inactiva de la proteína se puede activar *in vitro*. Esta

15 proteína inactiva, posiblemente una especie no natural de la proteína, puede ser, pero no se limita a, un precursor modificado de insulina humana recombinante. La proteína de interés puede ser, pero no se limita a, insulina humana recombinante. El mamífero transgénico humano puede ser, pero no se limita a, un mamífero de la especie bovina.

20

[0015] La invención se relaciona además con un plásmido que suministra la expresión de la forma inactiva de la proteína de interés en las células mamarias de mamíferos en las cuales la expresión se regula por el promotor de caseína beta.

25 [0016] La presente invención se relaciona además con un método de producción, empleando mamíferos transgénicos no humanos, de una proteína de interés que puede ser tóxica para los mamíferos transgénicos no humanos. La

toxicidad potencial de la proteína se evita al expresar la proteína como una proteína inactiva. Esta proteína inactiva, posiblemente una especie no natural de la proteína, puede ser, pero no se limita a, un precursor modificado de insulina humana recombinante. La proteína de interés puede ser, pero no se limita a, insulina humana recombinante. El mamífero transgénico no humano puede ser, pero no se limita a, un mamífero de la especie bovina.

[0017] La invención también se relaciona con un método para producir insulina recombinante, que comprende hacer un mamífero transgénico no humano que produce un precursor modificado de insulina recombinante en su leche, obtener la leche del mamífero transgénico no humano, purificar el precursor de la leche, someter el precursor purificado a clivaje enzimático y transpeptidación con el fin de producir insulina recombinante, y purificar la insulina recombinante. La insulina recombinante puede ser, pero no se limita a, insulina humana recombinante. El mamífero transgénico puede ser, pero no se limita a, un mamífero de la especie bovina.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[0018] La Figura 1 muestra un esquema del plásmido de expresión p β mhulP, que contiene una secuencia genética que codifica el precursor modificado de insulina humana (mhulP) y un promotor que dirige su expresión a células mamarias.

[0019] La Figura 2 muestra un esquema Start Construction, que comprende la secuencia que codifica mhulP.

[0020] La Figura 3 muestra un esquema del plásmido de expresión pNJK IP, que contiene la secuencia genética que codifica el precursor modificado de insulina humana (mhulP), un promotor que dirige su expresión a células mamarias, y un fragmento de la secuencia codificante del aislador de β globina de pollo.

[0021] La Figura 4 muestra un esquema de expresión del plásmido p β KLE IP, que contiene la secuencia genética que codifica el precursor modificado de insulina humana (mhulP), un promotor que dirige su expresión a células mamarias, una gran porción de la secuencia codificante del gen de lactalbúmina alfa bovina, y un sitio de clivaje de enteroquinasa.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0022] La invención se relaciona con un mamífero no humano que es útil para la producción de una proteína de interés que puede ser tóxica para el mamífero. Ese mamífero se caracteriza por el hecho de que es transgénico para la producción de una forma inactiva de la proteína de interés en su leche. El término proteína inactiva se refiere a una forma de la proteína de interés que es no tóxica para el mamífero transgénico no humano que expresa la proteína de interés. En una modalidad adicional de la invención, el término proteína inactiva se refiere a una proteína a la que le falta actividad biológica sin una modificación post-traducciona adicional. Ejemplos de proteínas inactivas incluyen proteínas precursoras (es decir, propéptidos), proteínas que contienen modificaciones (es decir, sustituciones, adiciones o supresiones de aminoácido cuando se comparan con la proteína nativa) que hacen la proteína biológicamente inactiva sin procesamiento adicional, o proteínas precursoras modificadas (es decir,

71

propéptidos que contienen sustituciones, adiciones o supresiones de aminoácido cuando se comparan con el propéptido nativo). En otras palabras, la toxicidad potencial de la proteína de interés se evita al expresar la proteína como una proteína que no mata un mamífero transgénico no humano que exprese la proteína de interés. Esta proteína inactiva, posiblemente una especie no natural de la proteína, puede ser, pero no se limita a, precursores, precursores modificados o formas modificadas de los siguientes: anticuerpos, hormonas, factores del crecimiento, enzimas, factores de coagulación, apolipoproteínas, receptores, fármacos, farmacéuticos, biocéuticos, nutracéuticos, oncogenes, antígenos tumorales, supresores de tumor, citoquinas, antígenos virales, antígenos parasitarios, y antígenos bacterianos. Preferiblemente, la proteína inactiva es un precursor modificado de insulina recombinante que no origine hipoglicemia en un mamífero transgénico no humano que exprese el precursor modificado de insulina. Más preferiblemente, la proteína inactiva es un precursor modificado de insulina mamífera recombinante, y más preferiblemente, un precursor modificado de insulina humana recombinante. La proteína de interés puede ser, pero no se limita a, una insulina recombinante, más preferiblemente, una insulina mamífera recombinante, y, más preferiblemente, insulina humana recombinante. Este mamífero no humano puede ser, pero no se limita a, un mamífero de especies bovinas. Otras especies de mamíferos transgénicos pueden ser, pero no se limitan a, especies de porcinos, especies de ovinos, especies de caprinos, o especies de roedores.

[0023] La insulina es la principal hormona responsable por controlar el transporte, utilización y almacenamiento de la glucosa en el cuerpo. Las células β del páncreas segregan un precursor de insulina de cadena única, conocido como proinsulina. La proinsulina se hace de tres dominios: una cadena B amino

terminal, una cadena A carboxil terminal, y un péptido de conexión en el medio conocido como péptido C. La proteólisis de la proinsulina da como resultado la remoción de ciertos aminoácidos básicos en la cadena de proinsulina a lo largo del péptido de conexión (péptido C) para producir la insulina del polipéptido biológicamente activo.

[0024] En modalidades, una proteína modificada es una forma de la proteína que no es la forma de ocurrencia natural de la proteína. En algunas modalidades, el precursor modificado de insulina contiene una cadena B amino terminal y una cadena A carboxil terminal. Sin embargo, el precursor modificado de insulina contiene un péptido C modificado. En el precursor modificado de insulina, los aminoácidos que codifican el péptido C conectante que se encuentra en la proinsulina de ocurrencia natural se reemplaza por aminoácidos que no se encuentran en la proinsulina de ocurrencia natural. En algunas modalidades, el péptido C modificado contiene los siguientes tres aminoácidos: Ala-Ala-Lys. Adicionalmente, el precursor modificado de insulina puede contener una cadena B modificada. En algunas modalidades, la cadena B modificada contiene todos excepto el aminoácido C Terminal de la cadena B de ocurrencia natural.

[0025] En modalidades adicionales, el precursor modificado de insulina es un precursor modificado de insulina humana que consiste de 53 aminoácidos, con un peso molecular de aproximadamente 6 kD. El precursor modificado de insulina humana contiene una cadena B modificada que tiene 1-29 aminoácidos de la cadena B de ocurrencia natural, y un péptido C modificado con tres aminoácidos, Ala-Ala-Lys. El precursor modificado de insulina humana se puede someter a clivaje enzimático y transpeptidación con el fin de producir insulina humana, la cual

es esencial para el tratamiento de diabetes y sus aplicaciones están bien establecidas.

[0026] La invención también se relaciona con un mamífero no humano que es transgénico para la producción de un precursor modificado de insulina humana recombinate en su leche, caracterizado por el hecho de que el precursor modificado de insulina humana recombinate no hace al mamífero no viable.

[0027] La invención se relaciona además con un mamífero transgénico de las especies bovinas que es útil para la producción de insulina humana recombinate.

La insulina humana se conoce por estar activa en el ganado. El ganado que expresa insulina humana en su forma madura se podría expresar para exhibir síntomas asociados con hipoglicemia en razón a que la proteína transgénica puede escaparse hacia el torrente sanguíneo. Por lo tanto, el ganado transgénico que expresa la insulina humana recombinate puede ser no viable. Sin embargo, la presente invención soluciona esta limitación y permite la expresión en un mamífero transgénico de una proteína que puede ser tóxica a los mamíferos transgénicos. La presente invención expresa una forma inactiva de una proteína de interés. La proteína inactiva se purifica de la leche de mamífero transgénico, y se convierte *in vitro* en la forma madura (es decir, activa) de la proteína. Indudablemente, un mamífero, tal como una vaca, que es útil como un medio para producir una proteína terapéutica (por ejemplo, insulina humana) que cuando se expresa es dañina para el mamífero constituye una contribución inesperada e innovadora.

[0028] La invención además se relaciona con un mamífero transgénico no humano que produce un precursor modificado de insulina recombinate en su

74

leche, cuyo genoma comprende un plásmido integrado, el plásmido comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un precursor modificado de insulina operablemente ligado a un promotor que dirige la expresión de la secuencia en las células mamarias del mamífero. El mamífero no humano puede ser, pero no se

- 5 limita a, un mamífero de la especie bovina. Otras especies de mamíferos transgénicos pueden ser, pero no se limitan a, especies porcinas, especies ovinas, especies caprinas, o especies de roedores. El precursor modificado de insulina puede ser un precursor modificado de insulina mamífera, más preferiblemente, un precursor modificado de insulina humana, un precursor modificado de insulina
- 10 bovina, un precursor modificado de insulina porcina, un precursor modificado de insulina ovina, un precursor modificado de insulina caprina, un precursor modificado de insulina de roedor, y más preferiblemente un precursor modificado de insulina humana. El promotor puede ser un promotor de caseína beta. Los promotores de caseína beta adecuados incluyen, pero no se limitan a, un promotor
- 15 de caseína beta bovina o un promotor de caseína beta caprina. Otros promotores de caseína beta incluyen, pero no se limitan a, un promotor de caseína beta porcina, un promotor de caseína beta ovina, o un promotor de caseína beta de roedor. El plásmido integrado también puede contener un gen de resistencia antibiótico tal como el gen de resistencia a neomicina. Además, el plásmido
- 20 integrado puede ser p β mhulP. El plásmido integrado también puede ser pNJK IP o p β KLE IP.

- [0029] La invención se relaciona además con un mamífero transgénico no humano en el cual el plásmido integrado anteriormente descrito se encuentra tanto
- 25 en células somáticas como en células germinales del mamífero.

[0030] La invención se relaciona además con un mamífero transgénico no humano de las especies bovinas que produce un precursor modificado de insulina humana recombinante en su leche, cuyo genoma comprende un plásmido integrado, el plásmido comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica el precursor modificado de insulina humana y un promotor de caseína beta que dirige la expresión de la secuencia en células mamarias de mamífero. Los promotores de caseína beta adecuados incluyen, pero no se limitan a, un promotor de caseína beta bovina o un promotor de caseína beta caprina. Otros promotores de caseína beta pueden ser, pero no se limitan a, un promotor de caseína beta porcina, un promotor de caseína beta ovina, o un promotor de caseína beta de roedor. El plásmido integrado puede contener un gen de resistencia antibiótico tal como el gen de resistencia a neomicina. Además, el plásmido integrado puede ser p β mhulP. El plásmido integrado también puede ser pNJK IP o p β KLE IP.

[0031] La invención también se relaciona con un plásmido que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un precursor modificado de insulina operablemente ligado a un promotor de caseína beta y un gen de resistencia a antibiótico que permite la selección de las células resistentes a antibiótico. Los promotores de caseína beta adecuados incluyen, pero no se limitan a, un promotor de caseína beta bovina o un promotor de caseína beta caprina. Otros promotores de caseína beta incluyen, pero no se limitan a, un promotor de caseína beta porcina, un promotor de caseína beta ovina, o un promotor de caseína beta de roedor. En algunas modalidades, el gen de resistencia a antibiótico es un gen de resistencia a neomicina que permite la selección de células resistentes a genética. Un ejemplo de tal plásmido es el p β mhulP, como se muestra en la Figura 1. Ejemplos adicionales de tal plásmido son el pNJK IP, como se muestra en la Figura 3, y el p β KLE IP, como se muestra en la Figura 4.

[0032] La invención se relaciona además con un plásmido que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un precursor modificado de insulina en el cual el precursor modificado de insulina es un precursor modificado de insulina de mamífero. El precursor modificado de insulina de mamífero puede ser un precursor modificado de insulina humana, un precursor modificado de insulina bovina, un precursor modificado de insulina porcina, un precursor modificado de insulina ovina, un precursor modificado de insulina caprina, o un precursor modificado de insulina de roedor. En algunas modalidades, el precursor modificado de insulina de mamífero es un precursor modificado de insulina humana.

[0033] La invención se relaciona además con un plásmido que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un precursor modificado de insulina y que no causa hipoglicemia en un mamífero transgénico que expresa el precursor modificado de insulina.

[0034] La invención se relaciona además con un plásmido que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un precursor modificado de insulina humana que contiene un péptido C modificado. En el precursor modificado de insulina humana, los aminoácidos que codifican el péptido C de conexión que se encuentra en la proinsulina humana de ocurrencia natural se reemplaza por aminoácidos que no se encuentran en la proinsulina de ocurrencia natural. En algunas modalidades, el péptido C modificado contiene los siguientes tres aminoácidos: Ala-Ala-Lys. Adicionalmente, el precursor modificado de insulina humana puede contener una cadena B modificada. En algunas modalidades, la

cadena B modificada contiene 1-29 aminoácidos de la cadena B de ocurrencia natural.

[0035] La invención se relaciona además con un plásmido que comprende una
5 secuencia de ácido nucleico que codifica un precursor modificado de insulina, que
además comprende uno o más elementos genéticos adicionales que mejorarán la
estabilidad del plásmido, mejorarán la estabilidad del mRNA transcrito del plásmido,
disminuirán la degradación del precursor modificado de insulina, y/o incrementarán
la expresión del precursor modificado de insulina. Los elementos genéticos
10 adecuados incluyen, pero no se limitan a, un elemento regulatorio (por ejemplo, un
promotor, un mejorador, un aislador, o un sitio de terminación de transcripción), un
fragmento de la secuencia codificante de un gen que no es insulina, o la secuencia
codificante de un gen que no es insulina. En algunas modalidades, el elemento
genético es un fragmento de la secuencia codificante del aislador de globina β de
15 pollo. Un ejemplo de tal plásmido es el pNJK IP, como se muestra en la Figura 3.
En otras modalidades, el elemento genético es un fragmento de la secuencia
codificante del gen de lactoalbúmina alfa bovina. Un ejemplo de tal plásmido es el
p β KLE IP, como se muestra en la Figura 4.

20 [0036] Los plásmidos p β mhulP, pNJK IP y p β KLE IP se depositaron bajo los
términos del Tratado de Budapest. El nombre y la dirección del depósito son
DSMZ – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH,
Inhoffenstr. 7B, d-38124 Braunschweig, Alemania. El p β mhulP se deposita en el
DSMZ en abril 4, 2008 y se le dio el Número de Depósito DSMZ DSM 21359. El
25 pNJK IP se deposita en el DSMZ en abril 4, 2008 y se le dio el Número de
Depósito DSMZ DSM 21360. El p β KLE IP se deposita en el DSMZ en junio 12,
2008.

[0037] La invención se relaciona además con un método para trasfectar las construcciones genéticas anteriormente descritas. En algunas modalidades, las construcciones genéticas anteriormente descritas se trasfectan hacia células de mamífero al insertar las construcciones genéticas en liposomas y poner en contacto los liposomas con las células de mamífero. Los liposomas pueden ser lípidos catiónicos.

[0038] Los métodos de selección de células resistentes a neomicina en el medio apropiado se conocen por aquellos expertos en la técnica. Tales células pueden ser recolectadas cuidadosamente, con el fin de evitar el daño de la célula.

[0039] La invención también se relaciona con un método de transferencia nuclear de células con supresión en G_0 , o en diferentes momentos del ciclo celular, en oocitos de mamífero enucleados, más preferiblemente oocitos de bovino.

[0040] La invención se relaciona con un método de transferencia de embrión transgénico en el útero estimulado con hormona de un mamífero, más preferiblemente el útero de una vaca.

[0041] La invención se relaciona además con un método para elaborar un mamífero transgénico no humano que comprende clonar una secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína inactiva de interés en un plásmido por medio del cual la secuencia se liga operablemente a un promotor que dirigirá la expresión de la secuencia en células mamarias, dando como resultado un plásmido de expresión; transfectar las células somáticas con el plásmido de expresión de tal

manera que el plásmido se incorpora en el genoma de las células, dando como resultado células somáticas transgénicas; enucleando un oocito maduro, dando como resultado un oocito enucleado; fusionar una célula somática transgénica con el oocito enucleado dando como resultado un embrión monocélula; implantar el embrión en el útero de un mamífero receptor; y monitorear el embarazo a través del nacimiento del mamífero transgénico. La proteína inactiva de interés puede ser un precursor modificado de insulina que no causa hipoglicemia en el mamífero. El precursor modificado de insulina es preferiblemente un precursor modificado de insulina de mamífero, más preferiblemente un precursor modificado de insulina humana, un precursor modificado de insulina bovina, un precursor modificado de insulina porcina, un precursor modificado de insulina ovina, un precursor modificado de insulina caprina, o un precursor modificado de insulina de roedor, y, más preferiblemente, un precursor modificado de insulina humana. El mamífero transgénico no humano puede ser, pero no se limita a, un mamífero de las especies bovinas. Otras especies de mamíferos transgénicos pueden ser, pero no se limitan a, especies porcinas, especies ovinas, especies caprinas, especies de roedores. El promotor puede ser un promotor de beta caseína. Los promotores de beta caseína adecuados incluyen, pero no se limitan a, un promotor de beta caseína bovina o un promotor de beta caseína caprina. Otros promotores de beta caseína incluyen, pero no se limitan a, un promotor de beta caseína porcina, un promotor de beta caseína ovina, o un promotor de beta caseína de roedor. El plásmido también puede contener un gen de resistencia a antibiótico tal como el gen de resistencia a neomicina. Además, el plásmido de expresión puede ser p β mhulP. El plásmido de expresión también puede ser pNJK IP o p β KLE IP.

25

[0042] La invención se relaciona además con un método para elaborar un mamífero transgénico no humano que exprese una forma inactiva de la proteína

de interés que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un precursor modificado de insulina que contiene un péptido C modificado. En el precursor modificado de insulina, los aminoácidos que codifican el péptido C conectante que se encuentra en la proinsulina de ocurrencia natural se reemplaza
5 por aminoácidos que no se encuentran en la proinsulina de ocurrencia natural. En algunas modalidades, el péptido C modificado contiene los siguientes tres aminoácidos: Ala-Ala-Lys. Adicionalmente, el precursor modificado de insulina puede contener una cadena B modificada. En algunas modalidades, la cadena B modificada contiene todos menos el aminoácido C terminal de la cadena B de
10 ocurrencia natural.

[0043] La invención se relaciona además con un método para elaborar un mamífero transgénico no humano que expresa una forma inactiva de la proteína de interés en la cual las células somáticas pueden ser fibroblastos.
15 Adicionalmente, las células somáticas transgénicas se pueden aislar de un transgénico hembra que expresa una forma inactiva de la proteína de interés en su leche. Las células somáticas transgénicas pueden ser fibroblastos.

[0044] La invención se relaciona además con un método para elaborar un
20 mamífero transgénico no humano que expresa una forma inactiva de la proteína de interés en la cual la secuencia de ácido nucleico que codifica la forma inactiva de la proteína de interés se encuentra tanto en las células somáticas como en las células germinales del mamífero.

25 [0045] La invención se relaciona además con un método para elaborar un mamífero transgénico no humano de las especies bovinas que produce un precursor modificado recombinante de insulina humana en su leche, cuyo genoma

comprende un plásmido integrado, el plásmido comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica el precursor modificado de insulina humana y un promotor de beta caseína que dirige la expresión de la secuencia en las células mamarias del mamífero. Los promotores de beta caseína adecuados se describieron anteriormente. El plásmido integrado puede contener un gen de resistencia antibiótico tal como el gen de resistencia a neomicina. Además, el plásmido integrado puede ser p β mhulP. El plásmido integrado también puede ser pNJK IP o p β KLE IP.

10 [0046] La invención se relaciona además con un método para producir una forma inactiva de una proteína de interés que comprende elaborar un mamífero transgénico no humano que produce la forma inactiva de la proteína de interés en su leche; obteniendo la leche del mamífero transgénico no humano; purificando la proteína inactiva de la leche; convirtiendo la forma inactiva de la proteína de
15 interés *in vitro*; y purificando la proteína de interés, en donde la proteína de interés puede ser tóxica al mamífero transgénico no humano. La proteína inactiva puede ser, pero no se limita a, precursores, precursores modificados o formas modificadas de los siguientes: anticuerpos, hormonas, factores de crecimiento, enzimas, factores de coagulación, apolipoproteínas, receptores, fármacos,
20 farmacéuticos, biocéuticos, nutracéuticos, oncogenes, antígenos de tumor, supresores de tumor, citoquinas, agentes virales, antígenos parasíticos, y antígenos bacterianos. Preferiblemente, la proteína inactiva puede ser un precursor modificado recombinante de insulina, más preferiblemente, un precursor modificado recombinante de insulina de mamífero, y más preferiblemente, un
25 precursor modificado recombinante de insulina humana. El mamífero transgénico no humano puede ser, pero no se limita a, un mamífero de las especies bovinas.

Otras especies de mamíferos transgénicos pueden ser, pero no se limitan a, especies porcinas, especies ovinas, especies caprinas, o especies de roedores.

[0047] La invención también se relaciona con un método para producir una
5 forma inactiva de una proteína de interés en un mamífero transgénico no humano
que se hace mediante un proceso que comprende clonar una secuencia de ácido
nucleico que codifica la forma inactiva de la proteína de interés en un plásmido por
medio del cual la secuencia se liga operablemente a un promotor que dirigirá la
expresión de la secuencia en células mamarias, dando como resultado un
10 plásmido de expresión; transfectar las células somáticas, opcionalmente los
fibroblastos, con el plásmido de tal manera que el plásmido se incorpora en el
genoma de las células somáticas, dando como resultado células somáticas
transgénicas; enuclear un oocito maduro, dando como resultado un oocito
enucleado; fusionar una célula somática transgénica con el oocito enucleado que
15 resulta en un embrión monocélula; implantar el embrión en el útero de un
mamífero receptor; y monitorear el embarazo a través del nacimiento del mamífero
transgénico. La proteína inactiva de interés puede ser un precursor modificado de
insulina que no origine hipoglicemia en el mamífero. El precursor modificado de
insulina es preferiblemente un precursor modificado de insulina de mamífero, más
20 preferiblemente, un precursor modificado de insulina humana, un precursor
modificado de insulina bovina, un precursor modificado de insulina porcina, un
precursor modificado de insulina ovina, un precursor modificado de insulina
caprina, o un precursor modificado de insulina de roedor, y, más preferiblemente,
un precursor modificado de insulina humana. El mamífero transgénico no humano
25 puede ser, pero no se limita a, un mamífero de las especies bovinas. Otras
especies de mamíferos transgénicos pueden ser, pero no se limitan a, especies
porcinas, especies ovinas, especies caprinas, o especies de roedor. El promotor

puede ser un promotor de beta caseína. Los promotores de beta caseína adecuados se describieron anteriormente. El plásmido también puede contener un gen de resistencia antibiótico tal como el gen de resistencia a neomicina. Además, el plásmido de expresión puede ser p β mhulP. El plásmido también puede 5 contener uno o más elementos genéticos adicionales que mejorarán la estabilidad del plásmido, mejorarán la estabilidad del mRNA transcrito del plásmido, disminuirán la degradación del precursor modificado de insulina, y/o incrementarán la expresión del precursor modificado de insulina. Elementos genéticos adecuados incluyen, pero no se limitan a, un elemento regulatorio (por ejemplo, un promotor, 10 un mejorador, un aislador, o un sitio de terminación de transcripción), un fragmento de la secuencia codificante de un gen que no es la proteína de interés, o la secuencia codificante de un gen que no es la proteína de interés. El plásmido de expresión puede ser pNJK IP o p β KLE IP.

15 [0048] En algunas modalidades, el mamífero transgénico no humano que expresa una forma inactiva de la proteína de interés se clona utilizando una secuencia de ácido nucleico que codifica un precursor modificado de insulina que contiene un péptido C modificado. En el precursor modificado de insulina, los aminoácidos que codifican el péptido C conectante que se encuentra en la 20 proinsulina de ocurrencia natural se reemplaza por los aminoácidos que no se encuentran en la proinsulina de ocurrencia natural. En algunas modalidades, el péptido C modificado contiene los siguientes tres aminoácidos: Ala-Ala-Lys. Adicionalmente, el precursor modificado de insulina puede contener una cadena B modificada. En algunas modalidades, la cadena B modificada contiene todos 25 excepto el aminoácido C terminal de la cadena B de ocurrencia natural.

[0049] En modalidades adicionales, el mamífero transgénico no humano que expresa una forma inactiva de la proteína de interés se hace mediante un proceso en el cual las células somáticas pueden ser fibroblastos. Adicionalmente, las células somáticas transgénicas se pueden aislar de un transgénico hembra que
5 exprese una forma inactiva de la proteína de interés en su leche. Las células somáticas transgénicas pueden ser fibroblastos.

[0050] En modalidades adicionales, la secuencia de ácido nucleico que codifica la forma inactiva de la proteína de interés se encuentra tanto en las células
10 somáticas como en las células germinales del mamífero transgénico no humano que expresa la forma inactiva de la proteína de interés.

[0051] La invención se relaciona además con un método para producir una forma inactiva de la insulina humana en un mamífero transgénico no humano que
15 produce un precursor modificado recombinante de insulina humana en su leche, cuyo genoma comprende un plásmido integrado, el plásmido comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica el precursor modificado de insulina humana y un promotor de beta caseína que dirige la expresión de la secuencia en células mamarias del mamífero. Los promotores de beta caseína adecuados se
20 describieron anteriormente. El plásmido integrado puede contener un gen de resistencia antibiótico tal como el gen de resistencia a neomicina. Además, el plásmido integrado puede ser p β mhulP. El plásmido integrado también puede contener uno o más elementos genéticos adicionales que mejorarán la estabilidad del plásmido, mejorarán la estabilidad del mRNA transcrito del plásmido,
25 disminuirán la degradación del precursor modificado de insulina, y/o incrementarán la expresión del precursor modificado de insulina. Los elementos genéticos adecuados incluyen, pero no se limitan a, un elemento regulatorio (por ejemplo, un

promotor, un mejorador, un aislador, o un sitio de terminación de transcripción), un fragmento que codifica la secuencia de un gen que no es insulina, o la secuencia codificante de un gen que no es insulina. El plásmido integrado puede ser pNJK IP o p β KLE IP.

5

[0052] Adicionalmente, la invención se relaciona con un método para purificar una forma inactiva de la proteína de interés de la leche de un mamífero transgénico que produce la proteína inactiva en su leche. El método de purificación puede incluir las etapas de cromatografía y filtración. Se pueden emplear diferentes tipos de cromatografía, e incluye cromatografía de intercambio de ión o cromatografía de fase inversa. La cromatografía de intercambio de ión puede ser cromatografía de intercambio de catión. Adicionalmente, se pueden efectuar múltiples etapas de cromatografía.

10

15 [0053] La invención se relaciona además con un método para purificar una forma inactiva de una proteína de interés de la leche de un mamífero transgénico no humano que produce la proteína inactiva en su leche, que comprende obtener la leche del mamífero transgénico no humano, clarificar la leche del mamífero transgénico no humano, dando como resultado una leche clarificada, y someter la
20 leche clarificada a cromatografía, dando como resultado una proteína inactiva pura. Las etapas de cromatografía pueden incluir cromatografía de intercambio de ión o cromatografía de fase inversa. La cromatografía de intercambio de ión puede ser cromatografía de intercambio de catión. La cromatografía de fase inversa puede utilizar matriz de fase inversa tal como matrices de fase inversa C4 o C18.
25 Además, se pueden efectuar etapas de cromatografía múltiple.

[0054] La invención se relaciona además con un método para purificar una forma inactiva de una proteína de interés de la leche de un mamífero transgénico no humano que produce la proteína inactiva en su leche, que comprende obtener la leche del mamífero transgénico no humano, clarificar la leche del mamífero transgénico no humano, dando como resultado una leche clarificada, someter la leche clarificada a cromatografía de intercambio de catión, dando como resultado un material cromatografiado por intercambio de catión, someter el material cromatografiado por intercambio de catión a cromatografía de fase inversa, dando como resultado una proteína inactiva pura.

10

[0055] La proteína inactiva de interés puede ser un precursor modificado recombinante de insulina, preferiblemente, un precursor modificado recombinante de insulina de mamífero, más preferiblemente, un precursor modificado recombinante de insulina humana, un precursor modificado recombinante de insulina bovina, un precursor modificado recombinante de insulina porcina, un precursor modificado recombinante de insulina ovina, un precursor modificado recombinante de insulina caprina, o un precursor modificado recombinante de insulina de roedor, y, más preferiblemente, un precursor modificado recombinante de insulina humana. Adicionalmente, el precursor modificado de insulina no causa hipoglicemia en el mamífero transgénico no humano que expresa el precursor modificado de insulina. En el precursor modificado de insulina, los aminoácidos que codifican el péptido C conectante que se encuentra en la proinsulina de ocurrencia natural se reemplaza por aminoácidos que no se encuentran en la proinsulina de ocurrencia natural. En algunas modalidades, el péptido C modificado contiene los siguientes tres aminoácidos: Ala-Ala-Lys. Adicionalmente, el precursor modificado de insulina puede contener una cadena B modificada. En algunas modalidades, la cadena B modificada contiene todos excepto el

15

20

25

aminoácido C terminal de la cadena B de ocurrencia natural. Los mamíferos transgénicos no humanos pueden ser, pero no se limitan a, mamíferos de las especies bovinas. Otras especies de mamíferos transgénicos pueden ser, pero no se limitan a, especies porcinas, especies ovinas, especies caprinas o especies de roedores.

[0056] La invención se relaciona además con un método para convertir una forma inactiva de la proteína de interés en la forma madura (es decir, activa) de la proteína de interés, y luego purificar la proteína de interés. La conversión puede incluir clivaje enzimático del precursor de la proteína de interés. El clivaje enzimático puede involucrar tripsinólisis. La purificación de la proteína de interés puede incluir etapas de cromatografía. Estas etapas de cromatografía pueden incluir cromatografía de fase inversa. La cromatografía de fase inversa puede utilizar matriz de fase inversa tal como matrices de fase inversa C4 o C18. Además, se pueden efectuar etapas de cromatografía múltiple.

[0057] La invención se relaciona además con un método para convertir el precursor modificado recombinante de insulina en insulina recombinante, y luego purificar la insulina recombinante. La conversión puede incluir clivaje enzimático y transpeptidación del precursor modificado recombinante de insulina. El clivaje enzimático puede involucrar tripsinólisis. La purificación de la insulina recombinante puede incluir etapas de cromatografía. Estas etapas de cromatografía pueden incluir cromatografía de fase inversa o cromatografía de intercambio de ión. Además, se pueden efectuar etapas de cromatografía múltiple.

[0058] La invención también se relaciona con un método para convertir un precursor modificado recombinante de insulina en insulina recombinante, y luego

purificar la insulina recombinante. Este método comprende someter el precursor modificado recombinante de insulina a tripsinolisis y transpeptidación, dando como resultado un material tripsinolizado y transpeptidizado, someter el material tripsinolizado y transpeptidizado a una primera cromatografía de fase inversa, dando como resultado un primer material cromatografiado por fase inversa, someter el primer material cromatografiado por fase inversa a una segunda cromatografía de fase inversa, dando como resultado un segundo material cromatografiado por fase inversa, y someter el segundo material cromatografiado por fase inversa a una tercer cromatografía de fase inversa, dando como resultado insulina recombinante pura. Las etapas de la cromatografía de fase inversa incluyen el uso de matrices de fase inversa, preferiblemente matrices de fase inversa C4 o C18.

[0059] La insulina recombinante y el precursor modificado recombinante de insulina pueden ser, respectivamente, una insulina recombinante de mamífero y un precursor modificado recombinante de insulina de mamífero, más preferiblemente, insulina recombinante humana y un precursor modificado recombinante de insulina humana, insulina recombinante bovina y un precursor modificado recombinante de insulina bovina, insulina recombinante porcina y un precursor modificado recombinante de insulina porcina, insulina recombinante ovina y un precursor modificado recombinante de insulina ovina, insulina recombinante caprina y un precursor modificado recombinante de insulina caprina, o insulina recombinante de roedor y un precursor modificado recombinante de insulina de roedor, respectivamente, y, más preferiblemente, insulina recombinante humana y un precursor modificado recombinante de insulina humana. Adicionalmente, el precursor modificado de insulina no origina hipoglicemia en el mamífero transgénico no humano que exprese el precursor

modificado de insulina. En el precursor modificado de insulina, los aminoácidos que codifican el péptido C conectante que se encuentran en la proinsulina de ocurrencia natural se reemplazan por aminoácidos que no se encuentran en la proinsulina de ocurrencia natural. En algunas modalidades, el péptido C modificado contiene los siguientes tres aminoácidos: Ala-Ala-Lys. Adicionalmente, el precursor modificado de insulina puede contener una cadena B modificada. En algunas modalidades, la cadena B modificada contiene todos excepto el aminoácido C terminal de la cadena B de ocurrencia natural.

10 [0060] La invención se relaciona además con un método para producir una proteína de interés que comprende hacer un mamífero transgénico no humano que produce una forma inactiva de la proteína de interés en su leche, obtener la leche del mamífero transgénico no humano, purificar el inactivo de la leche, convertir *in vitro* la proteína inactiva al someter la proteína inactiva purificada a
15 clivaje enzimático, y finalmente purificar la proteína de interés.

[0061] La invención se relaciona además con un método para producir insulina recombinante que comprende hacer un mamífero transgénico no humano que produzca un precursor modificado recombinante de insulina en su leche, obtener
20 la leche del mamífero transgénico no humano, purificar el precursor modificado recombinante de insulina de la leche, convertir *in vitro* el precursor en insulina recombinante al someter el precursor purificado a clivaje enzimático y transpeptidación, y finalmente purificar la insulina recombinante.

25 [0062] Adicionalmente, la invención también se relaciona con un método para producir insulina recombinante, que comprende hacer un mamífero transgénico no humano que produzca un precursor modificado recombinante de insulina en su

leche, obtener la leche del mamífero transgénico no humano, clarificar la leche, dando como resultado leche clarificada, someter la leche clarificada a cromatografía de intercambio de catión, dando como resultado un material cromatografiado por intercambio de catión, someter el material cromatografiado por intercambio de catión a cromatografía de fase inversa, dando como resultado un precursor modificado recombinante de insulina, someter el precursor modificado recombinante de insulina a tripsinólisis y transpeptidación, dando como resultado un material tripsinolizado y transpeptidizado, someter material tripsinolizado y transpeptidizado a una primera cromatografía de fase inversa, dando como resultado un primer material cromatografiado por fase inversa, someter el primer material cromatografiado por fase inversa a una segunda cromatografía de fase inversa, dando como resultado un segundo material cromatografiado por fase inversa, y someter el segundo material cromatografiado por fase inversa a una tercera cromatografía de fase inversa, dando como resultado una insulina recombinante pura.

[0063] La insulina recombinante y el precursor modificado recombinante de insulina pueden ser, respectivamente, una insulina recombinante de mamífero y un precursor modificado recombinante de insulina de mamífero, más preferiblemente, insulina recombinante humana y un precursor modificado recombinante de insulina humana, insulina recombinante bovina y un precursor modificado recombinante de insulina bovina, insulina recombinante porcina y un precursor modificado recombinante de insulina porcina, insulina recombinante ovina y un precursor modificado recombinante de insulina ovina, insulina recombinante caprina y un precursor modificado recombinante de insulina caprina, o insulina recombinante de roedor y un precursor modificado recombinante de insulina de roedor, respectivamente, y, más preferiblemente, insulina

recombinante humana y un precursor modificado recombinante de insulina humana. El mamífero transgénico no humano puede ser, pero no se limita a, un mamífero de las especies bovinas. Otras especies de mamíferos transgénicos pueden ser, pero no se limitan a, especies porcinas, especies ovinas, especies caprinas, o especies de roedores. Las etapas de la cromatografía de fase inversa incluyen el uso de matrices de fase inversa, preferiblemente matrices de fase inversa C4 o C18.

[0064] Los siguientes ejemplos son ilustrativos, pero no limitantes, de varios aspectos y características de la presente invención.

EJEMPLO 1

Construcción del plásmido de expresión

[0065] Se genera una construcción que contenía una gran porción del promotor del gen de beta caseína bovina, incluyendo un fragmento corto de la región del gen de beta caseína no codificante 5', fusionado a la secuencia codificante de un precursor modificado de insulina humana. El fragmento corto no traducido es un fragmento del primer exón del gen de beta caseína. La región de beta caseína empleada fue de aproximadamente 3.8 kb.

[0066] La construcción del plásmido de expresión p β mhulP (ver FIG. 1) se llevo a cabo al insertar la secuencia codificante del precursor modificado de insulina (mhulP) y una gran porción del gen promotor de beta caseína bovina (que corresponde a 3,800 bp desde la región 5' del gen bovino de beta caseína) en un vector adecuado. Este promotor asegura la expresión específica de tejido y

desarrolladoramente regulada de genes bajo su control, en este caso el precursor modificado heterólogo de insulina humana.

[0067] Para una selección adecuada de las células transgénicas, se incluye en el plásmido un gen que codifica la Fosfotransferasa de Neomicina. Este gen permite la selección de células transgénicas con el antibiótico Geneticina, y está bajo control del promotor SV40.

[0068] Otras construcciones se pueden derivar del original para mejorar la selección de célula transfectada o la integración de ADN eficiente en el genoma de la célula bovina.

[0069] Las construcciones se realizaron mediante análisis de enzima de restricción y secuenciación de ADN. La capacidad de las construcciones a expresar mhulP se prueba previamente en una línea celular de glándula mamaria mediante reconocimiento de anticuerpo fluorescente.

[0070] La preparación del plásmido p β mhulP se describe adelante en detalle.

20

Preparación del p β mhulP

[0071] Se genera una construcción inicial, la cual incluye la secuencia que codifica mhulP (proinsulina humana que contiene un péptido C modificado). La mhulP es similar a la proinsulina humana excepto que el péptido C en mhulP es más corto que el péptido C hallado en la proinsulina de ocurrencia natural.

25

[0072] La Figura 2 describe un esquema de la Construcción de Inicio. Al inicio, se puede encontrar una región que codifica un péptido con señal bovina, seguido por la secuencia que codifica la cadena B de insulina (a la que le falta el aminoácido C terminal). Luego, se puede encontrar una región que codifica un espaciador de tres aminoácidos, Ala-Ala-Lys, la cual está seguida por la secuencia que codifica la Cadena de insulina A completa, y finalmente una región que codifica el mRNA poli A. Los tres aminoácidos espaciadores, Ala-Ala-Lys, reemplazan el péptido C encontrado en la proinsulina de ocurrencia natural.

10 [0073] La Construcción de Inicio se genera al reconstruir la secuencia mhulP de 6 oligonucleótidos traslapantes químicamente sintetizados que contienen los sitios de reconocimiento para las enzimas de restricción Bam HI y Not I. Las secuencias iniciadoras se muestran adelante:

15 [0074] **Ins1:**

5'-

ACTGGGATCCATGGCCCTGTGGACACGCCTGCGGCCCTGCTGGCCCTGCT
GGCGC TCTGGCCCCCCCCCCCCGGCCCG-3'

20 [0075] **Ins2:**

5'-CTCCGCACACCAGGTACAGCGCCTCCACCAGGTGGGAGCCACACAG

ATGCTGGTTG ACGAAGGCGCGGGCCGGGGGGGG-3'

[0076] **Ins3:**

25 5'-

ACCTGGTGTGCGGAGAGCGCGGCTTCTTCTACACGCCCAAGGCTGCTAAGG
GCATT G TGGAACAATGCTGTACCAG-3'

AY

[0077] **Ins4:**

5'-GTGTGGGGCTGCCTGCAGGCTGCGTCTAGTTGCAGTAGTTCTCCAGC
TGGTAGAGG GAGCAGATGCTGGTACAGCA-3'

5

[0078] **Ins5:**

5'-CAGGCAGCCCCACACCCGCCGCCTCCTGCACCGAGAGAGATGGAAT
AAAGCCCTTG AACCAGCCCTGCTGTGCCGTCTGT-3'

10 [0079] **Ins6:**

5'-TGACGCGGCCGCAGCGTGGAGAGAGCTGGGAGGGGCTCACAACAG
TGCCGGGAAG
TGGGGCTTGGCCCAGGGCCCCCAAGACACACAGCAGGCACAGCA-3'

15 [0080] El proceso de reconstrucción se efectúa mediante PCR. Los productos PCR se generaron de mezclas de los iniciadores Ins1 e Ins2 (producto f12), Ins3 e Ins4 (producto f34) e Ins5 e Ins6 (producto f56). El mismo proceso se efectúa utilizando los fragmentos traslapantes f12 y f34 en una mezcla única, que produce el producto f14. Finalmente, el producto f14 se utiliza en un PCR en una mezcla
20 que contiene f56 para amplificar un fragmento de aproximadamente 410 bp, que comprende el mhulP de longitud completa (fragmento f16).

[0081] Una vez que se obtiene el fragmento f16, éste se clona en un vector adecuado y se transformo en células bacterianas de *E. coli* competentes para
25 amplificación adicional del vector de clonación con su correspondiente inserto. El vector se deriva de pBKCMV. El pBKCMV es un vector de expresión disponible de Invitrogen Co. (Carlsbad, CA), que codifica un promotor CMV, un gen de

95

resistencia a la neomicina, y un gen de resistencia a la canamicina. El promotor CMV se reemplaza con un promotor de beta caseína bovina de 3.8 kb y se clona el fragmento f16 en el vector resultante utilizando los sitios de restricción Bam HI y Not I.

5

[0082] Después de la amplificación, se efectúan pruebas de restricción con el fin de revisar la identidad del inserto clonado. Se logra la confirmación final mediante secuenciación.

10 [0083] Posteriormente, la Construcción de Inicio se inserta direccionalmente (Bam HI/ Not I) en un vector de plásmido en dirección 3' a un promotor de beta caseína bovina de 4 kB. El vector plásmido también contenía un gen de resistencia a la neomicina. El vector resultante, p β mhulP, que es la construcción final, contenía el promotor de beta caseína, la secuencia que codifica mhulP, y el
15 gen de resistencia a la neomicina.

[0084] La proinsulina humana se hace de tres dominios: una cadena B amino terminal (30 aminoácidos), una cadena A carboxil terminal (21 aminoácidos), y un péptido conectante en el medio conocido como el péptido C (31 aminoácidos). El
20 mhulP difiere de la forma de ocurrencia natural de la proinsulina humana en que el aminoácido C-terminal de la cadena B se ha removido y los aminoácidos que codifican el péptido C se han reemplazado con tres aminoácidos que normalmente no se encuentran en el péptido C, Ala-Ala-Lys. La insulina humana madura, que se hace de solamente de la cadena A y la cadena B, se forma después de clivaje
25 del péptido C. Un mamífero transgénico que expresa la proinsulina humana es no viable en razón a que las peptidasas huéspedes pueden clivar y remover el péptido C formando la insulina madura. Como se describe anteriormente, la

expresión de la insulina humana madura en un mamífero transgénico no humano puede matar el mamífero porque la insulina humana madura puede escaparse al torrente sanguíneo del mamífero. En contraste, el mamífero transgénico no humano hecho utilizando p β mhulP expresa un precursor modificado de insulina humana que no hará que el mamífero transgénico desarrolle ninguna hipoglicemia significativa y no será tóxica para el mamífero transgénico. Sin estar limitado a lo siguiente, en razón a que la región que codifica el espaciador de tres aminoácidos del precursor modificado de insulina humana difiere del péptido C encontrado en la proinsulina humana de ocurrencia natural, las peptidasas huéspedes no reconocen y clivan el espaciador de tres aminoácidos. Por lo tanto, el precursor modificado de insulina humana permanece inactivo y no causa hipoglicemia en el animal transgénico, que es una ventaja importante de la invención reivindicada.

[0085] Se seleccionaron clones que contenían promotor de beta caseína y mhulP propiamente fusionado para expresar mhulP solamente bajo el control de este promotor.

[0086] El tamaño de este plásmido de expresión es aproximadamente 8.4 kbp.

20

Transfección de las células somáticas

[0087] El plásmido p β mhulP se utiliza entonces para transfectar un cultivo primario de células somáticas, utilizando fosfato de calcio o un método de liposoma. Los fibroblastos de becerro fetal se emplearon de manera general para la transfección.

25

[0088] Las células transfectadas se seleccionaron al agregar Geneticina al cultivo. Después de un período de 2 a 8 semanas, las células que eran resistentes a la Geneticina fueron adecuadas por ser utilizadas como células donadoras para obtener clones transgénicos. Las células seleccionadas transfectadas se analizaron mediante PCR para verificar que las células contenían el cassette de expresión.

EJEMPLO 2

10 Enucleación de oocito y transferencia nuclear en metafase en oocitos enucleados

Recolección y Maduración *in vitro* de oocitos bovinos

[0089] Se aspiraron oocitos bovinos de ovarios de matadero y madurados en TCM-199 + 5% FCS + 3 mM de HEPES + antimicóticos. Los oocitos seleccionados se ubicaron entonces en TCM-199 + Roscovitina, bajo atmósfera de 5% de CO₂ a 39°C durante 20 hs. Posteriormente, los oocitos se colocaron en TCM-199 + 5%FCS + FSH (hormona estimulante de folículo) + antibióticos bajo atmósfera de 5% de CO₂ a 39°C durante 24 hs. Los oocitos maduros se desnudaron al someterlos a un vórtice durante 2 minutos en PBS con 1 mg/ml de hialuronidasa de testículo de bovino.

[0090]

EJEMPLO 3

25 Transferencia nuclear con células cumulus

Enucleación

[0091] Los oocitos se enuclearon mecánicamente utilizando micromanipuladores hidráulicos Narishige y microscopia Nikon Diaphot. La enulceación se efectúa con pipetas biseladas y puntudas de 20 μm . Los oocitos se
5 tiñeron previamente con 5 $\mu\text{g/ml}$ de tinte de bisbenzimidina (Hoechst 33342¹) durante 20 minutos. Las metafases se enuclearon mediante visualización de los cromosomas teñidos bajo luz ultravioleta. Los cromosomas de metafase se evaluaron después de aspiración dentro de la pipeta. Se transfiere una célula somática transgénica hacia el espacio de perivitelina y opuestos herméticamente
10 al oocito enucleado.

Fusión, activación y cultivo de embrión

[0092] Se alinearon manualmente una célula somática transgénica y un oocito enucleado en la cámara de fusión de tal manera que las membranas que se iban a fusionar estuvieran paralelas a los electrodos. Esto se realizó utilizando una pipeta de vidrio para manejo de embrión.

[0093] La fusión se efectuó utilizando un pulso eléctrico de 180 voltios/cm durante 15 μs (BTX Electro Cell Manipulator 200)² y monitoreada con un Analizador de Pulso Gráfico BTX Optimizar. La cámara para pulsar embriones consiste de dos electrodos de alambre de acero inoxidable de 0.5 mm montados a una distancia de 0.5 mm sobre una lámina de vidrio de microscopio. Tres horas después de la fusión, se indujo la activación mediante incubación en TL-HEPES
25 con 5 μM de ionomicina durante 4 min y en TCM-199 con 2 mM de 6-DMAP durante 3 horas.

¹ Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA.

² BTX Inc., San Diego, Ca, USA.

[0094] Los oocitos activados se cultivaron entonces en medio SOF bajo atmósfera de 5% de CO₂ + 5% de O₂ + 90% de N₂ durante 6.5 días, hasta el desarrollo de los blastocistos.

5

[0095] Posteriormente, tuvo lugar la transferencia de embrión en vacas transferidas. Generalmente se transfirieron dos blastocistos por vaca receptora no quirúrgicamente, y los embarazos a los 30-35 días se determinaron mediante ultrasonografía.

10

[0096] A las vacas implantadas se les permite normalmente pasar el embarazo hasta un suministro natural. Eventualmente se podría utilizar una aproximación quirúrgica (cesárea) para el suministro. Los recién nacidos se alimentan con calostro rico en Ig durante las primeras 48 horas, y luego se utilizan alimentos sintéticos, y posteriormente naturales (todos los cuales estaban libres de compuestos de origen animal).

15

EJEMPLO 4

20

Prueba efectuada en becerros transgénicos

[0097] En el ejemplo actual, presentamos una descripción completa de las pruebas efectuadas sobre un becerro transgénico particular, que se obtiene como resultado del procedimiento descrito en los Ejemplos 1 a 3. Sin embargo, debe permanecer claro que el mismo conjunto de ensayos se podría efectuar sobre un bovino que es nacido como consecuencia de otros métodos para obtener becerros transgénicos, tal como subclonar las hembras transgénicas, la superovulación de

25



una hembra transgénica seguido por la inseminación artificial, o la inseminación artificial de las hembras transgénicas o no transgénicas con semen proveniente de un toro que sea transgénico para la proteína deseada.

5 [0098] Se prueba por medio de reacciones PCR efectuadas sobre ADN purificado de las células sanguíneas blancas de becerro, utilizando ADN de los becerros jersey no transgénicos como el control negativo, que el promotor de beta caseína bovina y la secuencia que codifica el precursor modificado de insulina humana se incluyen en el genoma de las células de becerro transgénicas. Ellas se
10 pueden encontrar juntas como un fragmento de ADN único que es diferente del gen de beta caseína homólogo del becerro.

[0099] Se corrobora, al utilizar el secuenciador automático de farmacia, que la secuencia insertada corresponde a la secuencia que codifica el precursor
15 modificado de insulina humana contenido en el plásmido de clonación. La secuencia insertada incluye la señal de secreción y el terminador. El promotor de beta caseína bovina que controla la expresión de la secuencia del precursor modificado de insulina humana en nuestro becerro también fue secuenciado. Todos aquellos elementos coinciden exactamente con la secuencia teórica
20 esperada de la construcción genética utilizada para transformar las células fuera de las cuales se generaron los clones.

EJEMPLO 5

25 Purificación de mhulP recombinante de leche, conversión de mhulP en insulina humana y purificación de insulina humana

101

[0100] Una cantidad de proteína mhulP recombinante, necesaria para el desarrollo del procedimiento de purificación del precursor de la leche, se obtiene de fermentación de *Pichia pastoris* transformada. Para este propósito, se subclona la secuencia que codifica mhulP en un vector de expresión en dirección 3' de una
5 secuencia de señal de secreción de levadura, bajo el control de un promotor inducible mediante metanol, y transformado en células de levadura.

[0101] Después de esto, se efectúa la selección de un clon adecuado y se elaboro un cultivo líquido proveniente del clon seleccionado.

10

[0102] La fermentación del clon de levadura transformado se hizo en un medio que contiene glicerol como la fuente de carbono, oligoelementos. Se utilizo metanol para inducción. Esta fermentación produjo 0.5 gramos de mhulP por litro de cultivo.

15

[0103] Una vez que termina la fermentación, se llevaron a cabo las etapas de purificación para lograr un producto puro.

20

[0104] La meta inicial es obtener mhulP recombinante puro del cultivo de levadura. Así, el sobrenadante de un cultivo transformado de *Pichia pastoris* se diluye diez veces con agua purificada y su pH se ajusta a 3.0 utilizando Ácido Acético Glacial. La conductividad de esta solución se verifica de tal manera que ésta no exhibe un valor mayor de 7 mS/cm. Se efectúa un proceso de purificación posteriormente, con el fin de obtener el material de partida para el desarrollo del
25 proceso de purificación del mhulP recombinante de la leche de mamíferos transgénicos, y su ulterior conversión en insulina humana recombinante.

102

[0105] Primero, la solución anteriormente mencionada se somete a la etapa de cromatografía de intercambio catiónico que emplea resina SP Sefarosa FF (Amersham), a una tasa de flujo de 100 cm/h. La carga (10 mL de sobrenadante se carga por mL de resina) y el equilibrio de la columna se efectúan empleando 5% de ácido acético. Para la elución de la proteína se aplica un gradiente de 5% de ácido acético: 1M de NaCl a pH 3, iniciando desde una proporción 100:0 de soluciones hasta que se alcanza una proporción 0:100 de soluciones en un volumen total de 25 volúmenes de la columna.

10 [0106] En una segunda etapa de purificación, el eluado proveniente de la cromatografía de intercambio catiónico se somete a cromatografía de fase inversa. El eluado previo se diluye cinco veces con agua purificada, y el pH se ajusta a 3 con ácido trifluoroacético (TFA).

15 [0107] La solución resultante se carga en una columna que contiene una resina C4 Baker Wide Pore. El flujo se ajusta a una tasa de 100 cm/h. Para la carga y el equilibrio, se utiliza 0.1% de TFA/agua. Para la elución, se aplica un gradiente de 0.1% TFA/agua – Acetonitrilo, iniciando desde una proporción 100:0 de las soluciones hasta que se alcanza una proporción 0:100 en un volumen total de 50 volúmenes de la columna.

[0108] El rendimiento total de las etapas de purificación previas fue de aproximadamente 42 % y se obtiene mhulP con un grado de pureza mayor del 95%.

25

[0109] Un proceso que comprende la purificación del mhulP recombinante de la leche (en razón a que los mamíferos transgénicos secretarán el precursor en su

leche), la conversión del mhulP recombinante en insulina humana recombinante y se desarrollo la purificación final de la insulina humana recombinante. El material de partida para este desarrollo se obtiene al mezclar el mhulP (obtenido de *Pichia pastoris*, como se describe anteriormente) con leche de vaca regular.

5

[0110] Se efectúa un proceso de purificación exhaustivo. Este proceso comprende las etapas de: obtener el descremado de la leche por medio de filtración transgénica y dilución del eluado obtenido para lograr una mejor solubilidad del mhulP recombinante retenido eventualmente en las micelas de caseína (clarificación); y el pasaje de esta solución a través de una columna de cromatografía de intercambio catiónico. La solución resultante se somete a una etapa de cromatografía de fase inversa (C4) y las fracciones ricas en mhulP recombinante se sometieron posteriormente a tripsinólisis y transpeptidación. Finalmente, tuvo lugar la purificación de la insulina humana recombinante, en razón a que es obligatorio, cuando se elabora un producto biofarmacéutico, que la proteína de interés se debe purificar hasta homogeneidad con el fin de evitar la presencia de posibles contaminantes en el producto.

[0111] El procedimiento de la purificación del mhulP recombinante de la leche, la posterior conversión en insulina humana recombinante y la purificación final de la insulina humana recombinante, comprende las siguientes etapas en orden: (a) filtración de flujo tangencial (clarificación), (b) cromatografía de intercambio de catión, (c) cromatografía de fase inversa (C4), (d) tripsinólisis y transpeptidación, (e) cromatografía de fase inversa (C4), (f) cromatografía de fase inversa (C4) y (g) cromatografía de fase inversa (C18).

Clarificación

COY

[0112] Se mezcla leche fresca con una cantidad suficiente de mhulP puro recombinante, producido en *P. pastoris* como se describe previamente. Posteriormente, el producto se somete a una etapa de filtración de flujo tangencial.

5 El tamaño de poro del filtro fue de 0.1 μm y el proceso produjo 80%.

Cromatografía de Intercambio Catiónico

10 [0113] El material resultante de la etapa previa se cromatografía empleando una matriz de intercambio catiónico. El pH de la solución que se iba a cromatografiar se ajusta a 3.0 con Ácido Acético Glacial. La conductividad se revisa de tal manera que no fue mayor de 7 mS/cm.

15 [0114] Esta etapa de cromatografía se efectúa empleando una resina de SP sefarosa FF (Amersham) a una tasa de flujo de 100 cm/h. La carga y el equilibrio de la columna se efectúa empleando 5% de ácido acético. Para la elusión de la proteína se aplica un gradiente de 5% de ácido acético – 1M de NaCl a pH 3, iniciando desde una proporción 100:0 de las soluciones hasta que se alcanza una proporción 0:100 de las soluciones en un volumen total de 25 volúmenes de la
20 columna.

[0115] La etapa de cromatografía tuvo un rendimiento del 90%. El mhulP recombinante seleccionado que contenía fracciones se ensayaron para proteínas totales (mediante el método Bradford) y para la proteína de interés (mediante
25 Western Blot), y se almacena a 2 – 8°C.

Cromatografía de Fase Inversa (I)

[0116] El material resultante de la etapa previa se somete entonces a cromatografía de fase inversa empleando una resina C4 Baker Wide Pore. El flujo se ajusta a una tasa de 100 cm/h. Para carga y equilibrio, se utiliza 0.1% de TFA/agua. Para elusión, se aplica un gradiente de 0.1% TFA/agua – Acetonitrilo, iniciando desde una proporción 100:0 de las soluciones hasta que se alcanza una proporción 0:100 de las soluciones en un volumen total de 50 volúmenes de la columna.

10 [0117] Esta etapa había producido 68%.

Tripsinólisis y Transpeptidación

[0118] El material resultante de la etapa previa se trata con tripsina.

15

[0119] Para la tripsinólisis, se incuba una solución de 10 mM de mhulP con Tripsina (en una concentración de 200 μ M) a 12 °C durante 24 horas.

[0120] Una vez que se termina la incubación, se efectúa la reacción de transpeptidación con el fin de agregar la Treonina en la posición 30 de la Cadena B de la insulina humana. Para este propósito, se prepara la solución que contenía 0.8 M de Thr-Obu, 50% DMF/EtOH (1:1), 26% de H₂O, Ácido acético, 10 mM de mhulP, y 200 μ M de Tripsina, y se permite la reacción de transpeptidación hasta que se completa su progreso.

25

106

[00121] Una vez que había terminado la etapa de transpeptidación, se somete la solución resultante a tres etapas sucesivas de cromatografía de fase inversa con el fin de producir insulina humana pura recombinante.

5

Cromatografía de Fase Inversa (2)

[0122] El material resultante de la etapa previa se somete a cromatografía de fase inversa.

10

[0123] Primero, una dilución del material de la digestión previa fue hasta de 0.125 mg/mL utilizando 50 mM de NaH_2PO_4 , pH 5.0. Posteriormente, se agrega 50 μL de Ácido acético por 100 mL de solución. La muestra se esclara, el pH estuvo alrededor de 4.5, y la muestra se alista para ser cargada.

15

[0124] Las composiciones amortiguadoras se describen adelante:

[0125] Fase Móvil A (MPA): 210 mL de amortiguador de sulfato + 790 mL de agua purificada (conductividad alrededor de 48 mS).

20

[0126] Fase Móvil B (MPB): 105 mL de amortiguador de sulfato + 40 % de Acetonitrilo, agua purificada q.s.p. a 1 L.

[0127] 1 L de amortiguador de sulfato contiene 132.1 gr de NH_4SO_4 , 14 mL de H_2SO_4 y su pH se ajusta a 2.00.

25

[0128] Después de la carga, se efectúa la elusión a una tasa de flujo de 100 cm/h como sigue: primero, se aplica un gradiente MPA-MPB, iniciando desde una

V37

proporción 100:0 de las soluciones hasta que se alcanza una proporción 55:45 de las soluciones en un volumen total de 135 mL; posteriormente, se aplica otro gradiente MPA-MPB, partiendo desde una proporción 55:45 de las soluciones hasta que se alcanza una proporción 25:75 de las soluciones en un volumen total de 360 mL; y, finalmente, se aplica un gradiente final MPA-MPB, iniciando desde una proporción 25:75 de las soluciones hasta que se alcanza una proporción 0:100 de las soluciones en un volumen total de 50 mL.

[0129] La fracción obtenida contiene insulina humana recombinante con pureza de más del 98% y el rendimiento de esta etapa es de alrededor del 85%.

Cromatografía de Fase Inversa (3)

[0130] El material resultante de la etapa previa se acondiciona para esta etapa al ajustar su pH a 7.4.

[0131] La solución resultante se cromatografía entonces empleando una matriz C4 Baker Wide Pore. El flujo se ajusta a una tasa de 100 cm/h. Para carga y equilibrio, se utiliza 0.1% de TFA/agua. Para elusión, se aplica un gradiente de 0.1% de TFA/agua – Acetonitrilo, partiendo desde una proporción de 100:0 de las soluciones hasta que se alcanza una proporción 0:100 de las soluciones en un volumen total de 50 volúmenes de la columna.

[0132] Esta etapa tuvo un rendimiento de aproximadamente 65%.

Cromatografía de Fase Inversa (4)

VOS

[0133] El material obtenido en la etapa previa se acondiciona para una etapa de cromatografía de fase inversa final al ajustar su pH a 3.0.

[0134] El material acondicionado se cromatografía entonces empleando una matriz de fase inversa C18. El flujo se ajusta a una tasa de 100 cm/h. Para carga y equilibrio, se utiliza 0.1% de TFA/agua. Para elusión, se aplica un gradiente de 0.1% de TFA/agua – Acetonitrilo, partiendo desde una proporción 100:0 de las soluciones hasta que se alcanza una proporción 0:100 de las soluciones en un volumen total de 50 volúmenes de la columna.

10

[0135] Esta etapa tuvo un rendimiento de aproximadamente 61%.

EJEMPLO 6

15

Construcción del plásmido de expresión pNJK IP

[0136] Se genera una construcción alternativa para expresar mhulP en glándulas mamarias de bovino transgénico, que contiene una gran proporción del promotor del gen de beta caseína de caprino, fusionado a un fragmento de la secuencia codificante del aislador de β globina de pollo. Los aisladores son elementos de la secuencia de ADN que escuda un promotor de elementos regulatorios circundantes, incluyendo secuencias silenciadoras circundantes que inhiben la expresión del gen. Esta construcción alternativa que contiene el aislador de β globina de pollo se genera con el fin de bloquear la inhibición del promotor de beta caseína mediante cualquier secuencia silenciadora circundante.

25

[0137] La construcción de este plásmido alternativo se lleva a cabo, primero, al escindir de pBC1, el cual es un vector comercial disponible de Invitrogen Co. (Carlsbad, CA), un fragmento de 15 kb que contiene: un fragmento de 2.4 kb del aislador de β globina de pollo, una secuencia promotora de beta caseína de caprino de 3.1 kb, que incluye los intrones y los exones no traducibles del gen de beta caseína de caprino, un sitio de clonación Xho I entre los intrones y los exones no traducibles del gen de beta caseína de caprino, y una señal poli A y las regiones de flanqueo desde la secuencia genómica de beta caseína 3'.

10 [0138] Este fragmento de 15 kb se clona en la estructura del p β mhulP. Primero, el promotor de beta caseína de bovino de 3.8 kb y el fragmento mhulP del p β mhulP se escindieron. El fragmento de 15 kb se inserta en este vector utilizando los sitios de restricción Sal I y Not I. Luego, el fragmento mhulP f16 de 410 bp se clona en el sitio de clonación Xho I localizado en el fragmento de 15 kb
15 (entre los intrones y los exones no traducibles del gen de beta caseína de caprino, como se describe anteriormente).

[0139] El vector resultante (pNJK IP, Figura 3) se transforma en células bacterianas de *E. coli* competentes para amplificación adicional del vector de
20 clonación con su correspondiente inserto.

[0140] Después de la amplificación, se efectúa un análisis del sitio de restricción para revisar la orientación del inserto del fragmento mhulP f16. Se logra la confirmación final mediante secuenciación.

Construcción del plásmido de expresión p β KLE IP

[0141] Se genera una construcción alternativa para expresar mhulP en glándulas mamarias de bovino transgénico, que contiene una gran porción del promotor del gen de beta caseína de bovino, que incluye un fragmento no traducido corto del primer exon del gen de beta caseína, fusionado a la secuencia codificante de una gran porción del gen de alfa lactalbúmina de bovino, seguido por un sitio de clivaje de enteroquinasa, que es seguido por la secuencia codificante el precursor modificado de insulina humana (mhulP). Esta construcción alternativa expresa una proteína de fusión de alfa lactalbúmina – mhulP. En razón de su mayor secuencia, esta construcción alternativa debe producir mRNA con mayor estabilidad. Además, debido a que la alfa lactalbúmina es una proteína naturalmente expresada en la glándula mamaria bovina, esta construcción alternativa debe minimizar la degradación de mhulP e incrementar la expresión de mhulP.

[0142] Con el fin de generar esta construcción, primero, se efectúa una reacción de PCR utilizando ADN de los leucocitos de la sangre periférica de bovino como plantilla, para clonar una gran porción del gen de alfa lactalbúmina. El producto PCR comprende aproximadamente 700 bp de alfa lactalbúmina hasta el final del segundo exón e incluye la secuencia de señal de la alfa lactalbúmina.

[0143] La primera reacción PCR empleada por los siguientes oligonucleótidos:

[0144] NES: GGA GGT GAG CAG TGT GGT GAC

[0145] ALB: GAA GTT ACT CAC TGT CAC AGG AGA

[21]

[0146] Entonces, se efectúa una segunda reacción de PCR, empleando los siguientes oligonucleótidos:

5 [0147] SIG: TCA CCA AAA TGA TGT CCT TTG TC

[0148] LAC: TGT CAC AGG AGA TGT TAC AGA

10 [0149] A través de este procedimiento, se obtiene un fragmento de 620 bp y se clona intp pUC utilizando un sitio de restricción Sma I (pUC alfa lactalbúmina).

[0150] El gen de mhulP que lleva el fragmento se obtiene mediante PCR de un plásmido de clonación IP dentro del sitio, con los siguientes oligonucleótidos:

15 [0151] EKB: tag gct agc gat gat gat gat aaa ttc gtt aac

[0152] cag cac ctg

[0153] CadAr: tca gcg gcc gc tta gtt gca gta gtt

20

[0154] El fragmento de 260 bp resultante incluye una secuencia corta que codifica para el sitio de reconocimiento de enteroquinasa en dirección 5' desde la secuencia codificante de mhulP. El sitio de clivaje de la enteroquinasa permite la separación del IP del resto del péptido. El fragmento de 260 bp se digiere
25 entonces con NheI y se inserta en los sitios de restricción Xba I compatibles en la alfa lactalbúmina de pUC. Se selecciona una construcción resultante en la cual el fragmento de 260 bp se ubica en dirección 3' del gen de alfa lactalbúmina en la

orientación correcta. Esta construcción tiene la secuencia codificante de una gran porción del gen de alfa lactalbúmina de bovino, incluyendo la secuencia de señal de alfa lactalbúmina, seguido por un sitio de reconocimiento de enteroquinasa, que es además seguido por la secuencia codificante del precursor modificado de insulina humana (mhulP).

[0155] El plásmido de alfa lactalbúmina pUC se digiere primero con EcoRI, y el extremo cohesivo resultante se trata con Klenow. Además, se efectúa la digestión NotI y se aísla el fragmento del gen resultante. El plásmido pBK que lleva el promotor de beta caseína se digiere en el sitio único BamHI localizado en el extremo 3' de dicha región promotora, para que sea ligada la fusión del gen de alfa lactalbúmina. Por lo tanto, el sitio BamHI también se recorta para ligar al extremo recortado EcoRI del fragmento, pero se hizo la digestión NotI del plásmido pBK antes de suministrar los extremos homólogos al extremo NotI del inserto.

[0156] El p β KLE IP se transforma entonces en las células bacterianas de *E. coli* competentes para la amplificación adicional del vector de clonación con su correspondiente inserto.

[0157] Después de la amplificación, se logra la confirmación final mediante secuenciación.

[0158] Habiendo ahora descrito completamente la invención, se entenderá por aquellos expertos en la técnica que la misma se puede efectuar dentro de un rango amplio y equivalente de condiciones, formulaciones y otros parámetros sin afectar el alcance de la invención en cualquier modalidad de ésta. Todas las

114

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir insulina que comprende

5 a) hacer un mamífero transgénico no humano que produce un precursor de insulina modificado en su leche;

b) obtener la leche del mamífero transgénico no humano;

10 c) purificar el precursor de insulina modificado de la leche, que resulta en un precursor de insulina modificado puro;

d) convertir el precursor de insulina modificado puro en la insulina; y

15 e) purificar la insulina.

2. El método de la reivindicación 1, en donde el mamífero transgénico no humano se hace por un proceso que comprende:

20 a) clonar una secuencia de ácido nucleico que codifica el precursor de insulina modificado en un plásmido por medio del cual la secuencia se liga operablemente a un promotor que dirigirá la expresión de la secuencia en células mamarias, que resultan en un plásmido de expresión;

25 b) transfectar células somáticas con el plásmido de expresión de tal manera que el plásmido se incorpore en el genoma de las células, dando como resultado células somáticas transgénicas;

c) enuclear el oocito maduro, que resulta en un oocito enucleado;

d) fusionar una de las células somáticas transgénicas con el oocito enucleado que resulta en un embrión monocélula;

e) implantar el embrión en el útero de un mamífero receptor; y

f) monitorear el embarazo a través del nacimiento del mamífero

10

3. El método de la reivindicación 2, en donde el promotor es un promotor beta caseína, y en donde el precursor de insulina modificado es un precursor de insulina de mamífero modificada.

15

4. El método de la reivindicación 3, en donde el precursor de insulina de mamífero modificado es, un precursor de insulina humana modificado, un precursor de insulina de bovino modificado, un precursor de insulina de porcino modificado, un precursor de insulina de ovino modificado, un precursor de insulina de caprino modificado, o un precursor de insulina de roedor modificado.

20

5. El método de la reivindicación 4, en donde el precursor de insulina de mamífero modificado es un precursor de insulina humana modificado.

25

6. El método de la reivindicación 5, en donde el plásmido de expresión comprende adicionalmente un gen resistente a neomicina.

7. El método de la reivindicación 6, en donde el plásmido de expresión es p β mhulP.
8. El método de la reivindicación 6, en donde el plásmido de expresión es pNJK IP.
9. El método de la reivindicación 6, en donde el plásmido de expresión es p β KLE IP.
10. El método de la reivindicación 2, en donde el mamífero es un bovino que produce un precursor de insulina humana modificado en su leche, cuyo genoma comprende un plásmido integrado, en donde el plásmido comprende una secuencia que codifica el precursor de insulina humana modificado y un promotor de beta caseína que dirige la expresión de la secuencia en células mamarias del mamífero.
11. El método de la reivindicación 10, en donde el plásmido comprende adicionalmente un gen resistente a neomicina.
12. El método de la reivindicación 11, en donde el plásmido es p β mhulP.
13. El método de la reivindicación 11, en donde el plásmido es pNJK IP.
14. El método de la reivindicación 2, en donde el mamífero es un bovino que produce una proteína de fusión que comprende un fragmento de alfa lactalbúmina, un sitio de clivage de enteroquinasay un precursor de insulina humana modificado en su leche, cuyo genoma comprende un plásmido

integrado, en donde el plásmido comprende una secuencia que codifica la proteína de fusión y un promotor de beta caseína que dirige la expresión de la secuencia en células mamarias del mamífero.

- 5 15. El método de la reivindicación 14, en donde el plásmido comprende adicionalmente un gen resistente a neomicina.
16. El método de la reivindicación 15, en donde el plásmido es p β KLE IP.
- 10 17. El método de la reivindicación 2, en donde las células somáticas son fibroblastos.
18. El método de la reivindicación 2, en donde las células somáticas transgénicas se obtienen mediante aislamiento de una hembra transgénica para la producción del precursor de insulina modificado en su leche.
- 15 19. El método de la reivindicación 18, en donde las células somáticas transgénicas son fibroblastos.
- 20 20. El método de la reivindicación 1, 2 o 18, en donde el mamífero es de la especie bovina, especie porcina, especie ovina, especie caprina o especie de roedor.
- 25 21. El método de la reivindicación 20, en donde el mamífero es de la especie bovina.

22. El método de la reivindicación 1, 2 o 18, en donde la insulina y el precursor de insulina modificado son, respectivamente, insulina de mamífero y precursor de insulina de mamífero modificado.

23. El método de la reivindicación 22, en donde la insulina de mamífero y el precursor de insulina de mamífero modificado son, respectivamente, insulina humana y precursor de insulina humana modificada, insulina de bovino y precursor de insulina de bovino modificado, insulina de porcino y precursor de insulina de porcino modificado, insulina de ovino y precursor de insulina de ovino modificado, insulina de caprino y precursor de insulina de caprino modificado, o insulina de roedor y precursor de insulina de roedor modificado.

24. El método de la reivindicación 23, en donde la insulina de mamífero y el precursor de insulina de mamífero modificado son, respectivamente, insulina humana y precursor de insulina humana modificada.

25. El método de la reivindicación 1, 2 o 18, en donde el precursor de insulina modificado no origina hipoglicemia en el animal transgénico no humano.

26. El método de la reivindicación 25, en donde el precursor de insulina modificado comprende un péptido de C modificado.

27. El método de la reivindicación 26, en donde el péptido de C modificado comprende aminoácidos que no se encuentran normalmente en la proinsulina de ocurrencia natural.

28. El método de la reivindicación 27, en donde el péptido de C modificado comprende los siguientes tres aminoácidos: Ala-Ala-Lys.

29. El método de la reivindicación 26, en donde el precursor de insulina modificado comprende adicionalmente una cadena B modificada.

30. El método de la reivindicación 29, en donde la cadena B modificada comprende todos menos el aminoácido de terminal C de la cadena B de ocurrencia natural.

31. El método de la reivindicación 1, 2 o 18, en donde la secuencia que codifica el precursor de insulina modificado, ligado operablemente a un promotor que dirige la expresión de la secuencia de ácido nucleico en células mamarias, se encuentra en células somáticas y células germinales del mamífero.

32. Un método para purificar un precursor de insulina modificado de leche de un mamífero transgénico no humano que produce el precursor de insulina modificado en su leche, que comprende:

a) clarificar la leche del mamífero transgénico no humano, que resulta en leche clarificada; y

b) someter la leche clarificada a cromatografía, que resulta en precursor de insulina modificada.

33. El método de la reivindicación 32, en donde la cromatografía es cromatografía de intercambio de ión o cromatografía de fase inversa.
- 5 34. El método de la reivindicación 33, en donde se desarrollan las etapas de cromatografía múltiple.
35. El método de la reivindicación 33, en donde la cromatografía de intercambio de ión es cromatografía de intercambio de catión.
- 10 36. Un método para purificar un precursor de insulina modificado de leche de un mamífero transgénico no humano que produce el precursor de insulina modificado en su leche, que comprende:
- 15 a) clarificar la leche del mamífero transgénico no humano, que resulta en leche clarificada;
- b) someter la leche clarificada a cromatografía de intercambio de catión, que resulta en un material cromatografiado de intercambio de catión; y
- 20 c) someter el material cromatografiado de intercambio de catión a cromatografía de fase inversa, que resulta en precursor de insulina modificada.
- 25 37. El método de la reivindicación 32 o 36, en donde el precursor de insulina modificado es un precursor de insulina de mamífero modificado.

38. El método de la reivindicación 37, en donde el precursor de insulina de mamífero modificado es precursor de insulina humana modificada, precursor de insulina de bovino modificado, precursor de insulina de porcino modificado, precursor de insulina de ovino modificado, precursor de insulina de caprino modificado, o precursor de insulina de roedor modificado.

39. El método de la reivindicación 38, en donde el precursor de insulina de mamífero modificado es precursor de insulina humana modificada.

10 40. El método de la reivindicación 32 o 36, en donde el mamífero transgénico no humano es de la especie bovina.

41. El método de la reivindicación 32 o 36, en donde el mamífero transgénico no humano es un cerdo, oveja, cabra o roedor.

15

42. El método de la reivindicación 32 o 36, en donde el precursor de insulina modificado no origina hipoglicemia en el animal transgénico no humano.

20

43. El método de la reivindicación 42, en donde el precursor de insulina modificado comprende un péptido de C modificado.

44. El método de la reivindicación 43, en donde el péptido de C modificado comprende aminoácidos que no se encuentran normalmente en la proinsulina de ocurrencia natural.

25

45. El método de la reivindicación 44, en donde el péptido de C modificado comprende los siguientes tres aminoácidos: Ala-Ala-Lys.

46. El método de la reivindicación 43, en donde el precursor de insulina modificado comprende adicionalmente una cadena B modificada.

5 47. El método de la reivindicación 46, en donde la cadena B modificada comprende todos menos el aminoácido de terminal C de la cadena B de ocurrencia natural.

10 48. Un método para convertir un precursor de insulina modificado en insulina, y purificar la insulina, que comprende:

a) someter el precursor de insulina modificado a un clivage enzimático y una transpeptidación, que resulta en un material clivado y transpeptidado,

15 b) someter el material clivado y transpeptidado a cromatografía, que resulta en insulina pura.

20 49. El método de la reivindicación 48, en donde el clivage enzimático es tripsinólisis.

50. El método de la reivindicación 48, en donde la cromatografía es cromatografía de fase inversa.

25 51. El método de la reivindicación 50, en donde se desarrollan las etapas de cromatografía múltiple.

023

52. El método de la reivindicación 51, en donde se desarrollan tres etapas de cromatografía.

53. El método de la reivindicación 52, en donde las etapas de cromatografía comprenden el uso de matrices de fase inversa.

54. El método de la reivindicación 53, en donde las matrices de fase inversa son matrices de fase inversa C4 o C18.

55. Un método para convertir un precursor de insulina modificado en insulina, y purificar la insulina, que comprende:

a) someter el precursor de insulina modificado a tripsinólisis y transpeptidación, que resulta en un material tripsinizado y transpeptidado;

b) someter el material tripsinizado y transpeptidado a una primera cromatografía de fase inversa, que resulta en un primer material cromatografiado de fase inversa;

c) someter el primer material cromatografiado de fase inversa a una segunda cromatografía de fase inversa, que resulta en un segundo material cromatografiado de fase inversa; y

d) someter el segundo material cromatografiado de fase inversa a una tercera cromatografía de fase inversa, que resulta en insulina pura.

56. El método de la reivindicación 55, en donde las etapas de cromatografía de fase inversa comprenden el uso de matrices de fase inversa.
57. El método de la reivindicación 56, en donde las matrices de fase inversa son matrices de fase inversa C4 o C18.
58. El método de la reivindicación 48 o 55, en donde la insulina y el precursor de insulina modificado son, respectivamente, insulina de mamífero y precursor de insulina de mamífero modificado.
59. El método de la reivindicación 58, en donde la insulina de mamífero y el precursor de insulina de mamífero modificado son, respectivamente, insulina humana y precursor de insulina humana modificada, insulina de bovino y precursor de insulina de bovino modificado, insulina de porcino y precursor de insulina de porcino modificado, insulina de ovino y precursor de insulina de ovino modificado, insulina de caprino y precursor de insulina de caprino modificado, o insulina de roedor y precursor de insulina de roedor modificado.
60. El método de la reivindicación 59, en donde la insulina de mamífero y el precursor de insulina de mamífero modificado son, respectivamente, insulina humana y un precursor de insulina humana modificado.
61. El método de la reivindicación 48 o 55, en donde el precursor de insulina modificado no origina hipoglicemia en el animal transgénico no humano.

ms

62. El método de la reivindicación 61, en donde el precursor de insulina modificado comprende un péptido de C modificado.

5 63. El método de la reivindicación 62, en donde el péptido de C modificado comprende aminoácidos que no se encuentran normalmente en la proinsulina de ocurrencia natural.

64. El método de la reivindicación 63, en donde el péptido de C modificado comprende los siguientes tres aminoácidos: Ala-Ala-Lys.

10

65. El método de la reivindicación 62, en donde el precursor de insulina modificado comprende adicionalmente una cadena B modificada.

15

66. El método de la reivindicación 65, en donde la cadena B modificada comprende todos menos el aminoácido de terminal C de la cadena B de ocurrencia natural.

20

67. El método de la reivindicación 1, en donde la purificación del precursor de insulina modificado de leche comprende

a) clarificar la leche del mamífero transgénico no humano, que resulta en leche clarificada; y

25

b) someter la leche clarificada a cromatografía, que resulta en precursor de insulina modificada.

68. El método de la reivindicación 67, en donde la cromatografía es cromatografía de intercambio de ión o cromatografía de fase inversa.
- 5 69. El método de la reivindicación 68, en donde se desarrollan las etapas de cromatografía múltiple.
70. El método de la reivindicación 68, en donde la cromatografía de intercambio de ión es cromatografía de intercambio de catión.
- 10 71. El método de la reivindicación 1, en donde la conversión del precursor de insulina modificado en la insulina, comprende
- 15 a) someter el precursor de insulina modificado a un clivaje enzimático y una transpeptidación, que resulta en un material clivado y transpeptidado;
- b) someter el material clivado y transpeptidado a cromatografía, que resulta en insulina pura.
- 20 72. El método de la reivindicación 71, en donde el clivaje enzimático es tripsinólisis.
73. El método de la reivindicación 71, en donde la cromatografía es cromatografía de fase inversa.
- 25 74. El método de la reivindicación 73, en donde se desarrollan las etapas de cromatografía múltiple.

122

75. El método de la reivindicación 74, en donde se desarrollan tres etapas de cromatografía

76. El método de la reivindicación 75, en donde las etapas de cromatografía comprenden el uso de matrices de fase inversa.

77. El método de la reivindicación 76, en donde las matrices de fase inversa son matrices de fase inversa C4 o C18.

78. Un método para producir insulina, que comprende:

a) hacer un mamífero transgénico no humano que produce un precursor de insulina modificado en su leche;

b) obtener la leche del mamífero transgénico no humano;

c) clarificar la leche, que resulta en leche clarificada;

d) someter la leche clarificada a cromatografía de intercambio de catión, que resulta en un material cromatografiado de intercambio de catión;

e) someter el material cromatografiado de intercambio de catión a cromatografía de fase inversa, que resulta en precursor de insulina modificada;

f) someter el precursor de insulina modificado puro a tripsinólisis y transpeptidación, que resulta en un material tripsinizado y transpeptidado;

g) someter el material tripsinizado y transpeptidado a una primera cromatografía de fase inversa, que resulta en un primer material cromatografiado de fase inversa;

5

h) someter el primer material cromatografiado de fase inversa a una segunda cromatografía de fase inversa, que resulta en un segundo material cromatografiado de fase inversa; y

10

i) someter el segundo material cromatografiado de fase inversa a una tercera cromatografía de fase inversa, que resulta en insulina pura.

79. El método de la reivindicación 78, en donde las etapas de cromatografía de fase inversa comprenden el uso de matrices de fase inversa.

15

80. El método de la reivindicación 79, en donde las matrices de fase inversa son matrices de fase inversa C4 o C18.

20

81. El método de la reivindicación 78, en donde la insulina y el precursor de insulina modificado son, respectivamente, insulina de mamífero y precursor de insulina de mamífero modificado.

25

82. El método de la reivindicación 81, en donde la insulina de mamífero y el precursor de insulina de mamífero modificado son, respectivamente, insulina humana y precursor de insulina humana modificada, insulina de bovino y precursor de insulina de bovino modificado, insulina de porcino y precursor de insulina de porcino modificado, insulina de ovino y precursor

de insulina de ovino modificado, insulina de caprino y precursor de insulina de caprino modificado, o insulina de roedor y precursor de insulina de roedor modificado.

- 5 83. El método de la reivindicación 82, en donde la insulina de mamífero y el precursor de insulina de mamífero modificado son, respectivamente, insulina humana y precursor de insulina humana modificada.
- 10 84. El método de la reivindicación 78, en donde el mamífero transgénico no humano es de la especie bovina.
85. El método de la reivindicación 78, en donde el mamífero transgénico no humano es un cerdo, oveja, cabra o roedor.
- 15 86. El método de la reivindicación 78, en donde el precursor de insulina modificado no origina hipoglicemia en el animal transgénico no humano.
- 20 87. El método de la reivindicación 86, en donde el precursor de insulina modificado comprende un péptido de C modificado.
88. El método de la reivindicación 87, en donde el péptido de C modificado comprende aminoácidos que no se encuentran normalmente en la proinsulina de ocurrencia natural.
- 25 89. El método de la reivindicación 88, en donde el péptido de C modificado comprende los siguientes tres aminoácidos: Ala-Ala-Lys.

PROCESO PARA LA PRODUCCIÓN DE PROTEÍNA EXÓGENA EN LA LECHE
DE MAMÍFEROS TRANSGÉNICOS

RESUMEN

5.

La invención se relaciona con mamíferos trasgénicos no humanos que son útiles en la producción de una proteína de interés que puede ser tóxica para los mamíferos. El mamífero se caracteriza por el hecho de que es transgénico para la producción en su leche de una forma inactiva de la proteína de interés, preferiblemente insulina humana recombinante. No es posible producir insulina humana recombinante en mamíferos transgénicos en razón a que esta molécula tiene un cierto grado de actividad biológica en los mamíferos y podría ser tóxica para el mamífero. Así, la invención involucra clonar una construcción genética que comprende una secuencia que codifica un precursor modificado de insulina humana bajo el control de un promotor de caseína beta en un vector de expresión. Esto también involucra transfectar el plásmido de expresión en las células somáticas bovinas fetales, tal como los fibroblastos, y enuclear los oocitos bovinos mediante transferencia nuclear para generar embriones transgénicos. La invención da origen a un bovino transgénico que será capaz de producir un precursor modificado de insulina humana en sus glándulas mamarias. Posteriormente, la leche de estos mamíferos transgénicos se puede recolectar, el precursor modificado de insulina humana se puede convertir in vitro en insulina humana recombinante, y la insulina humana recombinante se puede purificar para homogenizarla como un producto biofarmacéutico puro.

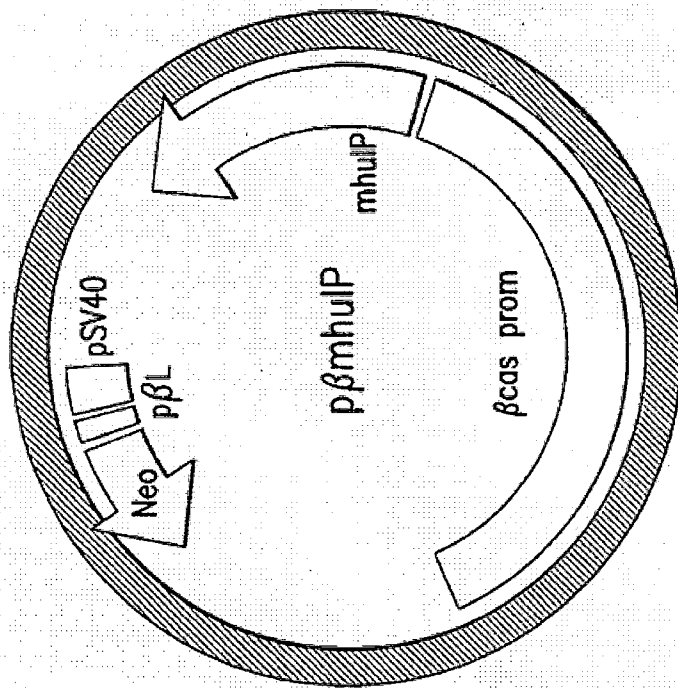
10

15

20

132

1/4



Plásmido pβmhulP

FIG.1

183

2/4

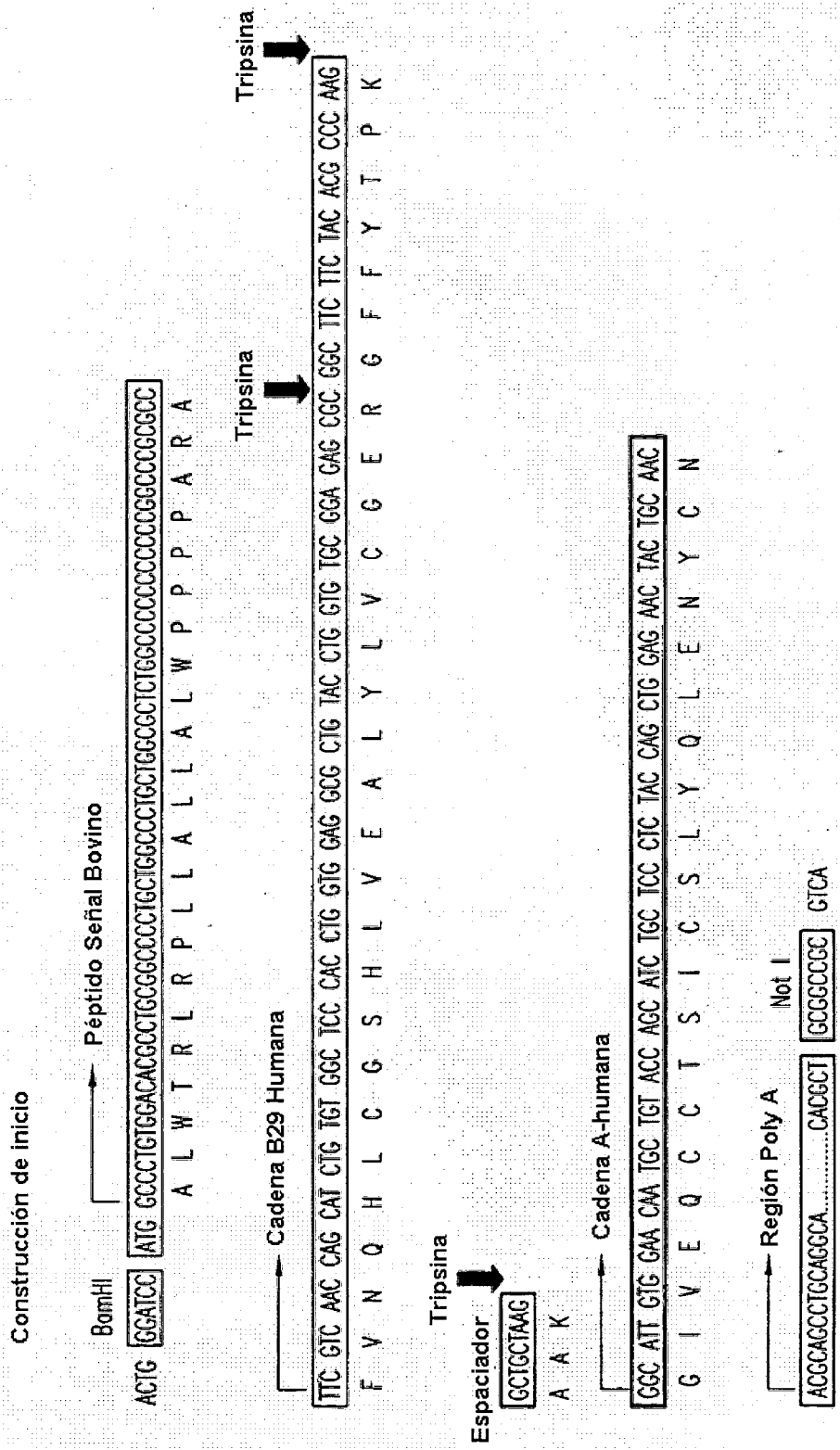


FIG.2

134

3/4

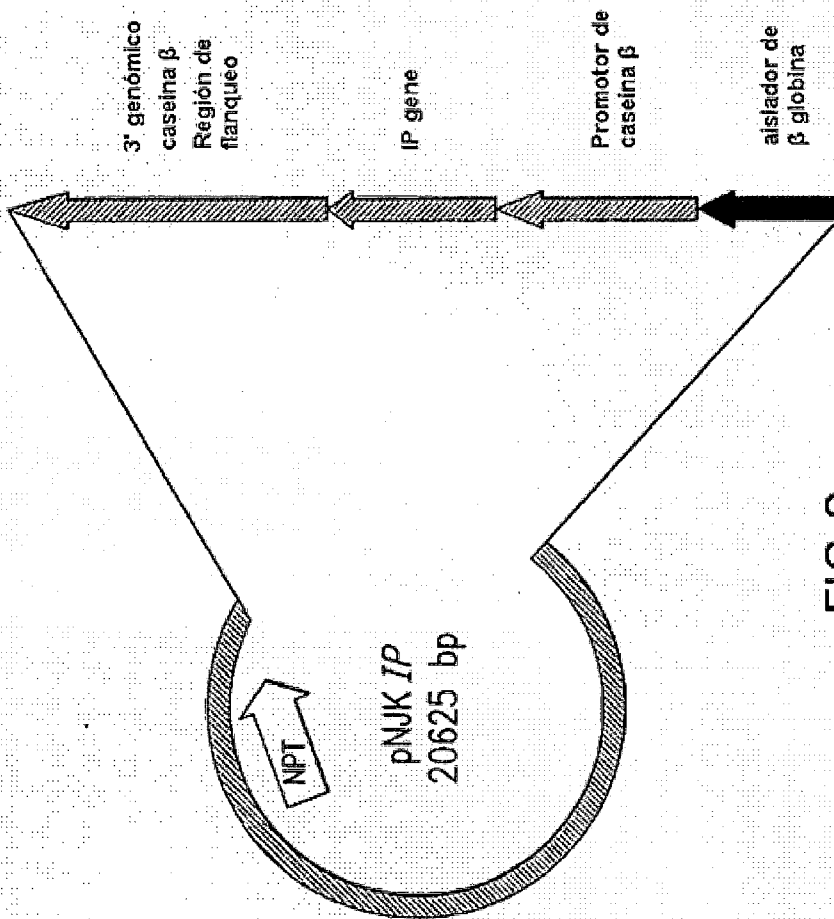


FIG.3

135

4/4

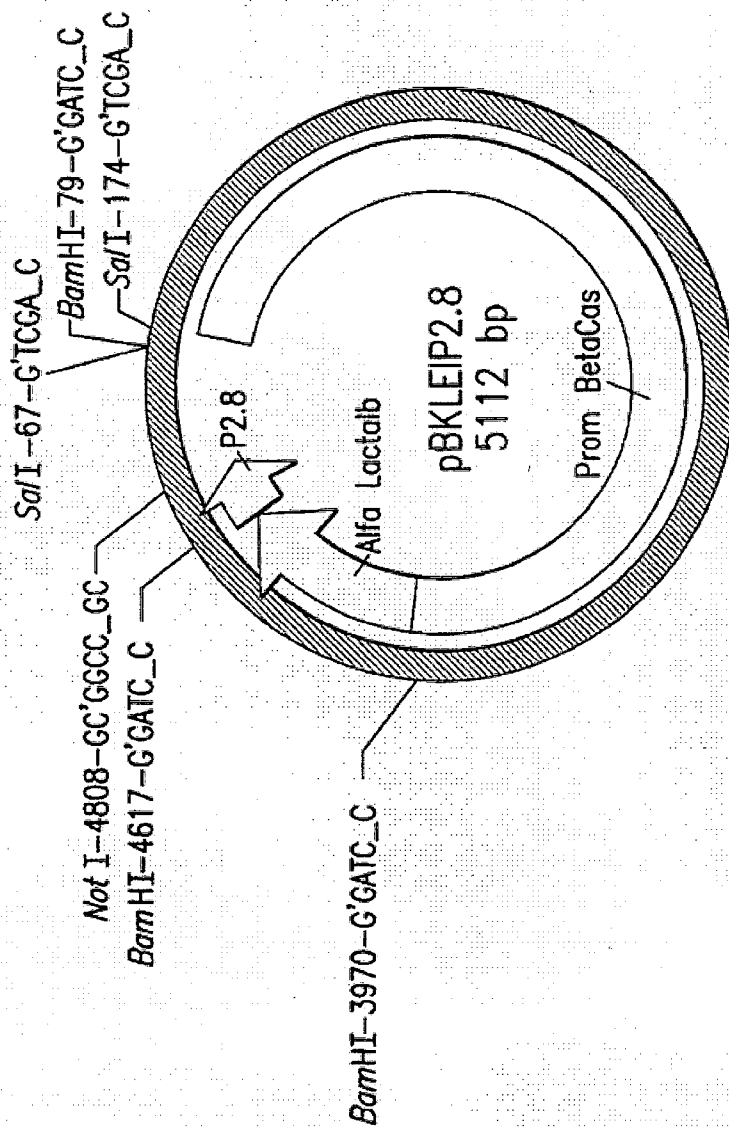
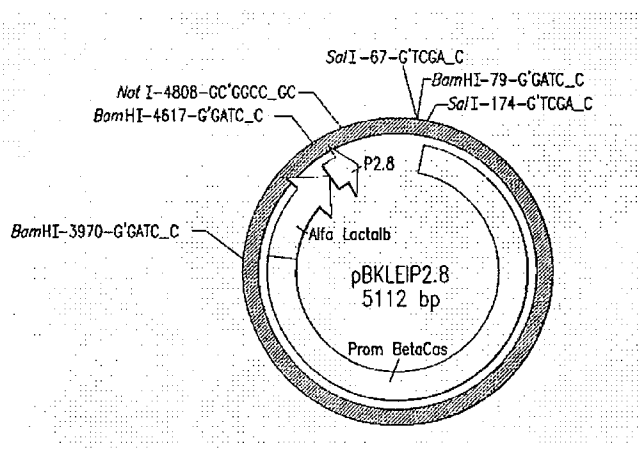


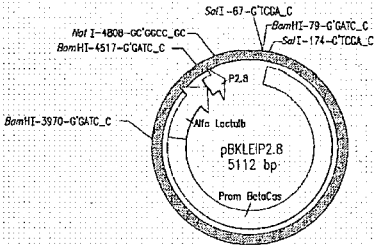
FIG.4

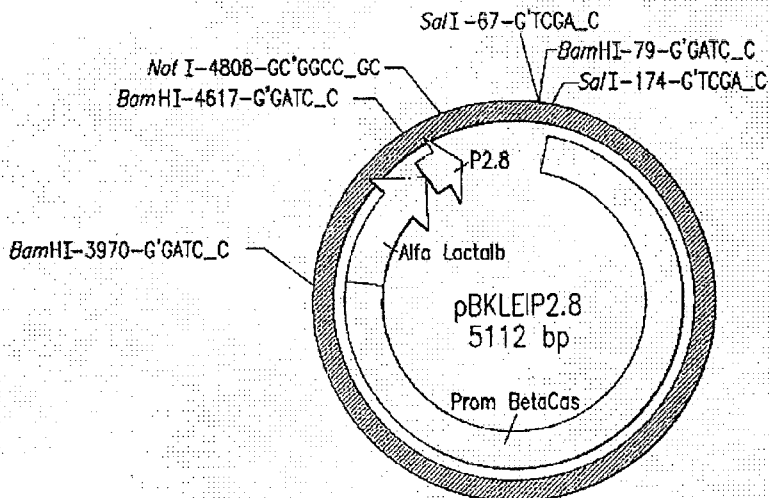
HOJA SUSTITUTA (REGLA 26)

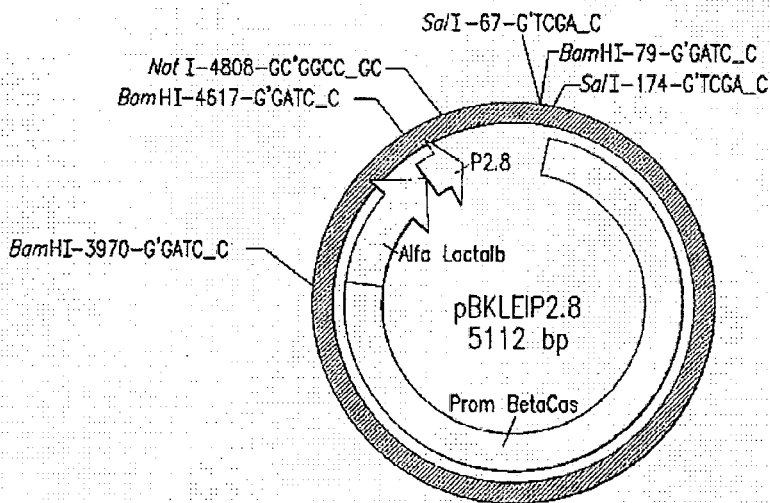
736

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 08/07400										
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - C12P 21/02, B01D 15/04 (2008.04) USPC - 800/7, 210/905, 210/660 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC												
B. FIELDS SEARCHED												
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC(8) - C12P 21/02, B01D 15/04 (2008.04) USPC - 800/7, 210/905, 210/660												
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC - 800/7, 8; 210/905, 660, 600												
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PubWEST(USPT,PGPB,EPAB,JPAB); Google Patents; Google Scholar Search terms: milk, transgenic, mammal, bovine, proinsulin or insulin precursor, hypoglycemia, blood sugar, inactive, B chain, C peptide, Ala-Ala-Lys, lactalbumin, enterokinase, chromatography, ion or anion exchange, reverse phase, neomycin resistance, plasmid												
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT												
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.										
Y	US 2005/0177879 A1 (MELO et al.) 11 August 2005 (11.08.2005) para [0023], [0033], [0035], [0037], [0047]-[0048], [0060], [0063]-[0065], [0166]-[0067]; claims 1 and 29.	1-91										
Y	US 7,105,314 B2 (KJELDSEN) 12 September 2006 (12.09.2006) col 1, ln 65-66; col 2, ln 12; col 5, ln 19-26; col 7, ln 9-11 and 37-38; col 9, ln 59-62; and col 11, ln 13-14.	1-91										
Y	US 2006/0179500 A1 (MEADE et al.) 10 August 2006 (10.08.2006) para [0002] and [0006].	8 and 13										
Y	US 2002/0146779 A1 (COTTINGHAM et al.) 10 October 2002 (10.10.2002) para [0004], [0021] and [0031].	9 and 14-16										
Y	DEREWENDA et al., X-ray analysis of the single chain B29-A1 peptide-linked insulin molecule. A completely inactive analogue, Journal of Molecular Biology, 20 July 1991, Vol 22, No 2, pp 425-33 (p 425, col 2, para 2).	25-30, 42-47, 61-66 and 86-91										
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐												
* Special categories of cited documents: <table border="0"> <tr> <td>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</td> <td>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</td> </tr> <tr> <td>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</td> <td>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</td> </tr> <tr> <td>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</td> <td>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</td> </tr> <tr> <td>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</td> <td>"&" document member of the same patent family</td> </tr> <tr> <td>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</td> <td></td> </tr> </table>			"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention	"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone	"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art	"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family	"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention											
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone											
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art											
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family											
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed												
Date of the actual completion of the international search 21 August 2008 (21.08.2008)		Date of mailing of the international search report 29 AUG 2008										
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201		Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774										









140

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 09 - 96,140
FECHA : DICIEMBRE 21 DE 2009

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-002779- -00000-0000

Fecha: 2010-01-13 15:43:56 Dep: 2020 DIR NUL VASOR
Lib: 11 PATENTLIYII Lve: 378 FASELNACIONALI
Act: 411 PRESENTACION Folios: 142

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	Nº. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754307	173644833	21/12/2009	15,460,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I *** TASA ANUAL C.RECARGO A#OS 17 a 30	1,090,000.00

TOTAL : \$ 1,090,000.00

SON: UN MILLON NOVENTA MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

0020: 15292-841-003-3.

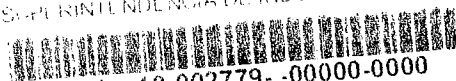
141

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

AIT : 000174069-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 10 - 223
FECHA : ENERO 5 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-002779-00000-0000

Dep. 2010-01-13 15:43:56 Dep. 2020 DIR NEE MASCH
Lvs 11 PATENTE III Lvs 378 FASLNACIONAL
Act 411 PRESENTACION Folios: 142

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	Nº. PAGO	FECHA PGO	VT. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	305003	05/01/2010	57,686,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I *** TASA ANUAL A+00 17 : 20 PARA MANT	907,000.00

TOTAL :			2 907,000.00

SON: NOVECIENTOS SIETE MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

000: 15292-841-003-3.

142

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 000176099-2

CERTIFICACION DE EXCEDENTE : 10 - 310
FECHA : ENERO 5 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-002779- -00000-0000

Fecha: 2010-01-13 15:43:56 Dep: 2020 DIR NULVASOR
Tra: 11 PATENTE/II Lve: 378 FASINACIONAL
Act: 411 PRESENTACION Folios: 142

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	Nº. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CANELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	002754387	305063	05/01/2010	57,686,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I 99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	117.000.00
	TOTAL :	117.000.00

SON: CIENTO DIEZ Y SIETE MIL PESOS

RESPONSABLE: 

RECIBO DE PAGA APLICADO AL EXCEDENTE No. _____

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

0010-15292-841-003-3.



No. 10-002779- -00000-0000

Fecha: 2010-01-13 15:43:56 Dep. 2020 DIR NULVASCR
Fol. 11 PATENTILYII Lve: 378 FASE NACIONAL I
Act. 411 PRESENTACION Folios 142



LISTA DE CHEQUEO
ADMISIÓN A TRÁMITE - NUEVAS CREACIONES

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO DE UTILIDAD ☐

Art 33 Decisión 486/00

☐	Indicación que se solicita una patente.
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Descripción de la invención
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)
Completa ☐ Incompleta ☐	

PATENTE DE INVENCION PCT ☒

MODELO DE UTILIDAD PCT ☐

Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

☒	Indicación que se solicita una PCT
☒	Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
☒	Dibujos de ser estos pertinentes
☒	Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
Completa ☐ Incompleta ☐	

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita Diseño Industrial
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐ Incompleta ☐	

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita un esquema de trazado
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica de un esquema de trazado
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐ Incompleta ☐	



Bogotá,
2020

Doctor(a)
SUAREZ DE PAEZ LUZ CLEMENCIA
Apoderado(a) y/o Representante de
STERRENBELD BIOTECHNOLOGIE NORTH AMERICA, INC

REFERENCIA	Radicación No.	10 2779
	Solicitud internacional	PCT/US2008/007400
	Fecha inicio fase nacional	13/01/2010
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	2165

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

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

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

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

ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Directora de Nuevas Creaciones (c)

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de
fecha 19 FEB. 2010
adpall

Al contestar favor indique el número
de radicación consignado en el rótulo

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