



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

Delegatura de propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

PCT
SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No.

06-39628

54. TÍTULO

UN PROCESO PARA HACER MAMIFEROS TRANSGENICOS QUE PRODUCEN

PROTEINAS EXOGENAS EN LECHE Y MAMIFEROS TRANSGENICOS

PRODUCIDOS DE ESTA MANERA

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL

C12N15/00, A61K 67/27, C12P21/00,
A61P5/06.

71. SOLICITANTE

STERRENELD BIOTECHNOLOGIE NORTH AMERICA, INC.

DOMICILIO

WILMINGTON, ALEMANIA

74. APODERADO

EMILIO FERRERO

C.C. 438,019 de Usaquén

22. BOGOTÁ, D. C.,



PETITORIO

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Tel: 05-039828-00000-0000 Fax: 2005-04-28 18:48:51
Dep. 2020 NUECREACIONES
Ed: 11 PATENTERIA Eje 379 FASENACIONALI
Ed: 411 PRESENTACION Folios: 125

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

30-04-2006

1	☒ Patente de Invención. ☐ Capítulo I.	☐ Patente de Modelo de Utilidad. ☒ 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: EMILIO FERRERO Dirección: Carrera 4ª. No. 72-35 Teléfono: 347 38 11 Fax: 211 86 50 E-mail: <u>clientes@camvp.com.</u> Domicilio: Bogotá, Colombia.	IDENTIFICACIÓN C.C. ☒ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Cual _____ Número <u>438.019</u> T.P <u>31.929</u>															
4 INVENTOR (ES) (72)	1. Carlos Alberto MELO Club de Campo Pueyrredon Ruta Panamericana Km 49 Pilar, Provincia de Buenos Aires, Argentina 3. Cesar CARBONNETO Amenabar 845 Dto. 3ro. 6, Ciudad de Buenos Aires- 1426 Argentina	2. Lino BARANAO, Virrey Loreto 3616 1 A, Ciudad de Buenos Aires -1427 Argentina															
5	PCT (86) Solicitud Internacional No. <u>PCT/US2004/031819</u> Fecha: <u>29 de septiembre de 2004</u> Publicación Internacional No. <u>WO 2005/033274 A3</u> Fecha: <u>14 de abril de 2005</u>																
6	Título (54) UN PROCESO PARA PRODUCIR PROTEINA EXOGENA EN LA LECHE DE MAMIFEROS TRANSGENICOS Y UN PROCESO PARA PURIFICAR PROTEINAS DE ESTA MANERA																
7	Clasificación Internacional (51) <u>C12N 015/000, A61M 67/023, C12P 21/00, A61P 3/06</u>																
8	Prioridad SI ☒ NO ☐	<table><tr><th>(33) País de Origen</th><th>(32) Fecha</th><th>(31) Número de Solicitud</th></tr><tr><td>US</td><td>30 de septiembre 2003</td><td>60/506.735</td></tr><tr><td>US</td><td>30 de septiembre 2003</td><td>60/506.736</td></tr><tr><td>US</td><td>25 de marzo 2004</td><td>60/556.027</td></tr><tr><td>US</td><td>25 de marzo 2004</td><td>60/556.026</td></tr></table>	(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud	US	30 de septiembre 2003	60/506.735	US	30 de septiembre 2003	60/506.736	US	25 de marzo 2004	60/556.027	US	25 de marzo 2004	60/556.026
(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud															
US	30 de septiembre 2003	60/506.735															
US	30 de septiembre 2003	60/506.736															
US	25 de marzo 2004	60/556.027															
US	25 de marzo 2004	60/556.026															

9

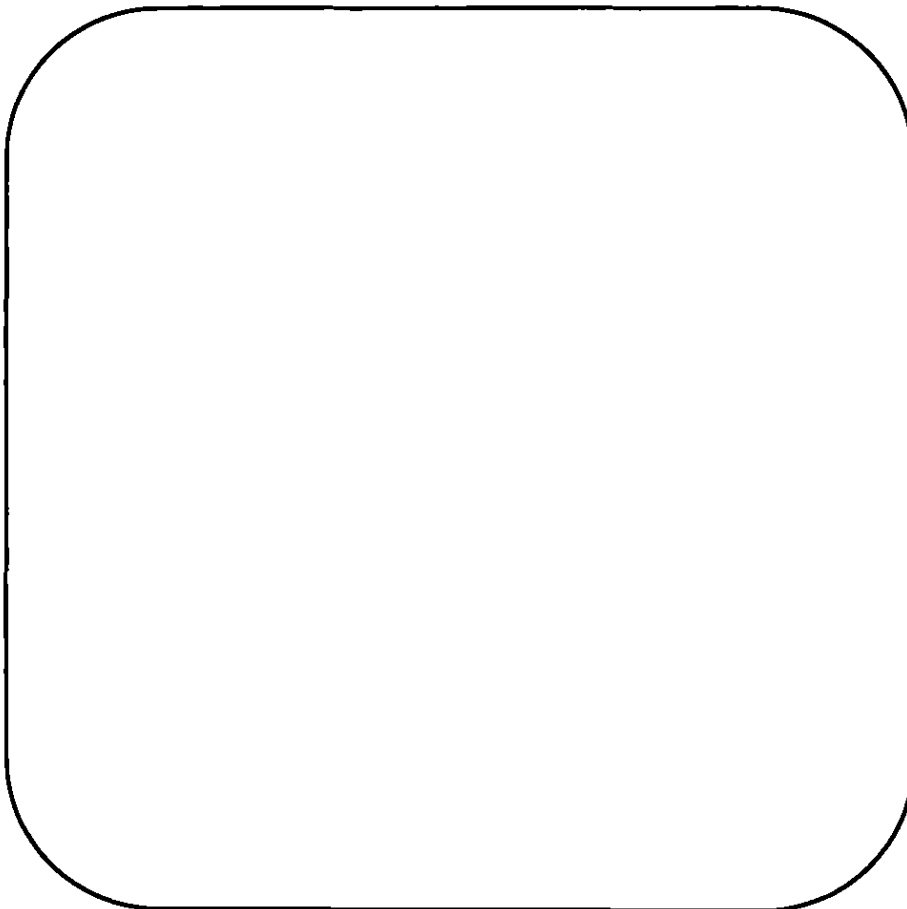
Comprobante de pago No.: 06-28.893Fecha: 17 de abril de 2006

10

Anexos:

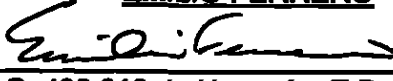
- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por \$ 463.000.00.
- ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad.
- ☐ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☐ Poderes, si fuere el caso.
- ☐ Documento de cesión 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: EMILIO FERREROFIRMA: 

C.C. 438.019 de Usaquén T.P. 31.929

DOCUMENTOS ANEXOS

1. ☒ **Publicación Internacional WO 2005/033274 A2**

Descripción:

Páginas 44 en el idioma original

Páginas 59 en español

Reivindicaciones: Número (s) 48

Figuras: Número (s) 5

2. ☒ **Extracto de publicación.**

NO SE PRESENTARON MODIFICACIONES EN LA FASE INTERNACIONAL

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

(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
14 April 2005 (14.04.2005)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2005/033274 A2

- (51) International Patent Classification⁷: C12N
- (21) International Application Number:
PCT/US2004/031819
- (22) International Filing Date:
29 September 2004 (29.09.2004)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
60/506,735 30 September 2003 (30.09.2003) US
60/506,736 30 September 2003 (30.09.2003) US
60/556,027 25 March 2004 (25.03.2004) US
60/556,026 25 March 2004 (25.03.2004) US

KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, 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, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TO).

Declarations under Rule 4.17:

as to applicant's entitlement to apply for and be granted a patent (Rule 4.17(ii)) for the following designations AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW, ARIPO patents (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI patents (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)

as to the applicant's entitlement to claim the priority of the earlier application (Rule 4.17(iii)) for all designations

Published:

without international search report and to be republished upon receipt of that report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

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

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): MELO, Carlos, Alberto [AR/AR]; Club de Campo Puyrredon Ruta, Panamericana km 49 Pilar, Prov. de Buenos Aires (AR). BARANAO, Lino [AR/AR]; Virrey Loreto 3616 1 A, 1427 Ciudad de Buenos Aires (AR). CARBONNETTO, Cesar [AR/AR]; Amenabar 845 Dto. 3ro.6, 1426 Ciudad de Buenos Aires (AR).

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

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,

(54) Title: A PROCESS FOR PRODUCING EXOGENOUS PROTEIN IN THE MILK OF TRANSGENIC MAMMALS AND A PROCESS FOR PURIFYING PROTEINS THEREFROM

(57) Abstract: The invention relates to a method of producing a protein of interest, comprising making a non-human transgenic mammal that produces said protein in its milk, obtaining said milk from the non-human transgenic mammal and purifying said protein of interest from the milk. Transgenic bovine animals were generated, which are able to produce human growth hormone in mammary glands. The method involves cloning of a genetic construct encoding hGH gene and beta casein promoter conveniently in an expression vector. It also includes transfection procedures into fetal bovine somatic cells, generally fibroblasts, and the nuclear transfer into enucleated bovine oocytes, generating thus transgenic embryos. The method also includes other procedures to generate transgenic embryos for the further expansion of the transgenic herd, such as the subcloning of transgenic female bovines, the superovulation of transgenic cows and their insemination with semen from a non-transgenic or a transgenic male bovine, and the superovulation of non-transgenic cows and their insemination with semen from a transgenic male bovine. Afterwards, transgenic embryos give rise to transgenic cattle that produce human growth hormone in huge amounts in their milk, from which the hormone is completely purified and analysed to fulfill all the requirements for the manufacture of a pure biopharmaceutical product.

WO 2005/033274 A2

**A PROCESS FOR PRODUCING EXOGENOUS PROTEIN IN THE MILK
OF TRANSGENIC MAMMALS AND A PROCESS FOR PURIFYING
PROTEINS THEREFROM**

BACKGROUND OF THE INVENTION

- [0001] Protein factors and hormones involved in human health care have been currently produced by pharmaceutical industry by extraction or by recombinant technology in the last decades. Expression of genetic constructs involving the desired genes were successfully expressed 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 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 animal 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.

- 2 -

- [0006] The possibility of obtaining transgenic animals, 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 host animal health and provide an easy method for purification.
- [0009] People are now devoted to set up several systems to improve the yield of cell transfection or selection, and choose the source of homologous fetal somatic cell to improve survival and immunity conditions of cloned animals.
- [0010] On the other hand, there is enormous interest in somatic cell nuclear transfer, mainly to make possible the propagation of elite domestic animals and engineering of transgenic animals, for agricultural and biomedical purposes. Briefly, nuclear transfer (NT) involves the enucleation of a recipient oocyte, followed by the transfer of donor cell to the perivitelline space in close apposition of the recipient cytoplasm, and their fusion. Development is induced artificially by chemical or physical activation. Production of cloned offspring by somatic cell nuclear transfer has been successfully attained in sheep (Campbell, K. H., *et al.*, *Nature* 380:64-66 (1996), 1996; Wells, D. N., *et al.*, *Biol Reprod* 57:385-393 (1997); Wilmut, I., *et al.*, *Nature* 385:810-813 (1997)); goat (Baguini, A., *et al.*, *Nat Biotechnol* 17:456-461 (1999)) and in cow (Cibelli, J. B., *et al.*, *Science* 280:1256-1258 (1998); Kato, Y., *et al.*, *Science* 282:2095-2098 (1998); Wells, D. N., *et al.*, *Reprod Fertil Dev* 10:369-378 (1998)).
- [0011] There are several factors that influence the results of NT including the methods of enucleation, fusion, activation and donor-recipient cell cycle

synchrony. High efficiencies in enucleation of recipient oocytes have been achieved using DNA specific vital dyes to visualize chromatin (Stice, S. L., and Keefer, C. L., *Biol Reprod* 48:715-719 (1993); Westhusin, M. R., *et al.*, *J Reprod Fertil* 95:475-480 (1992)). Fusion of the donor cell with the recipient oocyte depends on the accuracy of cell alignment in the pulse field, contact of the donor cell with the recipient oocyte and size of the donor cells (Collas, P., *et al.*, *Anal Biochem* 208:1-9 (1993)). Activation of NT reconstructed embryo has been refined and rates of development to blastocysts are equivalent to in vitro fertilized oocytes (Lin, L., *et al.*, *Mol Reprod Dev* 49:298-307 (1998)).

[0012] Successful development of NT embryos has been accomplished using mature oocytes (Willadsen, S. M., *Nature* 320:63-65 (1986)), zygotes (McGrath, J., and Solter, D., *Dev Biol NY* 4:37-55 (1985)), and cleavage-stage embryos (Tsunoda, Y., *et al.*, *J Reprod Fertil* 96:275-281 (1992)) as recipient cytoplasts; however, this is dependent on the source of the donor nucleus. Compatibility of the cell cycle between the recipient cytoplasts and the donor cells is one of the important factors that influence the development of NT embryos. Appropriate synchronization is necessary to preserve the ploidy of the reconstituted embryo.

[0013] The mitotic cell cycle has the following consecutive phases: pre-replication gap (G_1), synthesis of DNA (S), pre-mitotic gap (G_2) and mitosis (M). During a single cell cycle, all genomic DNA replicates once prior to mitosis. An interphase donor nucleus transferred into an enucleate mature oocyte (metaphase II) undergoes several morphological changes. After fusion, but prior to donor nuclear envelope breakdown (NEBD), the chromosome condenses (PCC). These changes are induced by the activity of maturation/mitosis/meiosis-promoting factor (MPF) and mitogen-activated protein kinase (MAPK) (Collas, P., and Robl, J. M., *Biol Reprod* 45:455-465 (1991)). MPF and MAPK activities are found in all meiotic and mitotic cells and are highest at metaphase and in mammalian oocytes these high levels also induce arrest in metaphase II. Reduction of MPF and MAPK by fertilization or activation with calcium ionophore is the signal for completion of meiosis,

- 4 -

second polar body emission, sperm nucleus decondensation and pronuclear formation.

[0014] The direct effect of NEBD and PCC on donor chromatin is dependent on the cell cycle of the donor nucleus at the time of the transfer. Diploid G₀/G₁ nuclei condense to form single chromatids, but tetraploid G₂ nuclei condense to form double chromatids. However, nuclei in S phase at the time of the transfer show a characteristic "pulverized" appearance; PCC produces extensive DNA damage. Therefore, correct ploidy can be produced by transferring a G₁ or G₀ nuclei into metaphase II oocytes at the time of activation or before. A second method is to transfer nuclei in previously activated oocyte; in S phase, in this case is possible to use a donor cell in G₁, G₀ or S-phase. Because MPF and MAPK are low; the chromatin decondenses, and undergoes DNA replication without PCC and NEBD.

[0015] A third synchronization scheme has been reported in mice, where development of a live offspring was produced by embryo reconstruction using a G₂ or metaphase donor cell and an enucleated metaphase 2 oocyte (Cheong, H. T., *et al.*, *Biol Reprod* 48:958-963 (1993); Kwon, O. Y., and Kono, T., *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:13010-13013 (1996)). The extrusion of a polar body from the NT reconstructed embryo was reported, resulting in single diploid embryo and a diploid polar body (Kwon, O. Y., and Kono, T., *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:13010-13013 (1996)). However, there is no report of polar body formation after NT into enucleated MII oocytes in cattle, sheep or pigs, suggesting differences between species in the mechanics controlling formation of intact spindles and extrusion of polar bodies.

[0016] The cell cycle stages of the donor cell and the recipient have been suggested to be also important to reprogram the donor cell nuclei. Increasing the time between donor nuclei transfer and zygotic transcription may improve nucleus reprogramming. For this reason, several authors activated the oocyte several hours after fusion (Cibelli, J. B., *et al.*, *Science* 280:1256-1258 (1998); Wakayama, T., *et al.*, *Nature* 394:369-374 (1998); Wells, D. N., *et al.*, *Biol*

Reprod 60:996-1005 (1999)). Other reports applied sequential nuclear transfer (Stice, S. L., and Keefer, C. L., *Biol Reprod* 48:715-719 (1993)).

[0017] An unexplored procedure to increase the time of donor nucleus reprogramming is by nuclear transfer before metaphase II. After germinal vesicle breakdown (GVBD), all the nuclei events are regulated by a substantial increase in oocyte cytosolic MPF and MAPK, which prevent reconstruction of the nuclear envelope and entrance in the S phase until fertilization or activation. Therefore, a maturing oocyte may be a universal recipient for metaphase or G₂ donor cell. Even G₁ or G₀ can be used as donor cells if activation induces an S phase before cell division.

[0018] When blastomeres in G₂ or M are used as donor cells, nuclear reprogramming is possible (Cheong, H. T., *et al.*, *Biol Reprod* 48:958-963 (1993); Kwon, O. Y., and Kono, T., *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:13010-13013 (1996); Liu, L., *et al.*, *Mol Reprod Dev* 47:255-264 (1997)). One explanation is that some factors are displaced from the chromatin as a result of chromosome condensation. In fact, for nuclear transfer, NEBD and PCC have been considered morphological signs of nucleus reprogramming. Additionally, at the time of fertilization sperm chromatin is extremely condensed, and its volume is considerably smaller than that of nuclei of somatic cells, and oocyte has the ability to remove sperm nuclear protein. Oocyte chromosomes, during sperm-oocyte fusion, are also condensed. It is possible that condensed chromatin conformation may have some biological relevance. Consequently, by mimicking this situation by metaphase nuclear transfer, a metaphase-enucleated recipient could improve NT result. However, few researchers have used this approach in domestic animals and using blastomeres as donor cells (Liu, L., *et al.*, *Mol Reprod Dev* 47:255-264 (1997)).

[0019] One goal of this invention is to characterize and refine existing somatic cell nuclear transfer to a reliable and economical technique to produce genetically identical calves from adult donor cells.

SUMMARY OF THE INVENTION

- 6 -

[0020] The invention relates to a non-human transgenic mammal characterized by the production of unexpectedly high levels of a recombinant growth hormone in its milk. The recombinant growth hormone may be, but is not limited to, human growth hormone. The non-human transgenic mammal may be, but is not limited to, an animal of bovine species.

[0021] The invention further relates to a plasmid that provides the expression of a protein of interest in the mammary cells of mammals in which the expression is regulated by the beta casein promoter. The protein of interest may be, but is not limited to, human growth hormone.

[0022] The invention also relates to different methods of making a non-human transgenic mammal that produce a recombinant growth hormone in its milk. The recombinant growth hormone may be, but is not limited to, human growth hormone. The non-human transgenic mammal may be, but is not limited to, an animal of bovine species.

[0023] The invention also relates to a method of producing a protein of interest, comprising making a non-human transgenic mammal that produces said protein in its milk, obtaining said milk from the non-human transgenic mammal and purifying said protein of interest from the milk. The protein of interest may be, but is not limited to, human growth hormone. The non-human transgenic mammal may be, but is not limited to, an animal of bovine species.

[0024] The invention also relates to a method of producing and purifying a recombinant growth hormone from the milk of a transgenic mammal. The recombinant growth hormone may be, but is not limited to, human growth hormone. The transgenic mammal may be, but is not limited to, an animal of bovine species.

BRIEF DESCRIPTION OF THE FIGURES

[0025] Figures 1A-1B show the daily milk volume collected from a transgenic cow obtained by the fusion of an enucleated oocyte and a fibroblast previously

- 7 -

transfected with a plasmid containing the gene which encodes the human growth hormone (hGH) and a promoter that directs its expression to mammary cells.

[0026] Figures 2A-2C show the bacteria count found in the milk collected from the same transgenic cow.

[0027] Figures 3A-3B show the biological activity of the hGH contained in the milk of the same transgenic cow.

[0028] Figure 4A shows the daily mass of hGH produced in the milk of the same transgenic cow. This magnitude and the daily milk volume collected from the transgenic cow are plotted together in Figure 4B.

[0029] Figure 5A shows the concentration of hGH and insulin-like growth factor-1 (IGF-1) in the serum of the same transgenic cow, and the daily mass of hGH produced in the milk of the same transgenic cow. The concentration of hGH in the transgenic cow's serum and the daily mass of hGH produced in the milk of the transgenic cow are plotted together in Figure 5B. In Figure 5C, the time profiles of the transgenic cow's serum concentrations of hGH and IGF-1 are plotted together.

[0030] Figure 6A and 6B show the serum concentration of hGH and insulin-like growth factor-1 (IGF-1) in two transgenic calves obtained by subcloning of a cow which is transgenic for the production of hGH in its milk. In Figures 6C and 6D, the time profiles of serum concentrations of hGH and IGF-1 are plotted together for each of these transgenic calves.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

[0031] The invention relates to a non-human transgenic mammal characterized by the production of unexpectedly high levels of a recombinant growth hormone in its milk. This mammal may be, but is not limited to, an animal of bovine species. Other species of transgenic mammals may be, but are not limited to, porcine species, ovine species, caprine species, or rodent species.

- 8 -

- [0032] The recombinant growth hormone can be, but is not limited to, human growth hormone. This molecule, also known as somatotropin, is a protein consisting in 191 amino acids, with a molecular weight of about 22 kD. It is essential for linear growth and its applications are well established.
- [0033] The invention also relates to a transgenic mammal, characterized by the fact that the recombinant growth hormones produced in its milk self-stimulates the animal's mammary glands in order to produce more milk containing said hormone.
- [0034] The invention also relates to a plasmid comprising a gene encoding a protein of interest operably linked to a beta casein promoter and a β lactamase gene. This protein of interest can be, but is not limited to, human growth hormone. This plasmid can be pR8hGH.
- [0035] In a further embodiment, the plasmid additionally includes a neomycin resistance gene for selection of geneticin resistant cells. An example of such plasmid is pRNeo.
- [0036] In a further embodiment, the plasmid includes the gene coding for a green fluorescent protein such as GFP, which is under control of the cytomegalovirus (CMV) promoter. An example of such a plasmid is pRNeoGreen.
- [0037] The invention further relates to a plasmid such as those described above, which has been linearized by restriction digestion. In particular, use of restriction enzyme ApaLI is employed and the β lactamase gene is excised.
- [0038] The deposit procedure under the Budapest Treaty of the plasmids mentioned above is under way. The name and address of the depository are DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, 38124 Braunschweig, Germany. The correspondent accession numbers will be provided in due course.
- [0039] The invention further relates to the plasmid constructed on basis of a Neo resistance gene-containing plasmid, into which a modified shorter beta casein promoter region was inserted upstream a hGH coding region, such as

pVE β cashGH. A linear fragment may be obtained from the plasmid pVE β cashGH by excising the beta lactamase gene.

- [0040] The invention further relates to a method for the transfection of genetic constructs using a combination of cationic lipids for liposome utilization.
- [0041] Methods of selection of neomycin resistant cells in appropriate media are also described, as are methods of selecting green fluorescent transgenic cells. These cells are picked carefully, so as to avoid cell damage.
- [0042] 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 bovine oocytes.
- [0043] The invention relates to a method of transgenic embryo transfer into hormone stimulated cow uteri.
- [0044] According to the invention, a method of determining animal health parameters is disclosed. Analyses are performed on both the animal's serum and milk in order to determine such parameters.
- [0045] The invention further relates to a method of making a non-human transgenic mammal comprising obtaining a gene which encodes a growth hormone, cloning the gene into a plasmid whereby the gene is operably linked to a promoter that will direct the expression of the gene 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.
- [0046] The invention further relates to a method of making a non-human transgenic mammal comprising extracting somatic cells from a female mammal which is transgenic for the production of a recombinant growth hormone in its milk, optionally fibroblasts, enucleating a mature oocyte, resulting in an enucleated oocyte, fusing one transgenic somatic cell with the

- 10 -

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.

[0047] The invention further relates to a method of making a non-human transgenic mammal comprising superovulating a female non-human mammal which is transgenic for the production of a recombinant growth hormone in its milk, artificially inseminating the mammal with semen obtained from a male non-human, non-transgenic mammal, to produce embryos, collecting the embryos, implanting the embryos in the uterus of a receptive mammal, and monitoring the pregnancy through the birth of the transgenic mammal.

[0048] The invention further relates to a method of making a non-human transgenic mammal comprising superovulating a female non-human mammal which is transgenic for the production of a recombinant growth hormone in its milk, artificially inseminating the mammal with semen obtained from a male non-human mammal which is transgenic for the production of said recombinant growth hormone, to produce embryos, collecting the embryos, implanting the embryos in the uterus of a receptive mammal, and monitoring the pregnancy through the birth of the transgenic mammal.

[0049] The invention further relates to a method of making a non-human transgenic mammal comprising superovulating a female non-human, non-transgenic mammal, artificially inseminating the mammal with semen obtained from a male non-human mammal which is transgenic for the production of a recombinant growth hormone, to produce embryos, collecting the embryos, implanting the embryos in the uterus of a receptive mammal, and monitoring the pregnancy through the birth of the transgenic mammal.

[0050] The recombinant growth hormone may be, but is not limited to, human growth hormone. The non-human transgenic mammal may be, but is not limited to, an animal of bovine species.

[0051] The invention further relates to a method to produce a protein comprising making a non-human transgenic mammal that produces a protein of interest in unexpectedly high yields in its milk, obtaining the milk from the

non-human transgenic mammal, and purifying the protein of interest from the milk.

[0052] The invention also relates to a method to produce a protein of interest in a non-human transgenic mammal made by a process comprising obtaining a gene which encodes said protein of interest, cloning the gene into a plasmid whereby the gene is operably linked to a promoter that will direct the expression of the gene 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 said 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.

[0053] The invention further also relates to a method to produce a protein of interest in a non-human transgenic mammal made by a process comprising extracting somatic cells from a female mammal which is transgenic for the production of said protein of interest in its milk, optionally fibroblasts, 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.

[0054] The invention also relates to a method to produce a protein of interest in a non-human transgenic mammal made by a process comprising superovulating a female non-human mammal which is transgenic for the production of said protein of interest in its milk, artificially inseminating the mammal with semen obtained from a male non-human, non-transgenic mammal, to produce embryos, collecting the embryos, implanting the embryos in the uterus of a receptive mammal, and monitoring the pregnancy through the birth of the transgenic mammal.

- 12 -

[0055] The invention also relates to a method to produce a protein of interest in a non-human transgenic mammal made by a process comprising superovulating a female non-human mammal which is transgenic for the production of said protein of interest in its milk, artificially inseminating the mammal with semen obtained from a male non-human mammal which is transgenic for the production of said protein of interest, to produce embryos, collecting the embryos, implanting the embryos in the uterus of a receptive mammal, and monitoring the pregnancy through the birth of the transgenic mammal.

[0056] The invention also relates to a method to produce a protein of interest in a non-human transgenic mammal made by a process comprising superovulating a female non-human, non-transgenic mammal, artificially inseminating the mammal with semen obtained from a male non-human mammal which is transgenic for the production of said protein of interest, to produce embryos, collecting the embryos, implanting the embryos in the uterus of a receptive mammal, and monitoring the pregnancy through the birth of the transgenic mammal.

[0057] The transgenic mammals characterized by the production of unexpectedly high levels of a protein of interest in their milk, can be, but are not limited to, animals 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 protein of interest can be, but is not limited to, human growth hormone.

[0058] The invention further relates to a non-human transgenic mammal of bovine species that produces recombinant human growth hormone in its milk, whose genome comprises an integrated plasmid, said plasmid comprising the human growth hormone gene and a beta casein promoter that directs expression of said gene in mammary cells of the mammal.

[0059] The invention further relates to a transgenic mammal that produces hGH in unexpectedly high levels, yet does not show the physical growth expected with such a high level of hGH production. Since transgenic bovines

are affected by the presence of human growth hormones, it would be expected that the animals would grow beyond non-transgenic growth rates, and to suffer from conditions such as diabetes mellitus, hypertension, increased risk of cardiovascular disease and enlargement of body organs, including the liver, spleen, kidneys and heart. Such high levels of hGH should render the animal, theoretically, non-viable. However, this is not the case. A mammal, such as a cow, with alarmingly high levels of a foreign hormone in its blood, but which is perfectly healthy and yields an outstanding productivity of a recombinant protein constitutes an unexpected and innovative contribution.

[0060] The recombinant human growth hormone of the invention is produced at unexpectedly high levels. The level of human growth hormone produced is greater than about 1.0 g/L milk. The level of hGH can be greater than about 2.0 g/L milk. The level of hGH produced can also be greater than about 3.0 g/L milk. In another embodiment, the level of hGH produced can be greater than about 4.0 g/L milk. In yet another embodiment, the level of hGH produced can be greater than about 5.0 g/L milk. In a further embodiment, the level of hGH produced can be greater than about 6.0 g/L milk. In yet a further embodiment, the level of hGH produced is about 1.0 g/L milk to about 7.0 g/L milk. In a further embodiment, the level of hGH produced is about 2.0 g/L milk to about 6.0 g/L milk. In yet another embodiment, the level of hGH produced is about 2.0 to about 5.0 g/L milk.

[0061] Additionally, the invention relates to a method of purifying a recombinant growth hormone from the milk of a transgenic mammal, as well as assays of said hormone. The purification methods can include chromatography and concentration steps. Different types of chromatography can be employed and include ion exchange chromatography, reverse phase chromatography, molecular exclusion chromatography or affinity chromatography. The ion exchange chromatography can be anion exchange chromatography. The affinity chromatography can be immunoaffinity chromatography. Further, multiple chromatography steps may be performed.

- 14 -

[0062] The invention further relates to a method of purifying a recombinant growth hormone from milk of a non-human transgenic mammal that produces a recombinant growth hormone comprising clarifying the milk of a non-human transgenic mammal, resulting in a clarified milk, and subjecting the clarified milk to chromatography, resulting in purified recombinant growth hormone.

[0063] The invention further relates to a method of purifying a recombinant growth hormone from milk of a non-human transgenic mammal that produces a recombinant growth hormone comprising clarifying the milk of a non-human transgenic mammal, resulting in a clarified milk, subjecting the clarified milk to expanded-bed anion exchange chromatography, resulting in an anion exchange chromatographed material, subjecting the anion exchange chromatographed material to reverse phase chromatography, resulting in a reverse phase chromatographed material, subjecting the reverse phase chromatographed material to anion exchange chromatography, resulting in an anion exchange chromatographed material, subjecting the anionic exchange chromatographed material to molecular exclusion chromatography, resulting in a molecular exclusion chromatographed material, concentrating the molecular exclusion chromatographed material, resulting in a concentrated material, and subjecting the concentrated material to molecular exclusion chromatography, resulting in pure recombinant growth hormone.

[0064] The invention also relates to a method of purifying a recombinant growth hormone from milk of a non-human transgenic mammal that produces a recombinant growth hormone comprising clarifying milk obtained from a transgenic mammal, resulting clarified milk, subjecting the clarified milk to immunoaffinity chromatography, resulting in an immunoaffinity chromatographed material, subjecting the immunoaffinity chromatographed material to reverse phase chromatography, resulting in a reverse phase chromatographed material, subjecting the reverse phase chromatographed material to anionic exchange chromatography, resulting in an anionic exchange chromatographed material, subjecting the anionic exchange chromatographed material to molecular exclusion chromatography, resulting

- 15 -

in a molecular exclusion chromatographed material, subjecting the molecular exclusion chromatographed material to concentration, resulting in a concentrated material, and subjecting the concentrated material to molecular exclusion chromatography, resulting in pure recombinant growth hormone.

[0065] The recombinant growth hormone of the purification methods described above may be, but is not limited to, human growth hormone. The transgenic mammal may be, but is not limited to, a mammal of bovine species.

[0066] The following examples are illustrative, but not limiting, of the method and compositions of the present invention. Other suitable modifications and adaptations of the variety of conditions and parameters normally encountered in enzymatic production of chemicals and protein purification procedures which are obvious to those skilled in the art are within the spirit and scope of the invention.

EXAMPLE 1

Construction of expression plasmids

[0067] We generated a construct bearing 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 the human growth hormone gene. The beta casein region employed in different constructs was decreased from 3.8 kbp to about 1.3 kbp. The hGH gene encompasses about 2 to 2.2 kbp depending on whether the intrinsic polyA signal is included.

[0068] The expression cassette was accommodated in the polylinker of a usual cloning vector of the pUC or pBS type.

[0069] This promoter ensures the tissue specific and developmentally regulated expression of genes under its control, like beta casein, and the heterologous hGH in this case.

- 16 -

- [0070] The most representative plasmid is pRShGH, which carries the full-length bovine beta casein promoter, fused to the coding sequence of the human growth hormone gene.
- [0071] Other constructs disclosed are mainly derived from the original one, as depicted, to improve transfected cell selection or DNA integration efficiency into the bovine cell genome.
- [0072] In the first period, co-transfection with a geneticin resistance gene-containing plasmid was performed to help selection, but next, other constructs were used, bearing NPT gene for neomycin resistance in the same vector containing the hGH expression cassette. An example of such plasmid is pRNeo.
- [0073] Another plasmid for constitutive expression of green fluorescent protein was obtained, which includes the CMV promoter, an enhancer of vegetal origin (alfalfa), and the green fluorescent protein gene from the jellyfish *A. victoria*. An example of such plasmid is pRNeoGreen.
- [0074] Besides, another plasmid was generated. This was constructed on basis of a Neo resistance gene-containing plasmid, into which a modified shorter beta casein promoter region was inserted upstream a hGH coding region. This plasmid is pVE β cashGH.
- [0075] Other constructs were generated in which the β lactamase region was excised by ApaLI restriction and the linear fragment containing the entire expression cassette was purified after agarose gel electrophoresis, and gel extraction.
- [0076] Constructs were analyzed by restriction enzymes and DNA sequencing, and their ability to conduct hGH expression was previously tested in a mammary gland cell line by fluorescent antibody recognition.
- [0077] The preparation of the plasmid pVE β cashGH will be described in detail as an example of this part involving genetic constructs.

- 17 -

Preparation of pVE β caseinGH

[0078] The aim of this construct is to provide the minimal extension of beta casein promoter region to direct specific regulated transcription of the hGH gene fused immediately downstream, along with its polyA signal in a host organism.

[0079] The use of pVEX as the original vector permits the use of neomycin resistance gene regulated by a tk promoter already present in this plasmid. The early SV40 promoter comprising 554 bp was eliminated by restriction with *StuI* and *NdeI*, and the last site filled in with Klenow, and self-ligation of the resulting vector.

[0080] Beta casein short promoter was obtained after PCR amplification of a 1.3 kbp fragment from the 3.8 kbp original gene promoter region, by using the following oligos as primers:

PB1 5' TCTACTCGAGGATCATCTATCTGTCCCAAAG (SEQ ID NO: 1)

and

PB2 5' CTAGGATCCAATGATCTGATTTTGTGG (SEQ ID NO: 2)

This fragment encompasses 1230 bp of the canonical promoter plus 49 bp of the first non coding exon of the beta casein gene.

[0081] The hGH gene fragment was obtained by PCR techniques on the original bovine genomic hGH clone using the following oligos as primers:

PB4 5'CTAGGATCCATGGCTACAGGTAAGCGCC (SEQ ID NO: 3)

and

GHTE 5' ATGCTGTGTCTGGACGTCCT (SEQ ID NO: 4)

The beta casein promoter fragment was blunted with Klenow enzyme and inserted into the *Bam*HI filled-in site of pVEX. After selecting recombinant clones, we chose a certain direction appropriate to use the unique *Hind*III site located downstream in pVEX to insert the hGH coding region.

- 18 -

[0082] To this aim, the hGH fragment was also blunted and the plasmid HindIII site was filled in as well. Clones were selected which contain beta casein promoter and hGH properly fused to express hGH only under the control of this promoter.

[0083] The size of this plasmid is about 8.5 kbp.

Transfection of somatic cells

[0084] The plasmids pR8hGH (along with another plasmid with the geneticin resistance gene), pRNeo, pRNeoGreen, or pVE8cashGH were then used for transfecting a primary culture of somatic cells, using calcium phosphate or liposome method. Fetal calf fibroblasts were generally employed to be transfected.

[0085] The transfected cells were selected 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 contain the expression cassette, to ensure the appropriate nuclei transfer to generate transgenic embryos.

EXAMPLE 2

Oocyte enucleation and metaphase nuclear transfer in mature enucleated oocytes

Collection and *In vitro* Maturation of bovine oocytes

[0086] Bovine oocytes were aspirated from slaughterhouse ovaries and matured in TCM-199 + 5% FCS at 39°C for 24 hs. The maturation medium was equilibrated with CO₂ for at least 2 hours prior to use. Mature oocytes were denuded by vortexing for 2 minutes in warm TL-HEPES with 1 mg/ml bovine testis hyaluronidase.

- 19 -

Nuclear transfer with cumulus cells

Enucleation

[0087] 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 $\mu\text{g/ml}$ 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

[0088] 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.

Fusion by Electrical Means

[0089] 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 electrodes mounted 0.5 mm apart on glass microscope slide. Presumptive zygotes were monitored for fusion, lysis, and fragmentation.

Assessment of Developmental Competence

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

² BTX Inc., San Diego, Ca, USA.

- 20 -

[0090] Zygotes were evaluated at 48 hours after fertilization for cleavage and after 7 to 9 days for development to morulae or blastocysts.

EXAMPLE 3

Cell and embryo culture

[0091] Different donor cells, culture systems and oocyte recipient treatments were tested in an experiment aimed at simplifying procedures and increasing embryo survival rate in a bovine cloning program. Three culture systems for reconstructed embryos were used when adult fibroblasts were used as donor cells: TCM-199 + 5% FCS, Menezo + 5% FCS (both with VERO cells as co-culture) and SOF without co-culture but with lower O₂ concentration. SOF medium was also used to culture reconstructed embryos when donor cell were genetically and non-genetically modified fetal fibroblasts. Finally, when genetically modified fetal fibroblasts were used as donor cells, recipient oocytes were previously treated with roscovitine (R), to suspend meiosis and optimize recipient usability. Oocytes were aspirated from slaughterhouse ovaries and matured in TCM-199 + 5% FCS at 39°C for 24 hours. For R treated group, oocytes were incubated with 25 µM R in TCM 199 + 5% FCS for 24 hours at 39°C prior to the maturation. Mature oocytes were denuded by vortexing for 3 minutes in TL HEPES with 1 mg/ml bovine testis hyaluronidase. Metaphases were assessed and oocytes were enucleated by visualization with Hoechst 33342 (5 µg/ml) under UV light (<6 seconds). Adult fibroblasts from an Angus bull and fetal fibroblasts from a 45-day old Jersey female fetus were used as donor cells. Transfection with constructs containing neomycin resistance gene was performed using liposomes. After selection with geneticin for 10-15 days, donor cells at G₀/G₁ stages were fused to enucleated oocytes by an electrical pulse. After 3 hours, activation was induced by incubation in TL-HEPES with 5 µM ionomycin for 4 min and 2 mM 6-DMAP for 3 hours. The oocytes were then washed with TL- HEPES and co-cultured in either TCM-199 + 5% FCS + 10g/l albumin or Menezo +

2% FCS both with VERO cells, or in SOF medium and atmosphere of 5% CO₂ + 5% O₂ + 90% N₂. Generally, two blastocysts were transferred non-surgically per recipient cow, and pregnancies at 30-35 days determined by ultrasonography. Cleavage (48 hours), development to blastocysts (days 7 to 9) were recorded and analyzed by Chi-square. Cleavage rates and development to blastocysts were higher when embryos were cultured in SOF. However, no differences were observed in pregnancy rates due to different culture conditions or source of donor cells. Suspension of meiotic maturation for 24 hours did not compromise the developmental competence of recipient oocytes. Therefore, treatment with roscovitins might be used to increase the availability of oocytes for NT procedures. See Table 1 below.

Table 1

Treatment	n	Cleavage(%)	Blastocyst (%)	implanted recipient	Preg.(%)
Adult fibroblast TC199+VERO	294	156 (53.9) ^a	22(7.5) ^a	13	5(38.4)
Adult fibroblast Menezes+VERO	324	236(72.3) ^{ab}	29(8.9) ^a	17	5(29.4)
Adult fibroblast SOF	108	81(75.0) ^{ab}	24(22.2) ^b	11	5(45.4)
Fetal fibroblast SOF	197	122(61.9) ^{ab}	33(16.7) ^{ab}	16	5(31.6)
Transfected fetal fibroblast SOF	646	476(73.7) ^{ab}	128(19.8) ^b	56	25(44.6)
Transfected fetal fibroblast SOF-R	228	191(83.7) ^a	51(22.3) ^b	30	16(53.3)
Total	1797	1262(70.2)	287(15.9)	143	61(44.5)

Percentages within columns with different superscripts are different (P<0.05)

- 22 -

[0092] The implanted cows are allowed to normally pass the pregnancy up to a natural delivery. Eventually a chirurgic approach (Caesarea) could be used for delivery. The newborns are fed with Ig rich colostrum during the first 48 hours, and then synthetic, later natural (all of them free of animal origin compounds) foods are used.

EXAMPLE 4

Tests performed on transgenic calves and the recombinant protein produced

[0093] 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, and on the recombinant protein produced by it. Nonetheless, it should remain clear that the same set of assays is performed on animals that are born as a consequence of other methods for obtaining transgenic calves, such as those that will be described in Examples 5 and 6 below.

[0094] 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 hGH encoding gene are included in the transgenic calf cells genome. They can be found together as a unique DNA fragment different to the homologue beta casein gene of the animal.

[0095] It was corroborated, by using a Pharmacia automatic sequencer, that the inserted gene sequence corresponds 100 % to the hGH encoding gene. It includes the introns, secretion signal and terminator. The bovine beta casein promoter that controls that same hGH gene expression 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.

- 23 -

- [0096] Once known the exactitude of the genetic phase of the experiment, we passed to prove the recombinant protein produced is the expected one and coincides in every one of its physical and chemical characteristics with the natural hGH.
- [0097] For this purpose, we had to obtain milk from the calf, since the beta casein promoter allows the expression of the recombinant protein only in the mammary glands, when the animal is at its milk producing time.
- [0098] The transgenic calf was then induced by a hormone treatment to produce milk by the time it completed her tenth month. By that time the calf weighed 240 kg (approximately 530 lbs).
- [0100] The first phase of said treatment involved the combined administration, by subcutaneous route, of estrogens (estradiol benzoate, Histeren[®], Instituto Rosenbusch) and progestagens (medroxyprogesterone acetate, Pronal[®], Aton), comprising 5 successive applications of each drug, in a dose of 0.1 mg/kg and 0.25 mg/kg, respectively, every 48 hours (i.e., on days 1, 3, 5, 7 and 9, assuming that the treatment commences on day 1).
- [0101] The second phase comprised the administration, by subcutaneous route, of dexamethasone (Decadron, Sidus) and oxytocin (Orasthin[®], Hoechst Marion Roussel); a total amount of 20 mg of the former being injected over a period comprising days 18 to 20 (a third of said total mass each day), and 3 applications of 50 IU of the latter, on days 21 to 23.
- [0102] The information above is summarized in Table 2:

Table 2

Day	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	(...)	17	18	19	20	21	22	23
Histeren (mg/kg)	0.10		0.10		0.10		0.10		0.10									
Pronal (mg/kg)	0.25		0.25		0.25		0.25		0.25									
Decadron (mg)													6.66*	6.66*	6.66*			
Orasthin (IU)																50	50	50

* Approximately a third of the total mass (20 mg) was administered each day

- [0103] As expected, the cow commenced producing colostrum the day after the treatment had finished, and then, progressively, the quality of the produced

- 24 -

fluid turned to milk. The collected fluid was properly stored and thoroughly analyzed.

[0104] Several tests, whose results are shown in Figures 1-4, were performed on the colostrum and milk (for simplicity, both colostrum and milk will be hereinafter referred to as "milk", except when a distinction should be made). First, the volume of the collected milk was measured. The initial milk productivity (first five lactating days) was approximately 1,650 mL/day. During the first productive month, two manual milkings per day were performed, one in the morning and one in the afternoon (the contribution of each udder to the final volume can be noticed); whereas from the second month forth, as the production of milk started to increase, three milkings per day were performed (in the morning, at noon, and in the afternoon). The daily volumes increased in a more or less continuous way, until reaching close to the 10,000 mL three months after the first milking. Detailed information regarding this topic (Figure 1A) can be visualized in the curve of daily milk volume vs. date (Figure 1B).

[0105] In parallel with the measurements of milk volume, microbiological assays were performed on the milk, whose results (Figure 2A) are shown in the corresponding plots of CFU (Colony-forming units) per ml vs date and (Figures 2B-2C).

[0106] Biological activity (of hGH) was also assessed by a biological activity assay in vitro in NB2 cells culture (Figures 3A-3B). It was proved that the biological activity of the recombinant hGH produced in the heifer's milk is within the method's error rank, at the normal values for human natural hGH. Moreover, the obtained milk was studied by Western blot, in which a main band, corresponding to intact hGH, was detected. Additional minor bands corresponding to cleaved variants and aggregates were also found, as expected in these productive systems.

[0107] With the information regarding the biological activity and the daily volumes, it was possible to calculate the daily production of hGH using Equation 1, where mhGH is the daily produced mass of hGH in milligrams;

BA, the biological activity in International Units; SA, the specific activity of hGH (3 IU/mg); and V, the daily volume of collected milk. The data is shown in Figure 4A. A plot of the daily mass of hGH is shown in Figure 4B. In order to establish a visual correlation between the daily mass of hGH and daily volume of milk, the latter was also plotted in Figure 4B.

$$m_{\text{GH}} = \frac{BA}{SA \times V} \quad (\text{Eq. 1})$$

[0108] As it can be observed from this information, the daily mass of hGH in milk and the daily volume of milk tend to augment as the cow develops (the former in a greater proportion, though), which constitutes an upward trend in the recombinant hormone productivity (grams of hGH per milk liter). It can be noticed that this productivity passed from around 2 g of hGH per liter (first milking), when the product was colostrum, to an average amount of 5 g hGH per milk liter from the second lactating month forth. Thus, an unexpectedly high yield of human growth hormone was obtained as productivity increased, in a way more or less continuous as the fluid quality turned from colostrum to milk.

[0109] Although at present the mass of hGH produced per day is outstanding indeed, it should be noted that, as the cow is not fully grown yet, the upward trend in mass of recombinant protein produced per day should continue in the future, until a maximum is reached.

[0110] In parallel with the tests performed on milk, a different set of assays were carried out on the cow's serum, whose results are shown in Figures 5A-5C. First, measurements of the concentration of hGH in the cow's serum were performed. The results (Figure 5A) are plotted in a graphic together with the daily mass of hGH in milk, to allow a comparison of both magnitudes (Figure 5B).

[0111] The reference range for GH in serum (in humans) is 0.06 – 5 ng/ml. Assuming a hypothetical similar range for bovines, it can be noticed that,

except for the beginning, the whole curve of hGH in the transgenic cow's serum versus date lies well over the upper limit of said range. This fact notwithstanding, it must be taken into account that, although hGH and the corresponding bovine hormone (bGH) are very similar regarding their amino acid sequence and 3D-structure, the former, although fully functional, is not fully active in cattle.

[0112] Therefore, in order to assess the potential risk to the cow's health due to these high levels of hGH in its serum, measurements of serum concentration of IGF-1 (Insulin-like Growth Factor 1, also known as Somatomedin C) were performed in parallel (Figure 5A). Growth hormone performs its functions primarily through IGF-1, which is made in the liver. Because IGF-1 mediates many of the in vivo cell division and metabolic effects of growth hormone, IGF-1 assessment is a valuable diagnostic tool for the indirect evaluation of suspected growth hormone disorders. Thus, IGF-1 represents a dependable indicator of bioavailable growth hormone. The results of these analyses are shown in Figure 5C, together with the ones corresponding to hGH, to permit the simultaneous visualization of both magnitudes.

[0113] Moreover, IGF-1 and hGH were measured in the serum of a group of non-transgenic cows in order to have a control group and thus to establish a comparison with the data corresponding to the transgenic cow. The averages of the measurements of both proteins for the non-transgenic group and the transgenic cow are displayed in Table 3 below.

Table 3

	Averages	
	[IGF-1] in Serum	[hGH] in serum
Non-transgenic	123.40	0.28
Transgenic	484.02	656.98

- 27 -

[0114] It is worth noticing that the average serum concentration of hGH in the non-transgenic group lies within the hypothetical reference range, whereas the average for the transgenic cow is well over the upper limit of said range. Besides, it is undoubted that the average level of IGF-1 in the transgenic animal's serum is categorically higher than the one corresponding to non-transgenic cows, which constitutes a fundamental difference.

[0115] Therefore, although the high concentration of hGH in the transgenic cow's serum (which in humans is known to cause disorders with severe consequences, such as diabetes mellitus, hypertension, increased risk of cardiovascular disease and enlargement of body organs, including the liver, spleen, kidneys and heart) should render the animal, theoretically, non-viable, this would not be representing, apparently, an obstacle to its health and well being. A cow with alarmingly high levels of a foreign hormone in its blood, but which is perfectly healthy and yields an outstanding productivity of a recombinant protein constitutes an unexpected and innovative contribution.

[0116] Another innovative aspect of the present invention is that the recombinant hGH which enters the cow's bloodstream, stimulates the mammary gland to produce more milk. This effect is indirectly achieved, i.e., through the action of IGF-1. This molecule increases the blood flow through the mammary gland, providing critical precursors for the synthesis of milk fat, protein, and lactose. Thus, IGF-1 acts to direct nutrients through the blood to the cells in the udder where they aid in the production of milk. Therefore, a self-stimulating animal is attained, since the recombinant hGH produced in the milk of the transgenic cow is promoting a sustained increase in the volume of milk produced by the animal through the stimulation of its mammary gland, with the corresponding secretion of more hGH in its milk.

- 28 -

EXAMPLE 5**Obtaining transgenic calves by subcloning**

- [0117] Five samples of tissue from the ear of a transgenic calf were taken employing a 1.5-mm-diameter needle, whose end had been previously beveled for this purpose. The samples were shipped under refrigeration to the laboratory in a PBS-based medium containing antibiotics and antimycotics.
- [0118] Afterwards, the tissue samples were incubated for 72 hours in MEM medium with 10 % bovine fetal serum and antibiotics at 39°C and atmosphere of 5 % CO₂. Eventually, the tissue samples were removed, and fibroblasts at the periphery of the plate were allowed to grow until confluence. Once this had been achieved, the fibroblasts were incubated for at least 5 days without changing the culture medium in order to attain their synchronization in G₀ stage, which was assessed by means of visualization with a microscopy.
- [0119] After trypsinization, individual fibroblasts were fused with enucleated bovine oocytes according to Example 2, and embryos thus obtained were cultured in SOF medium and atmosphere of 5 % CO₂ + 5 % O₂ + 90 % N₂ up to the stage of blastocyst. Afterwards, generally two blastocysts were transferred non-surgically per recipient cow, and pregnancies were determined at 30-35 days by ultrasonography.
- [0120] The implanted cows are allowed to normally pass the pregnancy up to a natural delivery. Eventually a chirurgic approach (Caesarea) could be used for delivery. The newborns are fed with Ig rich colostrum during the first 48 hours, and then synthetic, later natural (all of them free of animal origin compounds) foods are used.
- [0121] Figures 6A and 6B show measurements of serum concentration of hGH and IGF-1 performed in parallel for two of the transgenic animals obtained by subcloning of a transgenic cow, and the results of these analyses are depicted in Figures 6C and 6D, respectively, to permit the simultaneous visualization of both magnitudes for each animal. Since at present the calves are young, the values for both hGH and IGF-1 still lie within the respective

- 29 -

range of reference, but it is expected that they will rise the same way they did in the transgenic cow out of which these two clones were obtained.

EXAMPLE 6

Obtaining transgenic calves by artificial insemination of a superovulated transgenic cow

[0122] An alternative approach for obtaining transgenic bovines will be disclosed in this example. This method comprises superovulating a transgenic cow by means of a hormonal treatment; artificially inseminating said cow; recollecting the embryos thus generated; the implantation of said embryos in surrogate cows; and the development of the pregnancy up to the birth of the animals. A description of this procedure is presented below.

Superovulation

[0123] In the morning of day 1 (i.e., the day the procedure started), 150 µg of prostaglandins (D(+)-cloprostenol, Arnaprost®, Arna) were administered to the transgenic cow by intramuscular route. The animal was subjected to a 4-kg daily diet containing approximately 15 % of proteins (before day 1, the animal had been given 2 kg of food, with the same content of proteins). In the morning of day 8, a CIDR (controlled internal drug release) device of progesterone was placed intravaginally. Besides, 50 mg of progesterone and estradiol were administered by intramuscular route. The amount of food the animal was fed rose to 6 kg/day, with the same content of proteins. Then, two intramuscular injections of FSH and LH (PLUSET®, Calier) were administered on days 12, 13 and 14 (one in the morning and the other in the afternoon). The following day (day 15), the treatment went on with the administration, by intramuscular route, of two injections of PLUSET® (one in the morning and the other in the afternoon) and two injections of 150 µg of prostaglandins each (same administration regimen). In the morning of day 16,

- 30 -

the CIDR was removed. The total amount of PLUSET[®] administered throughout the superovulation phase was 350 IU.

Insemination

- [0124] This phase comprised three successive administrations (the first and second, in the morning and in the afternoon of day 17, respectively, and the last, in the morning of day 18) of semen from a donor jersey bull, which had been obtained previously and kept frozen to preserve the viability of the spermatozooids.

Collection of Embryos and their implantation in Surrogate Cows

- [0125] The collection of embryos by flushing of both horns of the cow's uterus with 1 l of DMPBS (Nutricell[®]) took place in the morning of day 26. Immediately afterwards, two embryos were transferred non-surgically per recipient cow, and pregnancies were determined at 30-35 days by ultrasonography.
- [0126] The implanted cows are allowed to normally pass the pregnancy up to a natural delivery. Eventually a chirurgic approach (Caesarea) could be used for delivery. The newborns are fed with Ig rich colostrum during the first 48 hours, and then synthetic, later natural (all of them free of animal origin compounds) foods are used.
- [0127] Since the generation of biological offspring obeys Mendel's law, half of the animals being born as a consequence of the procedure described above should be transgenic, and, of these, half should be males and the other half, females. Therefore, there is a high probability of obtaining a transgenic male (founder animal), whose semen could be useful for setting up a Master Bank of jersey transgenic semen to be used for the insemination of superovulated transgenic/non-transgenic cows in order to expand the transgenic herd.

EXAMPLE 7**Purification of recombinant hGH from milk**

[0128] Once verified the approximate molecular weight, the Western blot results and the biological activity of the recombinant hGH produced in the calf's milk are correct, an exhaustive purification process was performed, for it is imperative, 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 said product. This process comprised the steps of: obtaining the skim of the milk by means of centrifugation and dilution of the supernatant obtained to achieve a better solubility of recombinant hGH eventually retained in the micelles of casein (clarification); and passage of this solution through an expanded-bed anionic exchange chromatography column (an alternative to this step is the employ of an immunoaffinity column, see Example 8 below); the resulting solution is subjected to a reverse phase HPLC (C4) step; fractions rich in recombinant hGH are afterwards subjected to an anionic interchange chromatography.

[0129] Purified material is desalted, concentrated and subjected to molecular exclusion chromatography. This separates by a molecular weight in order to obtain the pure recombinant hGH.

[0130] The procedure for the purification of human growth hormone (hGH) from milk comprises the following steps in order: (a) clarification (b) expanded-bed anionic exchange chromatography, (c) reverse phase chromatography, (d) anionic exchange chromatography, (e) molecular exclusion chromatography (desalting), (f) concentration and (g) molecular exclusion chromatography.

Clarification

[0131] Fresh milk was mixed with a sufficient amount of Tween 80 in order to obtain a 0.5 % solution. After addition of Tween 80, 2 M Tris-HCl was added to get a pH of 7.3 ± 0.1 . Afterwards, the product was homogenized for 30

- 32 -

minutes, and then centrifugated at 14000 g in order to separate the fat layer. Later, the resulting solution was diluted with 0.5 % Tween 80 up to a conductivity of less than, or equal to, 1500 $\mu\text{S}/\text{cm}$. The pH was adjusted to 7.3 ± 0.1 with 2 M Tris-HCl and then the product was filtered through a 0.8 μm pore membrane and stored conveniently.

Expanded-bed Anionic Exchange Chromatography

[0132] The material resulting from the previous step is chromatographed using an anionic exchange matrix according to the following parameters:

1. Equipment:
 - A. Column:
 - 1) Diameter: 5 cm
 - 2) Bed height: 30 cm (compacted bed)
 - 3) Matrix:
 - a. Streamline Q XL (Amersham)
 - b. Volume: 600 ml
2. Solutions and buffers:
 - A. 0.5 N NaOH
 - B. 20 % Ethanol
 - C. Buffer A: 20 mM Tris.HCl, pH 7.3
 - D. Buffer B: 500 mM Tris.HCl, pH 7.3
 - E. Buffer C: 20 mM Tris.HCl, 150 mM NaCl, pH 7.3
 - F. Buffer D: 20 mM Tris.HCl, 500 mM NaCl, pH 7.3
3. Material to be chromatographed
 - A. Clarified milk.
 - B. Sample conditions:
 - 1) Volume: 25 ± 5 l
 - 2) Conductivity: $\leq 1500 \mu\text{S}/\text{cm}$
 - 3) pH: 7.3 ± 0.1

[0133] To equilibrate the column, 1.5 volumes of the column ("vc") (900 mL) of purified water were passed through it, at a flow of 115 ± 5 cm/hour

- 33 -

(descending flow). Afterwards, the following solutions or buffers in the quantities hereinafter detailed were sequentially passed through it, at an flow of 230 ± 30 cm/hour (ascending flow): 3.0 vc (1,800 ml) of 0.5 N NaOH; 3.0 vc (1,800 ml) of purified water; 1.0 vc (600 ml) of Buffer B; and, finally, 3.0 vc (1,800 ml) of Buffer A.

[0134] Once the column was equilibrated, the material to be chromatographed was loaded. Said loading was performed at $12 \pm 3^\circ\text{C}$ and at a flow of 230 ± 30 cm/hour. Thereafter, the elution was performed at a 115 ± 15 cm/hour flow and at the same temperature. Firstly, a sufficient amount of Buffer A was passed through the column (ascending flow), and secondly the solutions and buffers hereinafter detailed were passed in the following order (descending flow): 1.5 vc (900 ml) of Buffer A; 2.0 vc (1,200 ml) of Buffer C; and, finally, 2.0 vc (1,200 ml) of Buffer D.

[0135] Once the step had finished, the following solutions or buffers in the quantities hereinafter detailed were sequentially passed through the column, in order to clean it: 1.5 vc (900 ml) of purified water; 1.5 vc (900 ml) of 0.5 N NaOH; 2.0 vc (1,200 ml) of purified water; 1.0 vc (600 ml) of Buffer B; 1.5 vc (900 ml) of purified water; and, finally, 1.5 vc (900 ml) of 20 % Ethanol.

[0136] The selected hGH containing fractions were assayed for total proteins (by Bradford method) and for the protein of interest (by RIA), and stored at $2-8^\circ\text{C}$.

Reverse Phase Chromatography

[0137] The material resulting from the previous step is chromatographed according to the following parameters:

1. Equipment:

A. Column:

- 1) Diameter: 4 cm
- 2) Bed height: 48 cm
- 3) Matrix

- 34 -

a. BakerBond Wide-Pore Butyl (C4) 15 μ m
prep LC Packing (Baker)

b. Volume: 600 ml

2. Solutions and buffers:

A. Mobile Phase 1 (MP1): 30 mM NaHCO_3 ,
pH 7.2:Purified water:Acetonitrile (35:55:10)

B. Mobile Phase 2 (MP2): 30 mM NaHCO_3 ,
pH 7.2:Purified water:Acetonitrile (20:10:70)

C. 50 % Methanol

3. Material to be chromatographed

A. Pool of selected fractions resulting from the previous
step.

B. Sample conditions:

1) Volume: 30 ± 15 l

2) pH: 7.3 ± 0.3

[0138] To equilibrate the column, the following solutions or buffers in the quantities hereinafter detailed were sequentially passed through it, at a flow of less than, or equal to, 478 cm/hour: 0.3 vc (180 ml) of 50 % methanol; thereafter, a gradient of 50 % methanol-MP2 was applied starting from a 100:0 ratio of said solutions until a 0:100 ratio of said solutions in a total volume of 1.0 vc (600 ml) was reached; once the gradient was finished, 1.0 vc (600 ml) of MP2 was passed through the column; thereafter, a gradient of MP2-MP1 was applied starting from a 100:0 ratio of said solutions until a 0:100 ratio of said solutions in a total volume of 1.0 vc (600 ml) was reached; and, finally, 2.0 vc (1,200 ml) of MP1 were passed through the column.

[0139] Once the column was equilibrated, the material to be chromatographed was filtered through a 0.45 μ m pore membrane, and loaded immediately afterwards. Said loading was performed at $20 \pm 5^\circ\text{C}$ and at a flow of less than, or equal to, 238 cm/hour. Thereafter, the elution was performed at a 478 ± 78 cm/hour flow and at the same temperature, and the solutions and buffers hereinafter detailed were passed in the following order: 1.0 vc (600 ml) of

- 35 -

MP1; a gradient of MP1-MP2, starting from a 65:35 ratio of said solutions until a 45:55 ratio of said solutions in a total volume of 18.0 vc (9,000 ml) was reached; 1.0 vc (600 ml) of MP1-MP2 in a 45:55 ratio; and, finally, 2.0 vc (1,200 ml) of MP2.

[0140] Once the step had finished, in order to clean the column, a gradient of MP2-50 % Methanol was applied, starting from a 100:0 ratio of said solutions until a 0:100 ratio of said solutions in a total volume of 1.0 vc (600 ml) was reached; and, finally, 2.0 vc (1,200 ml) of 50 % methanol were passed through the column.

[0141] The fractions resulting from this chromatography were assayed by SDS-PAGE homogeneous 20 % and for the oxidized hGH, and, depending on the results, a selection was performed. Afterwards, the selected hGH containing fractions were assayed for total proteins (by Bradford method), and stored at 2-8°C.

Anionic Exchange Chromatography

[0142] The material resulting from the previous step is chromatographed using an anionic exchange matrix, as follows:

1. Equipment:
 - A. Column:
 - 1) Diameter: 5 cm
 - 2) Bed height: 25 cm
 - 3) Matrix
 - a. Source 30Q (Pharmacia)
 - b. Volume: 500 ml
2. Solutions and buffers:
 - A. 20 % Ethanol
 - B. Solution K: 0.5 N NaOH, 3M NaCl
 - C. Solution L: 50 mM Tris, pH 7.50
 - D. Solution M: 0.1 N HCl, 3 M NaCl

- 36 -

E. Mobile Phase 3 (MP3): Solution L:Acetonitrile (70:30)

F. Mobile Phase 4 (MP4): 50 mM Tris, 0.1 M NaCl,
pH 7.50:Acetonitrile (70:30)

3. Material to be chromatographed

A. Selected fractions resulting from the previous step.

B. Sample conditions:

1) Volume: 4.5 ± 1 l

2) pH: 7.2 ± 0.2

[0143] To equilibrate and sanitize the column, the following solutions or buffers in the quantities hereinafter detailed were sequentially passed through it, at a flow of less than, or equal to, 183 ± 20 cm/hour: 1.0 vc (500 ml) of purified water; 1.0 vc (500 ml) of Solution K; 1.0 vc (500 ml) of Solution L; and, finally, 1.0 vc (500 mL) of MP3.

[0144] Once the column was equilibrated, the material to be chromatographed loaded. Said loading was performed at $20 \pm 5^\circ\text{C}$ and at a flow of less than, or equal to, 183 cm/hour. Thereafter, the elution was performed at a 183 ± 20 cm/hour flow and at the same temperature, and the solutions and buffers hereinafter detailed were passed in the following order: 1.0 vc (500 ml) of MP3; a gradient of MP3-MP4, starting from a 15:85 ratio of said solutions until a 25:75 ratio of said solutions in a total volume of 5.0 vc (2500 ml) was reached; and, finally, 2.0 vc (1000 ml) of MP4 was passed through the column.

[0145] Once the step had finished, the following solutions or buffers in the quantities hereinafter detailed were sequentially passed through the column, in order to clean it: a gradient of MP4-purified water, starting from a 100:0 ratio of said solutions until a 0:100 ratio of said solutions in a total volume of 0.5 vc (250 ml) was reached; 0.5 vc (250 ml) of purified water; a gradient of purified water-Solution K, starting from a 100:0 ratio of said solutions until a 0:100 ratio of said solutions in a total volume of 0.5 vc (250 ml) was reached; 1.0 vc (500 ml) of Solution K; a gradient of Solution K-purified water, starting from a 100:0 ratio of said solutions until a 0:100 ratio of said solutions in a total

- 37 -

volume of 0.5 vc (250 ml) was reached; 0.5 vc (250 ml) of purified water; a gradient of purified water-Solution M, starting from a 100:0 ratio of said solutions until a 0:100 ratio of said solutions in a total volume of 0.5 vc (250 ml) was reached; 1.0 vc (500 ml) of Solution M; a gradient of Solution M-purified water, starting from a 100:0 ratio of said solutions until a 0:100 ratio of said solutions in a total volume of 0.5 vc (250 ml) was reached; 1.0 vc (500 ml) of purified water; a gradient of purified water-Solution L, starting from a 100:0 ratio of said solutions until a 0:100 ratio of said solutions in a total volume of 0.5 vc (250 ml) was reached; 0.5 vc (250 ml); 0.5 vc (250 ml) of Solution L; a gradient of Solution L-purified water, starting from a 100:0 ratio of said solutions until a 0:100 ratio of said solutions in a total volume of 0.5 vc (250 ml) was reached; and, finally, 1.5 vc (750 ml) of purified water.

[0146] The selected hGH containing fractions were assayed for total proteins (by Bradford method), and stored at 2 - 8°C.

Molecular Exclusion Chromatography

[0147] The material resulting from the previous step is chromatographed using a molecular exclusion matrix, as follows:

1. Equipment:
 - A. Column:
 - 1) Diameter: 5 cm
 - 2) Bed height: 25 cm
 - 3) Matrix
 - a. Cellufine GH25 (Millipore)
 - b. Volume: 500 ml
2. Solutions and buffers:
 - A. 0.5 N NaOH
 - B. 20 % Ethanol
 - C. Buffer C: 150 mM NaH_2PO_4 , pH 7.2

- 38 -

D. Buffer G: 320 mM Glycine, 10 mM NaH_2PO_4 , 0.1 % Tween 80, pH 6.9

3. Material to be chromatographed

A. Selected fractions resulting from the previous step.

B. Sample conditions:

1) Volume: 0.5 ± 0.2 l

2) pH: 7.5 ± 0.5

[0148] To equilibrate and sanitize the column, the following solutions or buffers in the quantities hereinafter detailed were sequentially passed through it, at a flow of less than, or equal to, 180 cm/hour: 1.0 vc (500 ml) of purified water; 1.0 vc (500 ml) of 0.5 N NaOH; 0.5 vc (250 ml) of purified water; 0.5 vc (250 ml) of Buffer C; and, finally, 2.0 vc (1000 ml) of Buffer G.

[0149] Once the column was equilibrated, the material to be chromatographed was loaded. Said loading was performed at $20 \pm 5^\circ\text{C}$ and at a flow of 183 ± 20 cm/hour. Thereafter, the elution was performed at the same flow rate and temperature, and 1.0 vc (500 ml) of Buffer G was passed through the column, as many times as the number of runs which was necessary to perform.

[0150] Once the step had finished, the following solutions or buffers in the quantities hereinafter detailed were sequentially passed through the column, in order to clean it: 0.5 vc (250 ml) of purified water; 1.0 vc (500 ml) of 0.5 N NaOH; 0.5 vc (250 ml) of purified water; 0.5 vc (250 ml) of Buffer C; 0.5 vc (250 ml) of purified water; and, finally, 1.5 vc (750 ml) of 20 % ethanol.

[0151] The selected hGH containing fractions were assayed for total proteins, and stored at $2-8^\circ\text{C}$.

Concentration

[0152] The fractions resulting from the previous example were concentrated according to the conditions described below:

1. Equipment:

A. Peristaltic pump: Watson Marlow - Cat. No. 302S

B. Tubing: Watson Marlow - Cat. No. 902.0080.016

- 39 -

C. Concentrator: Prep Scale Millipore -- Cat. No. CDU

F006LC

2. Solutions and buffers:

- A. 0.28 % Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)
- B. 0.06 % Triton
- C. 0.125 N NaOH
- D. Buffer G: 320 mM Glycine, 10 mM NaH₂PO₄, 0.1 %

Tween 80, pH 6.9

3. Material to be processed:

- A. Selected fractions resulting from the previous example.
- B. Sample conditions:
 - 1) Volume: 1.0 ± 0.5 l
 - 2) Conductivity: 1200 ± 100 μ S/cm
 - 3) pH: 6.9 ± 0.1

[0153] The equipment was first cleaned, sanitized and equilibrated, and the following sequence of solutions and buffers were flowed through the equipment: 2 l of 0.125 N NaOH; 10 l of purified water; and, finally, 2 l of Buffer G. The equipment was then ready to be used for concentration on the selected fractions, following the usual methodology. The concentration procedure was performed until a protein concentration of 15 mg/ml (assessed by Bradford method) was reached.

[0154] The selected fractions were filtered through a 0.22 μ m pore membrane, assayed for total proteins (by Bradford method), and stored at 4°C.

[0155] The conductivity and the pH of the selected fractions were 1,100-1,300 μ S/cm and 6.9 ± 0.1 , respectively.

Molecular Exclusion Chromatography

[0156] The material resulting from the previous step is chromatographed using a molecular exclusion matrix, as follows:

1. Equipment:

- A. Column:

- 40 -

- 1) Diameter: 5 cm
 - 2) Bed height: 92 cm
 - 3) Matrix
 - a. Sephacryl S-200 High Resolution
(Amersham Pharmacia)
 - b. Volume: 1,800 ml
2. Solutions and buffers:
- A. 0.5 N NaOH
 - B. 20 % Ethanol
 - C. Buffer H: 320 mM Glycine, 2.2 mM NaH_2PO_4 , 1.8 mM Na_2HPO_4 , pH 7.30
3. Material to be chromatographed
- A. Fractions selected from the previous step, concentrated
 - B. Sample conditions:
 - 1) Volume: 40 ± 20 ml
 - 2) Conductivity: $1,200 \pm 100$ $\mu\text{S}/\text{cm}$
 - 3) pH: 7.3 ± 0.1

[0157] To equilibrate and sanitize the column, the following solutions or buffers in the quantities hereinafter detailed were sequentially passed through it, at a flow of less than 46 cm/hour: 1.0 vc (1,800 ml) of purified water; 1.0 vc (1,800 ml) of 0.5 N NaOH; and, finally, 2.0 vc (3,600 ml) of Buffer H.

[0158] Once the column was equilibrated, the material to be chromatographed was loaded. Said loading was performed at $20 \pm 5^\circ\text{C}$ and at a flow of 46 ± 15 cm/hour. Thereafter, the elution was performed at the same flow rate and temperature, and 1.0 vc (1,800 ml) of Buffer H was passed through the column, as many times as the number of runs which was necessary to perform.

[0159] Once the step had finished, the following solutions or buffers in the quantities hereinafter detailed were sequentially passed through the column, in order to clean it: 1.0 vc (1,800 ml) of purified water, and 1.5 vc (2,700 ml) of 20 % ethanol.

- 41 -

[0160] The fractions containing pure hGH were aseptically filtered through a 0.22 μ m pore membrane into sterile, depyrogenated plastic bottles, assayed for total proteins, and stored at -20°C .

EXAMPLE 8

Alternative Procedure for the Purification of hGH from milk

[0161] Instead of the purification method previously described, an alternative scheme can be employed in order to purify the recombinant hGH contained in the milk. The main difference between the procedure described in Example 7 and the alternative one presented in this example is that the second step of the former involves expanded-bed anionic exchange chromatography, whereas the corresponding step of the latter entails immunoaffinity chromatography. The clarification steps of both procedures are also slightly different. Since the rest of both purification schemes are identical, only the first two steps of the alternative procedure will be described below.

Clarification

[0162] Fresh milk was mixed with a sufficient amount of Tween 80 in order to obtain a 0.5 % solution. After addition of Tween 80, 1 M Tris was added to get a pH of 7.3 ± 0.3 . Afterwards, the product was homogenized for 30 minutes, and then centrifugated at 14000 g in order to separate the fat layer. Later, the resulting solution was diluted 20-fold with Buffer S (50 mM Tris.HCl, 500 mM NaCl, 0.5 % Tween 80, pH 7.3), and then filtered through a 0.45 μ m pore membrane and stored conveniently.

Immunoaffinity Chromatography

[0163] The material resulting from the previous step is chromatographed using an immunoaffinity interaction matrix (Affigel 10 Ester Agarose, manufactured by BioRad, with covalently attached anti-GH Monoclonal

- 42 -

Antibodies, manufactured by Bio Sidus) according to the following parameters:

1. Equipment:

A. Column:

- 1) Diameter: 30 cm
- 2) Bed height: 15 cm
- 3) Matrix:

a. Affigel 10 Ester Agarose (BioRad), with covalently attached anti-GH Monoclonal Antibodies (Bio Sidus)

b. Volume: 10 l

2. Solutions and buffers:

A. Buffer A: 50 mM Tris.HCl, 500 mM NaCl, pH 7.2

B. Buffer B: 100 mM Citric Acid, pH 3.0

C. Buffer C: 150 mM NaH_2PO_4 , pH 7.2

D. Buffer D: 50 mM Tris.HCl, 500 mM NaCl, 500 mM Guanidine.HCl, pH 7.2

E. Buffer E: 50 mM Tris.HCl, 500 mM NaCl, pH 7.2, 0.2% Sodium Azide, 0.1 g/l Gentamicine.

3. Material to be chromatographed

A. Clarified milk.

B. Sample conditions:

- 1) Volume: 30 – 50 l
- 2) Conductivity: 45 ± 15 mS/cm
- 3) pH: 7.3 ± 0.3

[0164] To equilibrate and sanitize the column, if it had not been used in the last seven days, the following solutions or buffers in the quantities hereinafter detailed were sequentially passed through it, at a flow of less than 5 l/hour: 1.0 volume of the column ("vc") (10 l) of Buffer A; 2.0 vc (20 l) of Buffer D; 2.0 vc (20 l) of Buffer A; 1.0 vc (10 l) of Buffer B; 2.0 vc (20 l) of Buffer C; and, finally, 1.0 vc (10 l) of Buffer A.

- 43 -

- [0165] On the other hand, if the column had been used in the last seven days, the following solutions or buffers in the quantities hereinafter detailed were sequentially passed through it, at a flow of less than 51 cm/hour: 1.0 vc (10 l) of Buffer C; and, finally, 2.0 vc (20 l) of Buffer A.
- [0166] Once the column was equilibrated, the material to be chromatographed was loaded. Said loading was performed at $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$ and at a flow of less than 51 cm/hour. Thereafter, the elution was performed at a 42 ± 9 cm/hour flow and at the same temperature, and the solutions and buffers hereinafter detailed were passed in the following order: 2.0 vc (20 l) of Buffer A; and 1.5 vc (15 l) of Buffer B.
- [0167] Once the step had finished, the following solutions or buffers in the quantities hereinafter detailed were sequentially passed through the column, in order to clean it: 2.0 vc (20 l) of Buffer D; 2.0 vc (20 l) of Buffer A; and, finally, 2.0 vc (20 l) of Buffer E.
- [0168] The selected hGH containing fractions were assayed for total proteins (by Bradford method) and for the protein of interest (by RIA), and stored at 4°C .

EXAMPLE 9

Quality Control of Pure Recombinant hGH

- [0169] Two batches of pure recombinant hGH were subjected to a series of assays to verify that the product is indistinguishable from natural hGH. Such procedures included, but are not limited to, SDS/PAGE, Western blot, biological activity *in vitro* (cells nb2) and *in vivo* (hypophysectomized rats), peptide mapping, determination of the complete aminoacid sequence, isoelectric focusing (IEF), and reverse-phase and size exclusion HPLC analyses. The results obtained in all those assays were exactly the same for both recombinant and natural hGH, which proves that the pure recombinant hGH corresponds exactly to the natural hGH, being thus suitable for manufacturing a biopharmaceutical product.

- 44 -

[0170] 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 invention or any embodiment thereof. All patents and publications cited herein are fully incorporated by reference herein in their entirety.

- 45 -

WHAT IS CLAIMED IS:

1. A method of producing a protein comprising:
 - a) making a non-human transgenic mammal that produces a protein of interest in its milk;
 - b) obtaining said milk from said non-human transgenic mammal; and
 - c) purifying said protein of interest from said milk.
2. The method according to claim 1, wherein said non-human transgenic mammal is made by a process comprising:
 - a) obtaining a gene which encodes a protein of interest;
 - b) cloning said gene into a plasmid whereby said gene is operably linked to a promoter that will direct the expression of said gene in mammary cells, resulting in an expression plasmid;
 - c) transfecting somatic cells with said expression plasmid so that said plasmid is incorporated into the genome of said somatic cells, resulting in transgenic somatic cells;
 - d) enucleating a mature oocyte, resulting in an enucleated oocyte;
 - e) fusing one of said transgenic somatic cells with said enucleated oocyte resulting in a monocell embryo;

- 46 -

f) implanting said embryo in the uterus of a receptive mammal;
and

g) monitoring the pregnancy through the birth of the transgenic mammal.

3. The method of claim 2, wherein said promoter is a beta casein promoter, and wherein said protein of interest is human growth hormone.

4. The method of claim 3, wherein the expression plasmid is pR β hGH.

5. The method of claim 4, wherein said expression plasmid further comprises a neomycin resistance gene.

6. The method of claim 5, wherein said expression plasmid is pRNeo.

7. The method of claim 2, wherein said mammal is a bovine that produces recombinant human growth hormone in its milk, whose genome comprises an integrated plasmid, wherein said plasmid comprises the human growth hormone gene and a beta casein promoter that directs expression of said gene in mammary cells of said mammal.

8. The method of claim 7, wherein said plasmid is pR β hGH.

9. The method of claim 8, wherein said plasmid further comprises a neomycin resistance gene.

10. The method of claim 9, wherein said plasmid is pRNeo.

- 47 -

11. The method of claim 2, wherein said somatic cells are fibroblasts.
12. The method of claim 2, wherein said transgenic somatic cells are obtained by isolation from a female transgenic for the production of said protein of interest in its milk.
13. The method of claim 12, wherein said transgenic somatic cells are fibroblasts.
14. The method according to claim 1, wherein said non-human transgenic mammal is made by a process comprising:
 - a) superovulating a female non-human mammal which is transgenic for the production of said protein of interest in its milk;
 - b) artificially inseminating said mammal with semen obtained from a male non-human, non-transgenic mammal, to produce embryos;
 - c) collecting said embryos;
 - d) implanting said embryos in the uterus of a receptive mammal; and
 - e) monitoring the pregnancy through the birth of the transgenic mammal.
15. The method according to claim 1, wherein said non-human transgenic mammal is made by a process comprising:

- 48 -

- a) superovulating a female non-human mammal which is transgenic for the production of said protein of interest in its milk;
- b) artificially inseminating said mammal with semen obtained from a male non-human mammal which is transgenic for the production of said protein of interest, to produce embryos;
- c) collecting said embryos;
- d) implanting said embryos in the uterus of a receptive mammal; and
- e) monitoring the pregnancy through the birth of the transgenic mammal.

16. The method according to claim 1, wherein said non-human transgenic mammal is made by a process comprising:

- a) superovulating a female non-human, non-transgenic mammal;
- b) artificially inseminating said mammal with semen obtained from a male non-human mammal which is transgenic for the production of said protein of interest, to produce embryos;
- c) collecting said embryos;
- d) implanting said embryos in the uterus of a receptive mammal; and

e) monitoring the pregnancy through the birth of the transgenic mammal.

17. The method of any one of claims 2, 12, 14, 15 or 16, wherein said mammal is of bovine species, porcine species, ovine species, caprine species or rodent species.

18. The method of claim 17, wherein said mammal is of bovine species.

19. The method of any one of claims 2, 12, 14, 15 or 16, wherein said protein of interest is a mammalian growth hormone.

20. The method of claim 19, wherein said mammalian growth hormone is human growth hormone, bovine growth hormone, porcine growth hormone, ovine growth hormone, caprine growth hormone or rodent growth hormone.

21. The method of claim 20, wherein said mammalian growth hormone is human growth hormone.

22. The method of claim 21, wherein said mammal produces human growth hormone at a level of greater than about 1.0 g hGH/L milk.

23. The method of claim 22, wherein said mammal produces human growth hormone at a level of greater than about 2.0 g hGH/L milk.

24. The method of claim 23, wherein said mammal produces human growth hormone at a level of greater than about 3.0 g hGH/L milk.

- 50 -

25. The method of claim 24, wherein said mammal produces human growth hormone at a level of greater than about 4.0 g hGH/L milk.

26. The method of claim 25, wherein said mammal produces human growth hormones at a level of greater than about 5.0 g hGH/L milk.

27. The method of claim 26, wherein said mammal produces human growth hormone at a level of greater than about 6.0 g hGH/L milk.

28. The method of claim 19, wherein production of said mammalian growth hormone by said mammal stimulates said mammal to produce more milk comprising said mammalian growth hormone.

29. The method of any one of claims 2, 12, 14, 15 or 16, wherein the gene encoding said protein of interest (linked to a promoter that directs the expression of said gene in mammary cells) is found in somatic cells and germ cells of said mammal.

30. A method of purifying a recombinant growth hormone from milk of a non-human transgenic mammal that produces a recombinant growth hormone comprising:

- a) clarifying the milk of a non-human transgenic mammal, resulting in a clarified milk; and
- b) subjecting said clarified milk to chromatography, resulting in purified recombinant growth hormone.

31. The method of claim 30, wherein said chromatography is ion exchange chromatography, reverse phase chromatography, molecular exclusion chromatography or affinity chromatography.

- 51 -

32. The method of claim 31, wherein multiple chromatography steps are performed.

33. The method of claim 31, wherein said ion exchange chromatography is anion exchange chromatography.

34. The method of claim 31, wherein the affinity chromatography is immunochromatography.

35. The method of claim 31, further comprising a concentration step.

36. A method of purifying a recombinant growth hormone from milk of a non-human transgenic mammal that produces a recombinant growth hormone comprising:

a) clarifying the milk of a non-human transgenic mammal, resulting in a clarified milk;

b) subjecting said clarified milk to expanded-bed anion exchange chromatography, resulting in an anion exchange chromatographed material;

c) subjecting said anion exchange chromatographed material to reverse phase chromatography, resulting in a reverse phase chromatographed material;

d) subjecting said reverse phase chromatographed material to anion exchange chromatography, resulting in an anion exchange chromatographed material;

- 52 -

e) subjecting said anionic exchange chromatographed material to molecular exclusion chromatography, resulting in a molecular exclusion chromatographed material;

f) concentrating said molecular exclusion chromatographed material, resulting in a concentrated material; and

g) subjecting said concentrated material to molecular exclusion chromatography, resulting in pure recombinant growth hormone.

37. A method of purifying a recombinant growth hormone from milk of a non-human transgenic mammal that produces a recombinant growth hormone comprising:

a) clarifying milk obtained from a transgenic mammal, resulting clarified milk;

b) subjecting said clarified milk to immunoaffinity chromatography, resulting in an immunoaffinity chromatographed material;

c) subjecting said immunoaffinity chromatographed material reverse phase chromatography, resulting in a reverse phase chromatographed material;

d) subjecting said reverse phase chromatographed material to anionic exchange chromatography, resulting in an anionic exchange chromatographed material;

- 53 -

e) subjecting said anionic exchange chromatographed material to molecular exclusion chromatography, resulting in a molecular exclusion chromatographed material;

f) subjecting said molecular exclusion chromatographed material to concentration, resulting in a concentrated material; and

g) subjecting said concentrated material to molecular exclusion chromatography, resulting in pure recombinant growth hormone.

38. The method of either of claims 36 or 37, wherein said growth hormone is a mammalian growth hormone.

39. The method of claim 38, wherein said mammalian growth hormone is human growth hormone, bovine growth hormone, porcine growth hormone, ovine growth hormone, caprine growth hormone or rodent growth hormone.

40. The method of claim 39, wherein said mammalian growth hormone is human growth hormone.

41. The method of claim 40, wherein said mammal produces human growth hormone at a level of greater than about 1.0 g hGH/L milk.

42. The method of claim 41, wherein said mammal produces human growth hormone at a level of greater than about 2.0 g hGH/L milk.

43. The method of claim 42, wherein said mammal produces human growth hormone at a level of greater than about 3.0 g hGH/L milk.

- 54 -

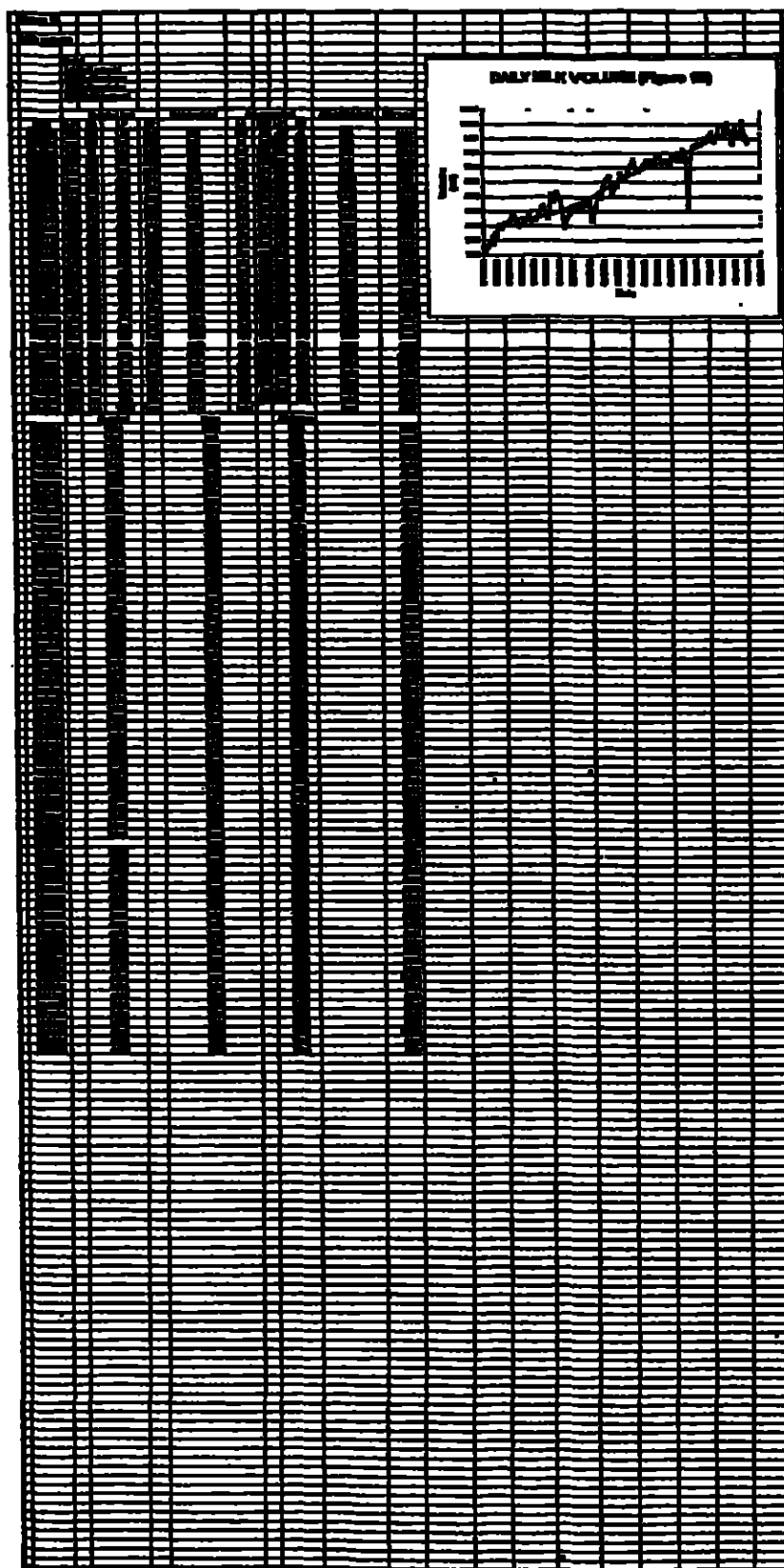
44. The method of claim 43, wherein said mammal produces human growth hormone at a level of greater than about 4.0 g hGH/L milk.

45. The method of claim 44, wherein said mammal produces human growth hormone at a level of greater than about 5.0 g hGH/L milk.

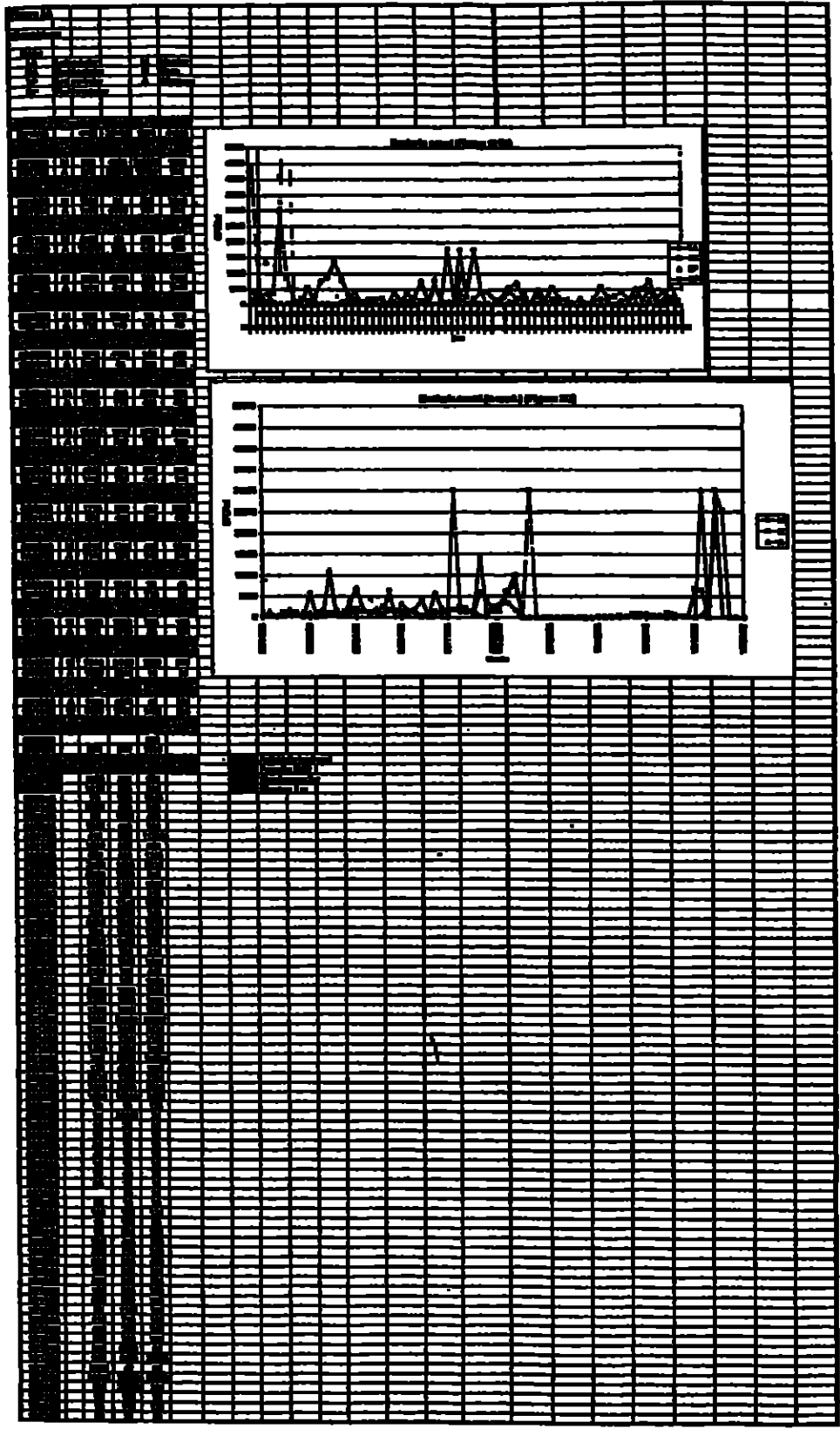
46. The method of claim 45, wherein said mammal produces human growth hormone at a level of greater than about 6.0 g hGH/L milk.

47. The method of either of claims 36 or 37, wherein said non-human transgenic mammal is of bovine species.

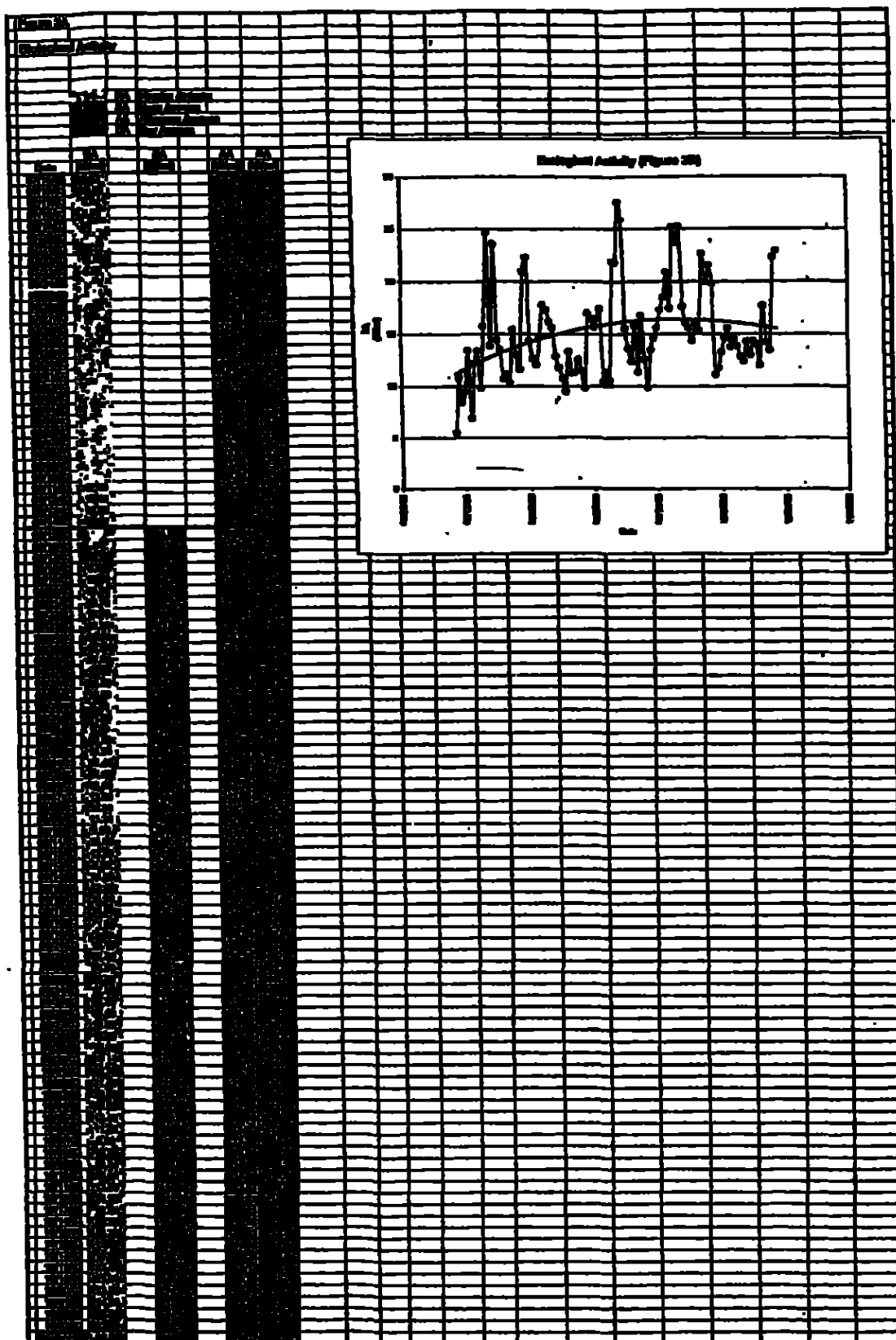
48. The method of either of claims 36 or 37, wherein said non-human transgenic mammal is a pig, sheep, goat or rodent.



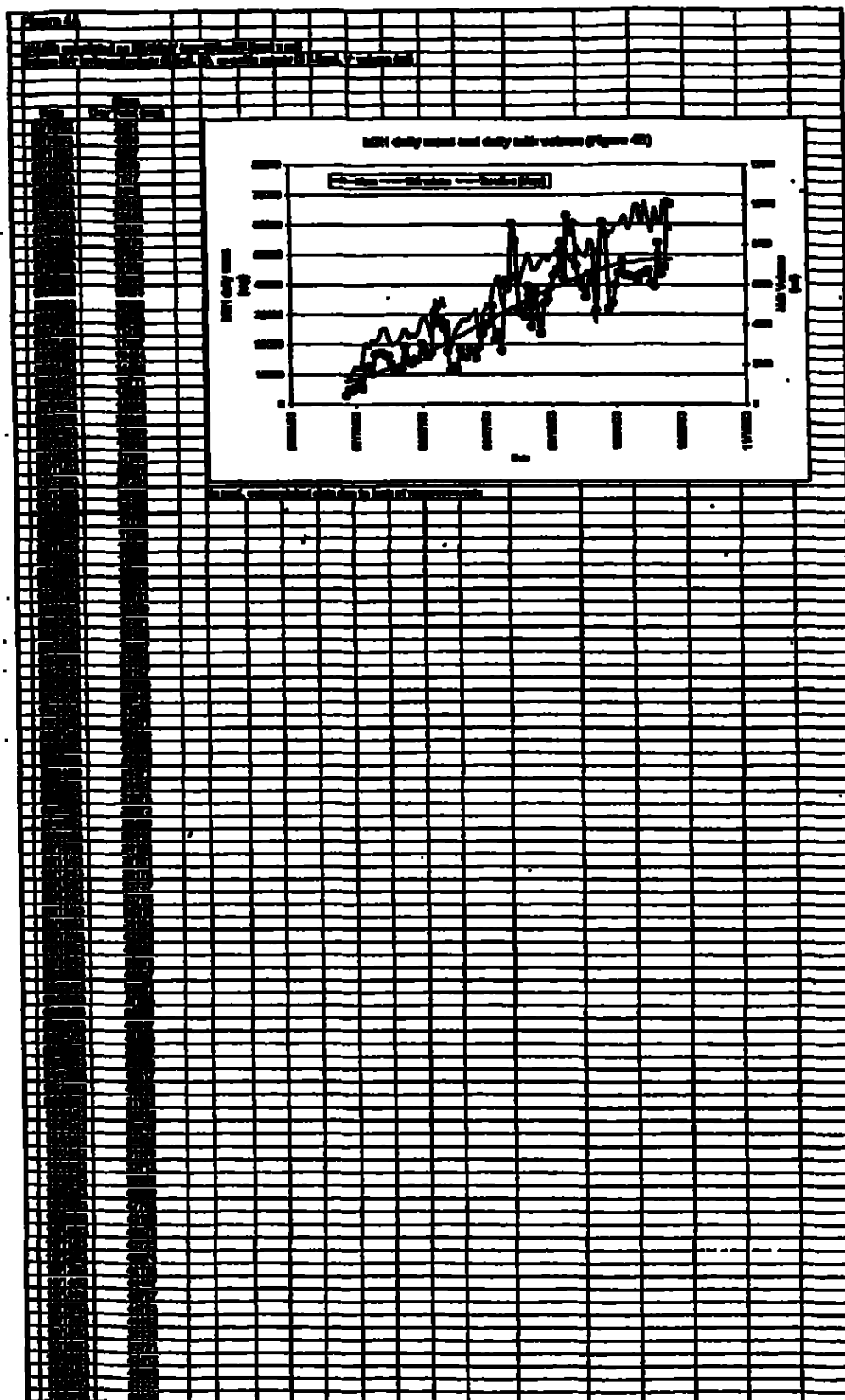
SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

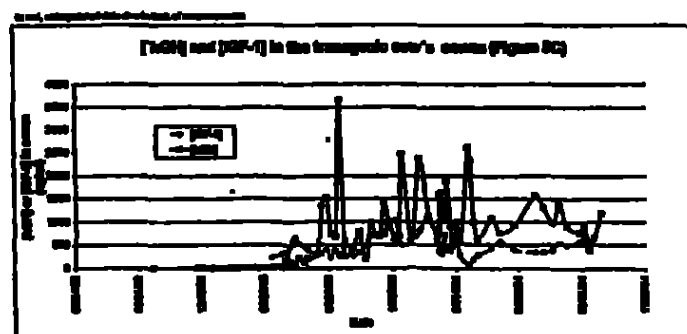
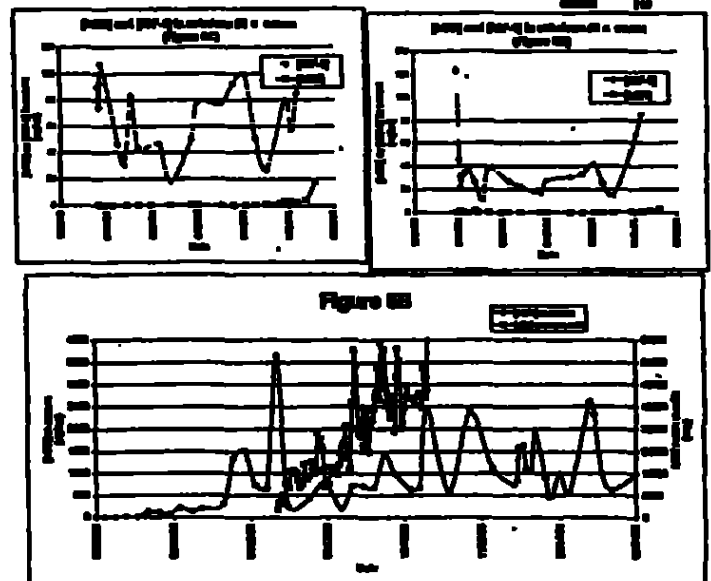


SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)



Page	Page Number	Page	Page Number	Page	Page Number
1	1	1	1	1	1
2	2	2	2	2	2
3	3	3	3	3	3
4	4	4	4	4	4
5	5	5	5	5	5
6	6	6	6	6	6
7	7	7	7	7	7
8	8	8	8	8	8
9	9	9	9	9	9
10	10	10	10	10	10
11	11	11	11	11	11
12	12	12	12	12	12
13	13	13	13	13	13
14	14	14	14	14	14
15	15	15	15	15	15
16	16	16	16	16	16
17	17	17	17	17	17
18	18	18	18	18	18
19	19	19	19	19	19
20	20	20	20	20	20
21	21	21	21	21	21
22	22	22	22	22	22
23	23	23	23	23	23
24	24	24	24	24	24
25	25	25	25	25	25
26	26	26	26	26	26
27	27	27	27	27	27
28	28	28	28	28	28
29	29	29	29	29	29
30	30	30	30	30	30
31	31	31	31	31	31
32	32	32	32	32	32
33	33	33	33	33	33
34	34	34	34	34	34
35	35	35	35	35	35
36	36	36	36	36	36
37	37	37	37	37	37
38	38	38	38	38	38
39	39	39	39	39	39
40	40	40	40	40	40
41	41	41	41	41	41
42	42	42	42	42	42
43	43	43	43	43	43
44	44	44	44	44	44
45	45	45	45	45	45
46	46	46	46	46	46
47	47	47	47	47	47
48	48	48	48	48	48
49	49	49	49	49	49
50	50	50	50	50	50
51	51	51	51	51	51
52	52	52	52	52	52
53	53	53	53	53	53
54	54	54	54	54	54
55	55	55	55	55	55
56	56	56	56	56	56
57	57	57	57	57	57
58	58	58	58	58	58
59	59	59	59	59	59
60	60	60	60	60	60
61	61	61	61	61	61
62	62	62	62	62	62
63	63	63	63	63	63
64	64	64	64	64	64
65	65	65	65	65	65
66	66	66	66	66	66
67	67	67	67	67	67
68	68	68	68	68	68
69	69	69	69	69	69
70	70	70	70	70	70
71	71	71	71	71	71
72	72	72	72	72	72
73	73	73	73	73	73
74	74	74	74	74	74
75	75	75	75	75	75
76	76	76	76	76	76
77	77	77	77	77	77
78	78	78	78	78	78
79	79	79	79	79	79
80	80	80	80	80	80
81	81	81	81	81	81
82	82	82	82	82	82
83	83	83	83	83	83
84	84	84	84	84	84
85	85	85	85	85	85
86	86	86	86	86	86
87	87	87	87	87	8

Exhibit 1A: Schedule AG			
Line	SP-1000	SP-1000	SP-1000
000000	0.00	0.00	0.00
000001	1.00	0.00	0.00
000002	2.00	0.00	0.00
000003	3.00	0.00	0.00
000004	4.00	0.00	0.00
000005	5.00	0.00	0.00
000006	6.00	0.00	0.00
000007	7.00	0.00	0.00
000008	8.00	0.00	0.00
000009	9.00	0.00	0.00
000010	10.00	0.00	0.00
000011	11.00	0.00	0.00
000012	12.00	0.00	0.00
000013	13.00	0.00	0.00
000014	14.00	0.00	0.00
000015	15.00	0.00	0.00
000016	16.00	0.00	0.00
000017	17.00	0.00	0.00
000018	18.00	0.00	0.00
000019	19.00	0.00	0.00
000020	20.00	0.00	0.00
000021	21.00	0.00	0.00
000022	22.00	0.00	0.00
000023	23.00	0.00	0.00
000024	24.00	0.00	0.00
000025	25.00	0.00	0.00
000026	26.00	0.00	0.00
000027	27.00	0.00	0.00
000028	28.00	0.00	0.00
000029	29.00	0.00	0.00
000030	30.00	0.00	0.00
000031	31.00	0.00	0.00
000032	32.00	0.00	0.00
000033	33.00	0.00	0.00
000034	34.00	0.00	0.00
000035	35.00	0.00	0.00
000036	36.00	0.00	0.00
000037	37.00	0.00	0.00
000038	38.00	0.00	0.00
000039	39.00	0.00	0.00
000040	40.00	0.00	0.00
000041	41.00	0.00	0.00
000042	42.00	0.00	0.00
000043	43.00	0.00	0.00
000044	44.00	0.00	0.00
000045	45.00	0.00	0.00
000046	46.00	0.00	0.00
000047	47.00	0.00	0.00
000048	48.00	0.00	0.00
000049	49.00	0.00	0.00
000050	50.00	0.00	0.00
000051	51.00	0.00	0.00
000052	52.00	0.00	0.00
000053	53.00	0.00	0.00
000054	54.00	0.00	0.00
000055	55.00	0.00	0.00
000056	56.00	0.00	0.00
000057	57.00	0.00	0.00
000058	58.00	0.00	0.00
000059	59.00	0.00	0.00
000060	60.00	0.00	0.00
000061	61.00	0.00	0.00
000062	62.00	0.00	0.00
000063	63.00	0.00	0.00
000064	64.00	0.00	0.00
000065	65.00	0.00	0.00
000066	66.00	0.00	0.00
000067	67.00	0.00	0.00
000068	68.00	0.00	0.00
000069	69.00	0.00	0.00
000070	70.00	0.00	0.00
000071	71.00	0.00	0.00
000072	72.00	0.00	0.00
000073	73.00	0.00	0.00
000074	74.00	0.00	0.00
000075	75.00	0.00	0.00
000076	76.00	0.00	0.00
000077	77.00	0.00	0.00
000078	78.00	0.00	0.00
000079	79.00	0.00	0.00
000080	80.00	0.00	0.00
000081	81.00	0.00	0.00
000082	82.00	0.00	0.00
000083	83.00	0.00	0.00
000084	84.00	0.00	0.00
000085	85.00	0.00	0.00
000086	86.00	0.00	0.00
000087	87.00	0.00	0.00
000088	88.00	0.00	0.00
000089	89.00	0.00	0.00
000090	90.00	0.00	0.00
000091			

[illegible]

SEQUENCE LISTING

<110> Starrenbeld Biotechnologie North
Melo, Carlos Alberto
Baranao, Lino
Carbonetto, Cesar

<120> Process for Producing Exogenous Protein in the Milk of Transgenic Mammals and a Process for Purifying Proteins Therefrom

<130> 1909.010PC02

<160> 4

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer PB1

<400> 1
tctactcgag gatcatctat ctgtcccaaa g 31

<210> 2
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer PB2

<400> 2
ctaggatcca atgatctgat tttgtgg 27

<210> 3
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer PB4

<400> 3
ctaggatcca tggctacagg taagcgcc 28

<210> 4
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer GHTE

<400> 4

UN PROCESO PARA PRODUCIR PROTEÍNA EXÓGENA EN LA LECHE DE
MAMÍFEROS TRANSGÉNICOS Y UN PROCESO PARA PURIFICAR
PROTEÍNAS DE ESTA MANERA

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0001] Los factores de proteína y las hormonas involucradas en el cuidado de la salud humana han sido habitualmente producidas por la industria farmacéutica mediante la extracción o mediante tecnología recombinante en las últimas décadas. La expresión de las construcciones genéticas que involucran los genes deseados fueron expresados exitosamente en bacterias de levadura o líneas celulares de mamífero. Sin embargo, el uso de cultivos de células de mamífero para obtener proteína de complejo, tal como aquellas que requieren un patrón de glicosilización adecuado involucran procedimientos de alto costo.

[0002] La tecnología de ADN recombinante se ha utilizado crecientemente durante la pasada década para la producción de materiales biológicos comercialmente importantes. Para este fin, las secuencias de ADN que codifican una variedad de proteínas humanas médicamente importantes han sido clonadas. Estas incluyen insulina, activador plasminógeno, los factores alfa 1-antitripsina y de coagulación VIII y IX. Actualmente, aún con las técnicas de ADN recombinantes emergentes, otras proteínas son usualmente purificadas de la sangre y el tejido, y son un proceso costoso y que consume tiempo que puede conllevar el riesgo de transmitir agentes infecciosos tales como aquellos que causan el sida y la hepatitis.

[0003] Aunque la expresión de las secuencias de ADN en bacterias para producir la proteína deseada médicamente importante parece una proporción atractiva, en

la práctica las bacterias a menudo no son satisfactorias como huéspedes en razón a que las proteínas extrañas de la célula bacteriana son inestables y no se procesan correctamente.

[0004] Reconociendo este problema, se ha implantado la expresión de genes clonados en cultivo de tejido de mamífero y ha probado en algunos casos ser una estrategia viable. Sin embargo, la fermentación de tanga de las células animales es un proceso costoso y técnicamente exigente.

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

[0006] La posibilidad de obtener animales transgénicos, como ganado, para un gen deseado, con el objetivo de conseguir grandes cantidades de una proteína humana en la leche, ha sido de gran interés para la industria. Varios grupos en la literatura reportan sus éxitos en la producción de soro albúmina humana, alfa anti-tripsina, y algunos otros ejemplos en vacas y cabras transgénicas.

[0007] Muchos experimentos se han desarrollado previamente en ratones o ratas, y la expresión transgénica fue siempre preferida para ser confinada a las glándulas mamarias en razón a que fueron empleados promotores de beta caseína o lactalbúmina, que responden solamente a factores de transcripción de la glándula mamaria en hembras lactantes.

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

[0009] La gente está ahora dedicada a configurar varios sistemas para mejorar el rendimiento de la transfección o selección de células, y escoger la fuente de célula somática fetal homóloga para mejorar la supervivencia y las condiciones de inmunidad de los animales clonados.

[0010] De otra parte, existe enorme interés en la transferencia nuclear de célula somática, principalmente para ser posible la propagación de animales domésticos elite y trabajo con ingeniería de animales transgénicos, para propósitos de agricultura y biomedicina. En resumen, la transferencia nuclear (NT), involucra la enucleación de un oocito receptor, seguido por la transferencia de una célula donante al espacio perivitelino en oposición cercana del citoplasto receptor, y su fusión. El desarrollo se induce artificialmente mediante activación química o física. La producción de descendencia clonada mediante transferencia nuclear de célula somática ha sido exitosamente obtenida en ovejas (Campbell, K.H., et al., *Nature* 380:64-66 (1996), 1996; Wells, D. N., et al., *Biol Reprod* 57:385-393 (1997); Wilmut I. et al., *Nature* 385:810-813 (1997); gota (Baguisi, A., et al., *Science* 280:1256-1258 (1998); Kato, Y., et al., *Science* 282:2095-2098 (1998); D. N. et al., *Reprod Fétil Dev* 10:369-378 (1998)).

[0011] Existen varios factores que influyen los resultados del NT que incluyen métodos de enucleación, fusión, activación, y sincronía de ciclo celular donador-receptor. Se han logrado altas eficiencias en la enucleación de oocitos receptores utilizando tintes vitales específicos de ADN para visualizar cromatina (Stice, S. L.,

and Keefer, C. L., *Biol Reprod* 48:715-719 (1993); Westhusin, M. E., *et al.*, *J. Reprod Fertil* 95: 475-480 (1992)). La fusión de la célula donante con el oocito receptor depende de la precisión del alineamiento celular en el campo del pulso, contacto de la célula donante con el oocito receptor y el tamaño de las células donantes. (Collas, P., *et al.*, *Anal Biochem* 208:1-9 (1993)). La activación del embrión reconstruido NT ha sido refinado y las proporciones de desarrollo a blastocistos son equivalentes a oocitos fertilizados en vitro (Liu, L., *et al.*, *Mol Reprod Dev* 49:298-307 (1998)).

[0012] El desarrollo exitoso de los embriones NT ha sido logrado utilizando oocitos maduros (Willadsen, S. M., *Nature* 320:63-65 (1986)), cigotos, (MacGrath, J., and Solter, D., *Biol N Y* 4:37-55 (1985)), y (Tsunoda, Y., *et al.*, *J Reprod Fertil* 96:275-281 (1992)) y embriones en etapa de clivaje (Tsunoda, Y., *et al.*, *J Reprod Fertil* 96:275-281 (1992)) como citoplastos receptores; sin embargo, esto depende de la fuente del núcleo donador. La compatibilidad del ciclo celular entre los citoplastos receptores y las células donantes es uno de los factores importantes que influyen el desarrollo de los embriones NT. La sincronización apropiada es necesaria para preservar el ploidie del embrión reconstituido.

[0013] El ciclo de la célula mitótica tiene las siguientes fases consecutivas: intersticio pre-replicación (G₁), síntesis de ADN (S), intersticio pre-mitótico (G₂) y mitosis (M). Durante un ciclo celular simple, todos los ADN genómicos se replican una vez antes de la mitosis. Un núcleo donador de interfase transferido hacia un oocito maduro y enucleado (metafase II) sufre varios cambios morfológicos. Después de la fusión, pero antes de que se rompa la cubierta nuclear donante (NEBD), el cromosoma se condensa (PCC). Estos cambios son inducidos mediante la actividad del factor que promueve la maduración/mitosis/miosis (MPF)

y la proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK) (Collas, P., y Robl, J. M., *Biol Reprod* 45:455-465 (1991)). Las actividades MPF y MAPK se encuentran en todas las células meióticas y mitóticas y son más altas en la metafase y en los oocitos de mamífero; estos altos niveles también inducen disminución en la metafase II. La reducción del MPF y el MAPK mediante fertilización o activación con ionóforo de calcio es la señal para completar la meiosis, segunda emisión del cuerpo polar, condensación del núcleo del espermatozoide y formación pronuclear.

[0014] El efecto deseado del NEBD y el PCC sobre la cromatina donante depende del ciclo celular del núcleo donador al momento de la transferencia. Los núcleos G_0/G_1 diploides se condensan para formar cromátidos simples, pero los núcleos G_2 tetraploides se condensan para formar dobles cromátidos. Sin embargo, los núcleos en la fase S al momento de la transferencia muestran una apariencia "pulverizada" característica: el PCC produce daño extensivo al ADN. Por lo tanto, el ploidio correcto se puede producir al transferir unos núcleos G_1 o G_0 a los oocitos de la metafase II al momento de la activación o antes. Un segundo método es transferir núcleos en el oocito previamente activado, en la fase S, en este caso es posible utilizar una célula donante en G_1 o G_0 , o la fase S. En razón a que el MPF y el MAPK son bajos; la cromatina se condensa, y sufre replicación de ADN sin PCC y NEBD.

[0015] Un tercer esquema de sincronización se ha reportado en ratones, en donde el desarrollo de una descendencia viva fue producida mediante reconstrucción de embrión utilizando un G_2 o una célula donante de metafase y un oocito de metafase II enucleado (Cheong, H. T., *et al.*, *Biol Reprod* 48:958-963 (1993); Kwon, O. Y. y Kono, T., *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:13010-13013 (1996)). La extrusión de un cuerpo polar proveniente de un embrión reconstruido NT se

reportó dando como resultado un embrión diploide simple y un cuerpo polar diploide (kwon, O. Y., y Kono, T., *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 13010-13013 (1996)). Sin embargo, no existe reporte de formación de cuerpo polar después del NT en los oocitos MII enucleados en ganado, ovejas o cerdos, sugiriendo diferencias entre especies en la formación de control mecánica de husos intactos y extrusión de cuerpos polares.

[0016] Las etapas del ciclo celular de la célula donante y el receptor han sido sugeridas por ser también importantes para reprogramar los núcleos de la célula donante. Incrementando el tiempo entre la transferencia entre los núcleos donadores y la transcripción zigótica se puede mejorar la reprogramación del núcleo. Por esta razón, varios autores activaron el oocito varias horas después de la fusión (Cibelli, J. B., *et al.*, *Science* 280:1256-1258 (1998); wakayama, T., *et al.*, *Nature* 394:369-374 (1998); Wells, D. N., *et al.*, *Biol Reprod* 60:996-1005 (1999)); (Stice, S. L., y Keefer, C. L. *Biol Reprod* 48:715-719 (1993)).

[0017] Un procedimiento inexplorado para incrementar el tiempo de la reprogramación del núcleo donador se hace mediante transferencia nuclear antes de la metafase II. Después de la ruptura de la vesícula germinal (GVBD), todos los eventos de los núcleos se regulan por un incremento sustancial en el MPF y en el MAPK citosólico del oocito, lo que evita la reconstrucción del envoltura nuclear y la entrada en la fase S hasta la fertilización o activación. Por lo tanto, un oocito madurante puede ser un receptor universal para la célula donante en metafase o G₂. Aunque G₁ o G₀ se pueden utilizar como células donantes si la activación induce una fase S antes de la división celular.

[0018] Cuando los blastómeros en G₂ o M son utilizados como células donantes, es posible la reprogramación nuclear (Cheong, H. T. *et al.*, *Biol Reprod* 48:958-963) (1993); Kwon, O. Y., and Kono, T., *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:13010-13013 (1996); Liu L., *et al.*, *Mol Reprod Dev* 47:255-264 (1997)). Una explicación es que algunos factores son desplazados de la cromatina como resultado de la condensación del cromosoma. De hecho, para la transferencia nuclear, NEBD y PCC han sido considerados signos morfológicos de la reprogramación nuclear. Adicionalmente, en el momento de la fertilización la cromatina de la espermia es extremadamente condensada, y su volumen es considerablemente más pequeño que aquel de los núcleos de las células somáticas, y el oocito tiene la capacidad de remover la proteína nuclear de la espermia. Los cromosomas del oocito, durante la fusión del espermia-oocito, también están condensados. Es posible que la formación de cromatina condensada pueda tener alguna relevancia biológica. Consecuentemente, al semejar esta situación mediante la transferencia nuclear de metafase, un receptor enucleado de metafase puede mejorar el resultado NT. Sin embargo, pocos investigadores han utilizado esta aproximación en animales domésticos y utilizan blastómeros como células donantes (Liu, L., *et al.*, *Mol Reprod Dev* 47:255-264 (1997)).

[0019] Una meta de esta invención es caracterizar y refinar la transferencia nuclear de la célula somática existente a una técnica confiable y económica para producir terneros genéticamente idénticos de las células donantes de adulto.

[0020] La invención se relaciona con un mamífero transgénico no humano caracterizado por la producción de niveles inesperadamente altos de una hormona del crecimiento recombinante en su leche. La hormona de crecimiento recombinante puede ser, pero no está limitado a hormona de crecimiento humano.

El animal transgénico no humano puede ser, pero no está limitado a, un animal de las especies bovinas.

[0021] La invención además se relaciona con un plásmido que suministra la expresión de una proteína de interés en las células mamarias de mamíferos en las cuales la expresión se regula mediante un promotor de beta caseína. La proteína de interés puede ser, pero no está limitada a, hormona del crecimiento humano.

[0022] La invención también se relaciona con diferentes métodos para elaborar un mamífero transgénico no humano que produce una hormona de crecimiento recombinante en su leche. La hormona de crecimiento humano puede ser, pero no está limitada a, hormona de crecimiento humano. El mamífero transgénico no humano puede ser, pero no está limitado a, un animal de las especies bovinas.

[0023] La invención también se relaciona con un método para producir una proteína de interés, que comprende elaborar un mamífero transgénico no humano que produce dicha proteína en su leche, obteniendo dicha leche del mamífero transgénico no humano y purificando dicha proteína de interés de la leche. La proteína de interés puede ser, pero no está limitada a, hormona del crecimiento humano. El mamífero transgénico no humano puede ser, pero no está limitado a, un animal de las especies bovinas.

[0024] La invención también se relaciona con un método para producir y purificar una hormona de crecimiento recombinante proveniente de la leche de un mamífero transgénico. La hormona de crecimiento recombinante puede ser, pero no está limitada a, hormona del crecimiento humano. El mamífero transgénico puede ser, pero no está limitado a, un animal de especies bovinas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[0025] Las figuras 1A-1B muestran el volumen de leche diaria recolectado de una vaca transgénica obtenida mediante la fusión de un oocito enucleado y un fibroblasto previamente transfectado con un plásmido que contiene el gen que codifica la hormona de crecimiento humano (hGH) y un promotor que dirige su expresión a las células mamarias.

[0026] Las figuras 2A-2C muestran el conteo de bacterias encontrado en la leche recolectada de la misma vaca transgénica.

[0027] Las figuras 3A-3B muestran la actividad biológica del hGH contenido en leche de la misma vaca transgénica.

[0028] La figura 4A muestra la masa diaria de hGH producida en la leche de la misma vaca transgénica. Esta magnitud y el volumen de leche diaria recolectada de la vaca transgénica son graficados juntos en la figura 4B.

[0029] La figura 5A muestra la concentración de hGH y de factor-1 de crecimiento similar a insulina (IGF-1) en el suero de la misma vaca transgénica, y la masa diaria del hGH producida en la leche en la misma vaca transgénica. La concentración del hGH en el suero de la vaca transgénica y la masa diaria del hGH producido en la leche de la vaca transgénica son graficados juntos en la figura 5B. En la figura 5C, se grafican juntos los perfiles de tiempo de la concentraciones de suero de la vaca transgénica de hGH IGF-1.

[0030] La figura 6A y 6B, muestran la concentración de suero de hGH y del factor-1 de crecimiento similar a insulina (IGF-1) en dos terneros transgénicos obtenidos al sub clonar una vaca que es transgénica para la producción de hGH en su leche. En la figuras 6C y CD, los perfiles de tiempo de las concentraciones de suero de hGH IGF-1 son graficados juntos para cada uno de estos terneros transgénicos.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0031] La invención se relaciona con un mamífero transgénico no humano caracterizado por la producción de niveles inesperadamente altos de una hormona de crecimiento recombinante en su leche. Este mamífero puede ser, pero no está limitado a, un animal de las especies bovinas. Otras especies de mamíferos transgénicos pueden ser, pero no están limitados a, especies porcinas, especies bovinas, especies caprinas o especies de roedores.

[0032] La hormona de crecimiento recombinante puede ser, pero no está limitada a, hormona de crecimiento humano. Esta molécula, también conocida como somatotropina, es una proteína que consiste de 191 aminoácidos, con un peso molecular de aproximadamente 22 kD. Es esencial para el crecimiento lineal y sus aplicaciones también se establecen.

[0033] La invención también se relaciona con un mamífero transgénico, caracterizado por el hecho de que la hormona de crecimiento recombinante producida en su leche autoestimula las glándulas mamarias del animal con el fin de producir más leche que contiene dicha hormona.

[0034] La invención también se relaciona con un plásmido que comprende un gen que codifica una proteína de interés operablemente ligado a un promotor de beta caseína y a un gen de β lactamasa. Esta proteína de interés puede ser, pero no está limitada a, hormona de crecimiento humano. Este plásmido puede ser de pR β hGH.

[0035] En una modalidad adicional, el plásmido incluye adicionalmente un gen de resistencia a la neomicina para la selección de células resistentes a geneticina. Un ejemplo de tales plásmidos es el pRNeo.

[0036] En una modalidad adicional, el plásmido incluye un gen que codifica para una proteína fluorescente verde tal como GFP, que está bajo control del promotor de citomegalovirus (CMV). Un ejemplo de tal plásmido es el pRNeoGreen.

[0037] La invención se relaciona además con un plásmido tal como aquellos descritos anteriormente, que ha sido linealizado mediante digestión de restricción. En particular, se utiliza enzima de restricción ApaI y el gen de β lactamasa se escinde.

[0038] El procedimiento de depósito bajo el tratado de Budapest de los plásmidos mencionados anteriormente está en camino. El nombre y dirección del depósito es DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, 38124 Braunschweig, Alemania. El número de acceso correspondiente se suministrará en su debido momento.

[0039] La invención se relaciona además con el plásmido construido sobre la base de un plásmido que con tiene gen de Neo resistencia, en el cual la región

promotora de beta caseína más corta modificada se insertó corriente arriba de una región que codifica hGH, tal como pVE β casGH. Un fragmento lineal se puede obtener del plásmido pVE β casGH al extinguir el gen de beta lactamasa.

[0040] La invención se relaciona además con un método para la transfección de construcciones genéticas que utilizan una combinación de lípidos catiónicos para utilización de liposoma.

[0041] Los métodos de selección de células resistentes a neomicina en medios apropiados también se describe, como son los métodos de seleccionar células transgénicas fluorescentes verdes. Estas células son escogidas cuidadosamente, con el fin de evitar el daño celular.

[0042] La invención también se relaciona con un método de transferencia nuclear de células disminuidas en G₀, o en momentos diferentes del ciclo celular, en oocitos de bovino enucleados.

[0043] La invención se relaciona con un método de transferencia de embriones transgénicos en útero de vaca estimulado con hormona.

[0044] De acuerdo con la invención, se describe un método para determinar los parámetros de salud del animal. Los análisis se desarrollan tanto en el suero del animal como en la leche con el fin de determinar tales parámetros.

[0045] La invención se relaciona además con un método para hacer un mamífero transgénico no humano que comprende obtener un gen que codifica una hormona de crecimiento, clonar el gen en un plásmido por medio del cual el gen está

operablemente ligado a un promotor que dirigirá la expresión del gen en las células mamarias, que resultan en un plásmido de expresión, que transfectan las células somáticas con el plásmido de expresión de tal forma que el plásmido de expresión de tal forma que el plásmido se incorpora en el genoma de las células, lo que resulta en células somáticas transgénicas, enucleando un oocito maduro, lo que resulta en un oocito enucleado, fusionando una célula somática transgénica con el oocito enucleado dando como resultado un embrión monocélula, implantando el embrión en el útero de un mamífero receptor, y monitoreando la gestación a través del crecimiento del mamífero transgénico.

[0046] La invención además se relaciona con un método para hacer un mamífero transgénico no humano que comprende extraer células somáticas de un mamífero hembra que es transgénico para la producción de una hormona de crecimiento recombinante en su leche, opcionalmente fibroblastos, enucleando un oocito maduro, dando como resultado un oocito enucleado, fusionado unas células somática transgénica con el oocito enucleado dando como resultado un embrión monocélula, implantando el embrión en el útero de un mamífero receptor, y monitoreando la gestación a través del nacimiento del mamífero transgénico.

[0047]. La invención se relaciona además con un método para elaborar un mamífero transgénico no humano que comprende super ovular un mamífero hembra no humano que es transgénico para la producción de una hormona de crecimiento recombinante en su leche, e inseminando artificialmente el mamífero con el semen obtenido de un macho de un mamífero transgénico macho no humano, para producir embriones, recolectando los embriones, implantando los embriones en el útero de un mamífero receptor, monitoreando la gestación a través del nacimiento del mamífero transgénico.

[0048] La invención se relaciona además con un método para elaborar un mamífero transgénico no humano que comprende super ovular un mamífero hembra no humano que es transgénico para la producción de una hormona de crecimiento recombinante en su leche, inseminando artificialmente el mamífero con semen obtenido de un mamífero hembra no humano que es transgénico par la producción de dicha hormona de crecimiento recombinante, para producir embriones, recolectando los embriones, implantando los embriones en el útero de un mamífero receptor, y monitoreando la gestación a través del nacimiento del mamífero transgénico.

[0049] La invención se relaciona además con un método para hacer un mamífero transgénico no humano que comprende super ovular un mamífero hembra y un transgénico no humano, inseminando artificialmente el mamífero con semen obtenido de un mamífero no humano macho que es transgénico para la producción de una hormona de crecimiento recombinante, para producir embriones, recolectando los embriones, implantando los embriones en el útero de un mamífero receptor, y monitoreando la gestación a través del nacimiento del mamífero transgénico.

[0050] La hormona de crecimiento recombinante puede ser, pero no está limitada a, la hormona de crecimiento humano. El mamífero transgénico no humano puede ser, pero no está limitado a, un animal de las especies bovinas.

[0051] La invención se relaciona además con un método para producir una proteína que comprende hacer un mamífero transgénico no humano que produce una proteína de interés y rendimientos inesperadamente altos en su leche,

obteniendo la leche del mamífero transgénico no humano, y purificando la proteína de interés de la leche.

[0052] La invención también se relaciona con un método para producir una proteína de interés en un mamífero transgénico no humano hecho por un proceso que pretende obtener un gen que codifica dicha proteína de interés, clonar el gen en un plásmido por medio del cual el gen está operablemente ligado a un promotor que dirigirá la expresión del gen en las células mamarias, dando como resultado un plásmido de expresión, transfectando algunas células, opcionalmente fibroblastos, con el plásmido de tal forma que el plásmido se incorpora en el genoma de dichas células somáticas, dando como resultado en células somáticas transgénicas, enucleando un oocito maduro, dando como resultado un oocito enucleado fusionando una célula somática transgénica con un oocito enucleado dando como resultado un embrión monocélula, implantando el embrión en el útero del mamífero receptor, y monitoreando la gestación a través del nacimiento del mamífero transgénico.

[0053] La invención además también se relaciona con un método para producir una proteína de interés en un mamífero transgénico no humano hecho por un proceso que comprende extraer células somáticas de un mamífero hembra que es transgénico para la producción de dicha proteína de interés en su leche, opcionalmente fibroblastos, y nucleando un oocito maduro, dando como resultado un oocito enucleado, fusionando una célula somática transgénica con el oocito enucleado dando como resultado un embrión monocélula implantando el embrión en el útero de un mamífero receptor, y monitoreando la gestación a través del nacimiento del mamífero transgénico.

[0054] La invención también se relaciona con un método para producir una proteína de interés en un mamífero transgénico no humano hecho por un proceso que comprende superovular un mamífero hembra no humano que es transgénico para la producción de dicha proteína de interés en su leche, inseminando artificialmente el mamífero con semen obtenido de un mamífero no transgénico no humano, para producir embriones, recolectando los embriones, implantando los embriones en el útero de un mamífero receptor, y monitoreando la gestación a través del nacimiento del mamífero transgénico.

[0055] La invención también se relaciona con un método para producir una proteína de interés en un mamífero transgénico no humano hecho por un proceso que comprende superovular un mamífero hembra no humano que es transgénico para la producción de dicha proteína de interés en su leche, inseminar artificialmente el mamífero con semen obtenido de un mamífero hembra no humano que es transgénico para la producción de dicha proteína de interés, producir embriones, recolectar los embriones, implantar los embriones en útero de un mamífero receptor, y monitorear la gestación a través del nacimiento del mamífero transgénico.

[0056] La invención también se relaciona con un método para producir una proteína de interés en un mamífero transgénico no humano hecho mediante un proceso que comprende superovular un mamífero no transgénico hembra no humano, inseminar artificialmente el mamífero con semen obtenido de un mamífero macho no humano que es transgénico para la producción de dicha proteína de interés, producir embriones, recolectar los embriones, e implantar los embriones en el útero de un mamífero receptor, y monitorear la gestación a través del nacimiento del mamífero transgénico.

[0057] Los mamíferos transgénicos caracterizados por la producción de niveles inesperadamente altos de una proteína de interés en su leche, pueden ser, pero no están limitados a, animales de las especies bovinas. Otras especies de mamíferos transgénicos pueden ser, pero no están limitados a, especies porcinas, especies ovinas, especies caprinas o especies de roedores. La proteína de interés puede ser, pero no está limitada a, hormona del crecimiento humano.

[0058] La invención se relaciona además con un mamífero transgénico no humano de las especies bovinas que produce hormona del crecimiento humano recombinante en su leche, cuyo genoma comprende un plásmido integrado, dicho plásmido comprende el gen de la hormona de crecimiento humano y un promotor de beta caseína que dirige la expresión de dicho gen en las células mamarias del mamífero.

[0059] La invención se relaciona además con un mamífero transgénico que produce hGH en niveles inesperadamente altos, aunque no muestra el crecimiento físico esperado con tan alto nivel de producción de hGH. En razón a que los bovinos transgénicos se afectan por la presencia de las hormonas de crecimiento humano, se esperaba que los animales crecieran más allá de las proporciones de crecimiento no transgénicos, y sufrieran de condiciones tales como diabetes mellitus, hipertensión, riesgo incrementado de enfermedad cardiovascular y agrandamiento de los órganos del cuerpo, incluyendo el hígado, vaso, riñones y corazón. Tales altos niveles de hGH deben hacer el animal teóricamente, no viable. Sin embargo, este no es el caso. Un mamífero, tal como una vaca con niveles alarmantemente altos de una hormona extraña en su sangre, pero que es

perfectamente saludable y tiene una productividad sorprendente de una proteína recombinante constituye una contribución inesperada e innovadora.

[0060] La hormona de crecimiento humano recombinante de la invención se produce a niveles inesperadamente altos. El nivel de la hormona de crecimiento humano producida es mayor de aproximadamente 1.0 g/l de leche. El nivel de hGH puede ser mayor de aproximadamente 2.0 g/L de leche. El nivel de hGH producido también puede ser mayor de aproximadamente 3.0 g/L de leche. En otra modalidad, el nivel de hGH producido puede ser mayor de aproximadamente 4.0 g/L de leche. En aún otra modalidad, el nivel de hGH producido puede ser mayor de aproximadamente 5.0 g/L de leche. En una modalidad adicional, el nivel de hGH producido puede ser mayor de aproximadamente 6.0 g/L de leche. En aún una modalidad adicional, el nivel de hGH producido es aproximadamente 1.0 g/L de leche a aproximadamente 7.0 g/L de leche. En una modalidad adicional, el nivel de hGH producido es aproximadamente 2.0 g/L de leche aproximadamente 6.0 g/L de leche. En aún otra modalidad, el nivel de hGH producidos es de aproximadamente 2.0 aproximadamente 5.0 g/L de leche.

[0061] Adicionalmente, la invención se relaciona con un método para purificar una hormona de crecimiento recombinante proveniente de la leche de un mamífero transgénico, así como también ensayos de dicha hormona. Los métodos repurificación pueden incluir cromatografía y etapas de concentración. Se pueden utilizar diferentes tipos de cromatografía que incluyen cromatografía de intercambio de ión, cromatografía de fase inversa, cromatografía de exclusión molecular o cromatografía de afinidad. La cromatografía de intercambio de ión puede ser cromatografía de intercambio de anión. La cromatografía de afinidad

puede ser cromatografía de inmutioafinidad. Además, se pueden desarrollar etapas de cromatografía múltiples.

[0062] La invención se relaciona además con un método para purificar una hormona de crecimiento recombinante proveniente de la leche de un mamífero transgénico no humano que produce una hormona de crecimiento recombinante que comprende clarificar la leche de un mamífero transgénico no humano, dando como resultado una leche clarificada, y sometiendo la leche clarificada a cromatografía, dando como resultado una hormona de crecimiento humano purificada.

[0063] La invención se relaciona además con un método para purificar una hormona de crecimiento recombinante proveniente de la leche de un mamífero transgénico no humano que produce una hormona de crecimiento recombinante que comprende clarificar la leche de un mamífero transgénico no humano dando como resultado una leche clarificada, sometiendo la leche clarificada a una cromatografía de intercambio de anión derecho expandido, dando como resultado un material cromatografiado de intercambio de anión, sometiendo el material cromatografiado de intercambio de anión a cromatografía de fase inversa, dando como resultado un material cromatografiado de fase inversa, sometiendo el material cromatografiado de fase inversa a una cromatografía de intercambio de anión, dando como resultado un material cromatografiado de intercambio de anión, sometiendo el material cromatografiado de intercambio de anión a una cromatografía de exclusión molecular, dando como resultado un material cromatografiado de exclusión molecular, concentrado el material cromatografiado de exclusión molecular, dando como resultado un material concentrado, y

sometiendo el material concentrado a una cromatografía de exclusión molecular, dando como resultado una hormona de crecimiento recombinante.

[0064] La invención también se relaciona con un método para purificar una hormona de crecimiento recombinante proveniente de la leche de un mamífero transgénico no humano que produce una hormona de crecimiento recombinante que comprende clarificar la leche obtenida de un mamífero transgénico, dando como resultado leche clarificada sometiendo la leche clarificada, sometiendo la leche clarificada a cromatografía de inmutafinidad, dando como resultado un material, cromatografiado de inmutafinidad, sometiendo el material cromatografiado de inmutafinidad a cromatografía de fase inversa, dando como resultado un material cromatografiado de fase inversa, sometiendo el material cromatografiado de fase inversa a una cromatografía de intercambio aniónico, dando como resultado un material cromatografiado de intercambio aniónico, sometiendo el material cromatografiado de intercambio aniónico a una cromatografía de exclusión molecular, dando como resultado un material cromatografiado de exclusión molecular, sometiendo el material cromatografiado de exclusión molecular a concentración, dando como resultado un material concentrado, y sometiendo el material concentrado a una cromatografía de exclusión molecular dando como resultado una hormona de crecimiento recombinante pura.

[0065] La hormona de crecimiento recombinante de los métodos de purificación descritos anteriormente pueden ser, pero no están limitados a, hormona de crecimiento humano. El mamífero transgénico puede ser, pero no está limitado a, un mamífero de las especies bovinas.

[0066] Los siguientes ejemplos son ilustrativos, pero no limitantes, del método y las composiciones de la presente invención. Otras modificaciones y adaptaciones adecuadas de la variedad de condiciones y parámetros normalmente encontrados en la producción enzimática de químicos y procedimientos de purificación de proteína que son obvios a aquellos expertos en la técnica están dentro del espíritu y alcance de la invención.

EJEMPLO 1

Construcción de Plásmidos de Expresión

[0067] Nosotros generamos una construcción que lleva una porción grande de promotor de gen de beta caseína de bovino, que incluye un fragmento corto de la región del gen de beta caseína 5' no codificante, fusionado con la secuencia codificante del gen de hormona de crecimiento humano. La región de beta caseína empleada en las diferentes construcciones se disminuyó de 3.8 kbp a aproximadamente 1.3 kbp. El gen hGH comprende aproximadamente 2.2 kbp dependiendo de si está incluida la señal poliA intrínseca.

[0068] El casete de expresión se acomodó en el poliligador de un vector de clonación usual del tipo pUC o pBS

[0069] Este promotor asegura que el tejido específico y la expresión desarrolladoramente regulada de genes bajo su control, como la beta caseína, y el hGH heterólogo en este caso.

[0070] El plasmado más representativo en pR β hGH que lleva el promotor de beta caseína de bovino de longitud completa, fusionado a la secuencia de codificación del gen de hormona de crecimiento humano.

[0071] Otras construcciones descritas son principalmente derivadas de aquella original, como se describió para mejorar la selección de célula transfectada o la eficiencia de integración de ADN en el genoma de célula de bovino.

[0072] En el primer periodo, la co-transfección con un plásmido que contiene gen de resistencia a la geneticina se desarrolló para ayudar a la selección, pero luego, fueron utilizadas otras construcciones, que llevan el gen NPT para resistencia a la neomicina en el mismo vector que contiene el casete de expresión hGH. Un ejemplo de tal plásmido es el pRNeo.

[0073] Se obtuvo otro plásmido para la expresión constitutiva de la proteína fluorescente verde, que incluye un promotor CMV, un mejorador de origen vegetal (alfalfa), y el gen de proteína fluorescente verde proveniente de la medusa *A. victoria*. Un ejemplo de tal plásmido es el pRNeoGreen.

[0074] Además, se generó otro plásmido. Este se construyó sobre la base de un plásmido que contiene un gen de Neo resistencia, en el cual se insertó una región promotora de beta caseína más corta modificada corriente arriba de una región codificante hGH. Este plásmido es el pVE β cashGH.

[0075] Se generaron otras construcciones en las cuales la región de β lactamasa se escindió mediante una restricción ApaI y el fragmento lineal que contiene el

caseta de expresión completo se purificó después de electroforesis con gel de agarosa, y extracción de gel.

[0076] Las construcciones fueron analizadas mediante enzimas de restricción y secuenciación de ADN, y su capacidad para conducir la expresión de hGH fue previamente ensayada en una línea celular de glándula mamaria mediante reconocimiento de anticuerpo fluorescente.

[0077] La preparación del plásmido pVE β cashGH se describirá en detalle en un ejemplo de esta parte que involucra las construcciones genéticas.

[0078] El objetivo de esta construcción es suministrar la extensión mínima de la región promotora de beta caseína para dirigir la transcripción regulada específica del gen hGh fusionado inmediatamente corriente abajo, junto con una señal poliA en un organismo huésped.

[0079] El uso del pVEX como el vector original permite el uso de gen de resistencia a la neomicina mediante un promotor tk ya presente en este plásmido. El promotor SV40 temprano que comprende 554 bp se eliminó mediante restricción con *Stu*I y *Nde*I, y el último sitio llenado con Klenow y auto ligación del vector resultante.

[0080] El promotor corto de beta caseína se obtuvo después de amplificación PCR de un fragmento de 1.3 kbp de la región promotora de gen original de 3.8 kbp, al utilizar los siguientes oligos como iniciadores

PB1 5' TCTACTCGAGGATCATCTATCTGTCCCAAAG (ID de SEC No.: 1)

Y

PB2 5' CTAGGATCCAATGATCTGATTTTGTGG (ID de SEC No.: 2)

Este fragmento comprende 1230 bp del promotor canónico más 49 bp del primer exón no codificante del gen de beta caseína.

[0081] El fragmento del gen hGH se obtuvo mediante técnicas PCR sobre el clon hGH genómico bovino original utilizando los siguientes oligos como iniciadores:

PB4 5' CTAGGATCCATGGCTACAGGTAAGCGCC (ID de SEC No.: 3)

Y

GHTE 5' ATGCTGTGTCTGGACGTCCT (ID de SEC No.: 4)

El fragmento promotor de beta caseína fue truncado con una enzima Klenow e insertado en el sitio de pVEX llenado en BamHI. Después de seleccionar los clones recombinantes, escogimos una cierta dirección apropiada para utilizar el sitio HindIII localizado corriente abajo en el pVEX para insertar la región codificante Hgh.

[0082] Para este objetivo, el fragmento hGH fue también truncado y el sitio HindIII del plásmido se llenó también. Los clones fueron seleccionados los cuales contenían un promotor de beta caseína y hGH propiamente fusionado para expresar hGH solamente bajo el control d este promotor.

[0083] El tamaño de este plásmido es aproximadamente 8.5 kbp.

Transfección de células somáticas

[0084] Los plásmidos pR β hGH (junto con otro plásmidos con gen de resistencia genética), pRNeo, pRNeoGreen, o pVE β cashGH fueron entonces utilizados para transfectar un cultivo primario de células somáticas, utilizando fosfato de calcio o un método de liposoma. Los fibroblastos de ternero fetal fueron empleados generalmente para ser transfectados.

[0085] Las células transfectadas fueron seleccionadas agregando genética al cultivo. Después de un periodo de 2 a 8 semanas, las células que serán resistentes a la genética fueron adecuadas para ser utilizadas como células donantes para obtener clones transgénicos. Las células seleccionadas transfectadas fueron analizadas mediante PCR para contener el casete de expresión, para asegurar la transferencia de núcleos apropiada para generar embriones transgénicos.

EJEMPLO 2**Enucleación de oocito y transferencia nuclear de metafase en oocitos enucleados maduros****Recolección y maduración in vitro de oocitos de bovino**

[0086] Los oocitos de bovino fueron aspirados de ovarios de matadero y madurados en TCM-199 + 5% FCS a 39°C durante 24 hs. El medio de maduración se equilibro con CO₂ mediante al menos dos horas antes de uso. Los oocitos

maduros fueron desnudados mediante mezclado durante 2 minutos en TL-HEPES caliente con 1 mg/ml de hialuronidasa de testículo de bovino.

Transferencia Nuclear con Células Cumulus

Enucleación

[0087] Los oocitos fueron mecánicamente enucleados utilizando micromanipuladores hidráulicos Narishige y microscopía Nikon Diaphot. La enucleación se desarrolló con pipetas de 20 μ m biseladas y punteadas. Los oocitos fueron previamente teñidos con 5 μ g/ml de bisbenzimidina (Hoechst 33342') durante 20 minutos. Las metafases fueron enucleadas mediante visualización de los cromosomas teñidos bajo luz ultravioleta. Los cromosomas de la metafase fueron evaluados después de aspiración dentro de la pipeta. Una célula somática transgénica fue transferida en el espacio de perivitelina y estrechamente opuestos al oocito enucleado.

Fusión

[0088] Una célula somática transgénica y un oocito enucleado fueron manualmente lineados en la cámara de fusión de tal forma que las membranas al ser fusionadas estaban paralelas a los electrodos. Esto fue hecho utilizando una pipeta de manejo de embriones de vidrio.

Fusión Mediante Medios Eléctricos

[0089] La fusión fue desarrollada utilizando un pulso eléctrico de 180 voltios/cm durante 15 μ s (BTX Electro Cell Manipulator 200)² y monitoreado con un analizador de pulso gráfico BTX Optimizer-Graphic Pulse analyzer. La cámara para pulsar los embriones consistía de dos electrodos de alambre de acero inoxidable de 0.5 mm montados 0.5 mm de separación sobre láminas de vidrio de microscopio. Los presuntos cigotos fueron monitoreados por fusión, lisis, y fragmentación

Evaluación del Desarrollo de Competencia

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

²BTX Inc., San Diego, Ca, USA

[0090] Los cigotos fueron evaluados a 48 horas después de la fertilización para clivar y 7 a 9 días para el desarrollo de mórula o blastocistos.

EJEMPLO 3

Cultivo de Células y Embriones

[0091] Diferentes células donantes, sistemas de cultivo y tratamientos de los sectores de oocitos fueron ensayados en un objetivo experimental al simplificar procedimientos e incrementar la proporción de supervivencia de embriones en un programa de clonación de bovino. Fueron utilizados tres sistemas de cultivos para embriones reconstruidos cuando los fibroblastos adultos fueron utilizados como células donantes: TCM-199 + 5% FCS, Menezo + 5% FCS (con células Vero y

cocultivo) y SOF sin cocultivo pero con concentraciones O_2 inferiores. El medio SOF también fue utilizado para cultivar embriones reconstruidos cuando las células donantes fueron fibroblastos fetales modificados genética y no genéticamente. Finalmente, cuando los fibroblastos fetales genéticamente modificados fueron utilizados como células donantes, los oocitos receptores fueron previamente tratados con roscovitina (R), para suspender meiosis y optimizar la usabilidad del receptor. Los oocitos fueron aspirados de ovarios de matadero y madurados en TCM-199 + 5% FCS a $39^{\circ}C$ durante 24 horas. Para el grupo tratado R, los oocitos fueron incubados con $25\mu M$ R en TCM 199 + 5% FCS durante 24 horas a $39^{\circ}C$ antes de la maduración. Los oocitos maduros fueron desnudados mediante un mezclado durante 3 minutos en TL HEPES con 1 mg/ml de hialuronidasa de testículo de bovino. Las metafases fueron evaluadas y los oocitos fueron enucleados mediante visualización con Hoechst 33342 ($5\mu g/ml$) bajo luz UV (< 6 segundos). Los fibroblastos adultos provenientes de Angus y fibroblastos fetales de un feto hembra Jersey de 45 días fueron utilizados como células donantes. La transfección con construcciones que contienen gen con resistencia a la neomicina fueron desarrollados utilizando liposomas. Después de la selección con geneticina durante 10-15 días, las células donantes en las etapas G_0/G_1 fueron fusionadas hasta oocitos enucleados mediante un pulso eléctrico. Después de tres horas, se indujo la activación mediante incubación en TL-HEPES con $5\mu M$ de ionomicina durante 4 min y 2 mM de 8-DMAP durante 3 horas. Los oocitos fueron entonces lavados con TL-HEPES y cocultivados con TCM 199 + 5% FCS + 10 g/l de albúmina o Menezo + 2% FCS ambos con células VERO, o en un medio SOF y atmósfera de 5% de CO_2 + 5% de O_2 + 90% de N_2 . De manera general fueron transferidos 2 blastocistos no quirúrgicamente por vaca receptora, y se determinaron los embarazos en los días 30-35 mediante ultrasonografía. El clivage (48 horas), desarrollo o blastocistos (día 7 a 9) se registraron y analizaron

mediante Chi cuadrado. Las proporciones de clivage y desarrollo a blastocistos fueron mayores cuando los embriones fueron cultivados en SOF. Sin embargo, no se observaron diferencias en las proporciones de embarazo debido a las diferentes condiciones de cultivo o alas fuentes de células donantes. La suspensión de maduración meyiótica durante 24 horas no compromete la competencia de desarrollo de los oocitos receptores. Por lo tanto, el tratamiento con roscovitina se podría utilizar para incrementar la disponibilidad de oocitos para procedimientos NT. Ver Tabla 1 adelante

Tabla 1

Tratamiento	n	Clivage (%)	Blastocistos (%)	Receptor implantado	Gestación (%)
Fibroblasto de Adulto TC199+VERO	294	156(53.9) ^a	22(7.5) ^a	13	S(38.4)
Fibroblasto de adulto Menezo+VERO	324	236(72.3) ^{bc}	29(8.9) ^a	17	S(29.4)
Fibroblasto de adulto SOF	108	81(75.0) ^{bc}	24(22.2) ^b	11	S(45.4)
Fibroblasto fetal SOF	197	122(61.9) ^{ab}	33(16.7) ^{a b}	16	S(31.6)
Fibroblasto fetal transfectado SOF	646	476(73.7) ^{bc}	128(19.8) ^b	56	S(44.6)
Fibroblasto fetal transfectado SOF-R	228	191(83.7) ^c	51(22.3) ^b	30	S(53.3)
Total	1797	1262(70.2)	287(15.9)	143	61(44.5)

Porcentajes con columnas con diferentes superescritos son diferentes (P<0.05)

[0092] A las vacas implantadas se les permitió pasar normalmente la gestación hasta su parto natural. Eventualmente pudo ser utilizada una aproximación quirúrgica (Cesárea) para la entrega. Los recién nacidos son alimentados con calostro rico en Ig durante las primeras 48 horas, y luego sintéticos, y finalmente son utilizados alimentos naturales (todos los cuales libres de los compuestos origen del animal).

EJEMPLO 4

Ensayos Desarrollados Sobre Terneros Transgénicos y Proteína Recombinante Producida.

[0093] En el ejemplo presente nosotros presentamos una descripción completa de los ensayos desarrollados sobre un ternero transgénico particular, que se obtuvo como resultado de los procedimientos descritos en los Ejemplos 1 a 3, y sobre la proteína recombinante producida por esta. Sin embargo, debe ser claro que se desarrolló el mismo conjunto de ensayos sobre animales que son nacidos como consecuencia de otros métodos para obtener terneros transgénicos, tales como aquellos que se describirán en el Ejemplo 5 y 6 adelante.

[0094] Se probó por medio de reacciones PCR desarrolladas sobre ADN purificado de células sanguíneas blancas de ternero, utilizando ADN de terneros jersey no transgénicos como el control negativo, que el promotor de beta caseína de bovino y el gen que codifica hGH están incluidos en el genoma de las células de terneros transgénicos. Ello se pueden encontrar juntos como un fragmento de ADN único diferente al gen de beta caseína homólogo al animal.

[0095] Se corroboró, al utilizar el secuenciador automático de farmacia que la secuencia de gen insertada corresponde 100% al gen que codifica hGH. Este incluye los intrones, la señal de secreción y el terminador. El promotor de beta caseína de bovino que controla esa misma expresión de gen hGH en nuestro ternero también fue secuenciado. Todos aquellos elementos coinciden exactamente con la secuencia teórica esperada proveniente de la construcción genética utilizada para transformar las células por fuera de las cuales fueron generados los clones.

[0096] Una vez conocida la exactitud de la fase genética del experimento, pasamos a probar si la proteína recombinante producida es aquella esperada y coincide con cada una de las características físicas y químicas con el hGH natural.

[0097] Para este propósito, nosotros habíamos obtenido leche del ternero, en razón a que el promotor de beta caseína permite la expresión de la proteína recombinante solamente en las glándulas mamarias, cuando el animal está en su momento de producción de leche.

[0098] El ternero transgénico fue entonces inducido mediante un tratamiento con hormona para producir leche en el momento en que él completó su décimo mes. En ese momento el ternero pesó 240 kg (aproximadamente 530 lbs).

[0100] La primera fase de dicho tratamiento involucró la administración combinada mediante ruta sub cutánea, de estrógenos (benzoato de estradiol, Histeren®, Instituto Rosenbusch) y progestanos (acetato de medroxiprogesterona, Pronal®, Aton), que comprende 5 aplicaciones sucesivas de cada droga, una dosis de 0.1

mg/kg y 0.25 mg/kg, respectivamente, cada 458 horas (es decir en los días 1, 3, 5, 7, y 9, asumiendo que el tratamiento comienza en el día 1).

[0101] La segunda fase comprendió la administración, mediante ruta subcutánea, de dexametasona (Decadron, Sidus) y oxitocina (Orastin®, Hoechst Marion Roussel); una cantidad total de 20 mg del anterior es inyectada durante un periodo que comprende los días 18 a 20 (un tercio de dicha masa total cada día), y 3 aplicaciones de 50 IU del último, en los días 21 a 23.

[0102] La información anterior se resume en la Tabla 2:

Tabla 2

Día	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	(.)	17	18	19	20	21	22	23
Histeron (Mg/kg)	*0.10		0.10		0.10		0.10		0.10									
Pronel (mg/kg)	0.25		0.25		0.25		0.25		0.25									
Decadron (mg)													6.66*	6.66*	6.66*			
Orasthin (IU)																50	50	50

*Aproximadamente un tercio de la masa total (20 mg) se administró cada día.

[0103] Como se esperaba, la vaca comenzó produciendo calostro el día después de que había terminado el tratamiento y luego, progresivamente la calidad del fluido producido se volvió leche. El fluido recolectado fue adecuadamente almacenado y completamente analizado.

[0104] Varios ensayos, cuyos resultados son mostrados en las figuras 1-4, fueron desarrollados sobre el calostro y la leche (por simplicidad, tanto el calostro como la leche se denominarán en lo sucesivo como "leche", excepto cuando se deba hacer

distinción). Primero, se midió el volumen de la leche recolectada. La productividad de la leche inicial (primeros 5 días de lactancia) fue aproximadamente 1,650 ml/día. Durante el primer mes productivo, fueron desarrolladas dos ordeños manuales por día, uno en la mañana y uno en la tarde (la contribución de cada ubre al volumen final puede ser notada); mientras del segundo mes en adelante, en la medida en que la producción de leche comenzó a incrementarse, fueron desarrollados tres ordeños por día (en la mañana, al medio día, y por la tarde). Los volúmenes diarios se incrementaron de una manera más o menos continua, hasta alcanzar cerca de 100 ml tres meses después del primer ordeño. Información detallada con relación a este tópico (Figura 1A) se puede visualizar en la curva del volumen de leche diaria versus fecha (Figura 1B).

[0105] En paralelo con las mediciones del volumen de leche, fueron desarrollados ensayos microbiológicos sobre la leche, cuyos resultados (Figura 2A) son mostrados en las gráficas correspondientes de CFU (Unidades formadoras de colonias) por ml vs fecha y (Figuras 2B-2C).

[0106] La actividad biológica (del hGH) también se evaluó mediante ensayo y actividad biológica in vitro en cultivos de células NB2 (Figuras 3A-3B). Se probó que la actividad biológica del hGH producido en la leche del heifer, está dentro del rango de error del método, en los valores normales para el hGH natural humano. Más aún, la leche obtenida fue estudiada mediante Western blot, en el cual la banda principal, correspondiente al hGH intacto fue detectada. Bandas menores adicionales que corresponden a variantes y agregados clivados también fueron encontradas, como se esperaba en estos sistemas productivos.

[0107] Con la información relacionada con la actividad biológica y los volúmenes diarios, fue posible calcular la producción diaria de hGH utilizando la ecuación 1, cuando el mhGH es la masa producida diaria de hGH en miligramos; BA, la actividad biológica en unidades internacionales; SA la actividad específica del hGH (3 IU/mg); y V, el volumen diario de leche recolectada. Los datos son mostrados en la figura 4A. La gráfica de la masa diaria de hGH es mostrada en la figura 4B. Con el fin de establecer una correlación visual entre la masa diaria del hGH y el volumen diario de leche, el último también fue graficado en la figura 4B.

$$m_{hGH} = \frac{BA}{SA \times V} \quad (\text{Ec.1})$$

[0108] Como se puede observar en esta información, la masa diaria de hGH en la leche y el volumen diario de la leche tienden a aumentar en la medida en que la vaca se desarrolla (no obstante, la anterior en mayor proporción) lo cual constituye una tendencia ascendente en la productividad de hormona recombinante (gramos de hGH por litro de leche). Se puede notar que esta productividad paso de aproximadamente 2 g de hGH por litro (primer ordeño), cuando el producto fue calostro, a una cantidad promedio de 5 g hGH por litro de leche desde el segundo mes de lactancia en adelante. Así, un rendimiento inesperadamente alto de hormona de crecimiento humano se obtuvo en la medida en que se incrementó la productividad, de una manera más o menos continua en la medida en que la calidad del fluido se tornó de calostro a leche.

[0109] Aunque actualmente la masa de hGH producida por día es de hecho sorprendente, se debe notar que, en la medida en que la vaca no ha crecido completamente, la tendencia hacia arriba en la masa de la proteína recombinante producida por día debe continuar en el futuro, hasta que se alcance un máximo.

[0110] En paralelo con los ensayos desarrollados, sobre la leche, un diferente conjunto de ensayos fue llevado a cabo en el suero de la vaca, cuyos resultados son mostrados en las Figuras 5A-5C. Primero, fueron desarrolladas mediciones en la concentración del hGH del suero de la vaca. Los resultados (Figura 5A) son graficados en una gráfica junto con la masa diaria de hGH en la leche, para permitir una comparación de ambas magnitudes (Figura 5B).

[0111] El rango de referencia para GH en el suero (en humano) es 0.06 – 5 ng/ml. Asumiendo un rango similar hipotético para los bovinos, se debe notar que, excepto para el inicio, la curva completa de hGH en el suero de la vaca transgénica versus la fecha que está bien sobre el límite de dicho rango. No obstante este hecho, se debe tener en cuenta que, aunque el hGH de la hormona de bovino correspondiente (bGH) son muy similares en relación con su secuencia de aminoácido y la estructura 3D, el anterior, aunque completamente funcional, no es completamente activo en el ganado.

[0112] Por lo tanto, con el fin de evaluar el ritmo potencial para la salud de la vaca debido a estos altos niveles de hGH en su suero, se desarrollaron mediciones de concentración de suero de IGF-1 (Factor de Crecimiento 1 similar a insulina, también conocido como Somatomedin C) en paralelo (figura 5A). La hormona de crecimiento desarrolla su función principalmente a través del IGF-1, lo que se hace en el hígado. En razón a que el IGF-1 media muchas de las divisiones celulares in vivo y los efectos metabólicos de la hormona de crecimiento, y la evaluación del IGF-1 es una herramienta de diagnóstico valiosa para la evaluación indirecta de sospechados desordenes hormona del crecimiento. Así, el IGF-1 representa un indicador dependiente de la hormona de crecimiento biodisponible. Los resultados

de estos análisis son mostrados en la Figura 5C, junto con aquellas correspondientes al hGH para permitir la visualización simultánea de ambas magnitudes.

[0113] Más aún, el IGF-1 y el hGH fueron medidos en el suero de un grupo de vacas no transgénicas con el fin de tener un grupo de control y así establecer una comparación con los datos que corresponden a la vaca transgénica. Los promedios de las mediciones de ambas proteínas del grupo no transgénico y la vaca transgénica son mostrados en la Tabla 3 adelante.

Tabla 3

Promedio		
	[IGF-1] en suero	[hGH] en suero
No transgénico	123.40	0.28
Transgénico	484.02	656.98

[0114] Es importante notar que la concentración de suero promedio del hGH y el grupo no transgénico descansa en un rango de referencia hipotético mientras que en el promedio para la vaca transgénica está bien por encima del límite superior de dicho rango. Además, es indudable que el nivel promedio el IGF-1 en el suero del animal transgénico es categóricamente mayor que en aquel correspondiente a las vacas no transgénicas, que constituye una diferencia fundamental.

[0115] Por lo tanto, aunque la alta concentración de hGH en el suero de la vaca transgénica (que en los humanos es conocido por originar desordenes de consecuencias severas, tales como diabetes mellitus, hipertensión, riesgo creciente de enfermedad cardiovascular y agrandamiento de órganos del cuerpo, incluyendo el hígado, vaso, riñones y corazón) deben hacer al animal, teóricamente, no viable, esto no representa, aparentemente, un obstáculo a su

salud y bienestar. Una vaca con millones alarmantemente altos de una hormona extraña en su sangre, pero que es perfectamente saludable y tiene una productividad sorprendente de una proteína recombinante constituye una contribución inesperada e innovadora.

[0116] Otro aspecto innovador de la presente invención es que el hGH recombinante que entra al torrente sanguíneo de la vaca, estimula la glándula mamaria a producir más leche. Este efecto se logra indirectamente, es decir, a través de la acción del IGF-1. Esta molécula incrementa el flujo sanguíneo a través de la glándula mamaria, suministrando precursores típicos para la síntesis de grasa de la leche, proteína, y lactosa. Así, el IGF-1 actúa para dirigir los nutrientes a través de la sangre a las células en la ubre donde ellos ayudan a la producción de la leche. Por lo tanto, se logra un animal autoestimulante, en razón a que el hGH recombinante producido en la leche de la vaca transgénica está promoviendo un incremento sostenido en el volumen de la leche producida por el animal a través de la estimulación de su glándula mamaria con la secreción correspondiente de más hGH en su leche.

EJEMPLO 5

Obtención de Terneros Transgénicos Mediante su Clonación

[0117] Cinco muestras de tejido provenientes de la oreja de un ternero transgénico fueron tomadas empleando una aguja de 1.5 mm de diámetro, cuyo extremo había sido previamente biselado para este propósito. Las muestras fueron embarcadas bajo refrigeración al laboratorio en un medio basado en PBS que tiene antibióticos y antimicóticos.

[0118] Posteriormente, las muestras de tejido fueron incubadas durante 72 horas en un medio MEM, con 10% de suero fetal bovino y antibióticos a 39°C y atmósfera al 5% de CO₂. Eventualmente, se removieron las muestras de tejido, y los fibroblastos de la periferia del plato se les permitieron crecer hasta confluencia. Una vez esto se había logrado, los fibroblastos se incubaron durante al menos 5 días sin cambiar el medio de cultivo con el fin de lograr su sincronización en la etapa G₀, que fue evaluada por medio de visualización con microscopía.

[0119] Después de tripsinización, fueron fusionados los fibroblastos individuales con oocitos de bovinos enucleados de acuerdo con el ejemplo 2, y los embriones así obtenidos fueron cultivados en medio SOF y atmósfera de 5% de CO₂ + 5% de O₂ + 90% de N₂ hasta la etapa de blastocisto. Posteriormente, fueron transferidos en general dos blastocistos no quirúrgicamente por vaca receptora, y los embarazos se determinaron a los 30 – 35 días por ultrasonografía.

[0120] A las vacas implantadas se les permitió pasar la gestación hasta un parto natural. Eventualmente, se pudo utilizar una aproximación quirúrgica (cesárea) para el parto. Los recién nacidos son alimentados con calostro rico en Ig durante las primeras 48 horas, y luego con sintético, finalmente se utilizan alimentos naturales (todos ellos libres de compuestos de origen animal).

[0121] Las figuras 6A y 6B muestran mediciones de concentraciones de suero de hGH e IGF-1 desarrollados en paralelo para dos animales transgénicos obtenidos al subclonar una vaca transgénica, y los resultados de estos análisis son descritos en las figuras 6C y 6D, respectivamente, para permitir la visualización simultánea de ambas magnitudes para cada animal. En razón a que en este momento los

terneros son jóvenes, los valores para hGH e IGF-1 aún permanecen en los respectivos rangos de referencia, pero se espera que ellos se eleven de la misma manera que lo hicieron en la vaca transgénica de la cual fueron obtenidos estos dos clones.

EJEMPLO 6

btención de Terneros Transgénicos Mediante Inseminación Artificial de Vacas Transgénicas Superovuladas

[0122] Una aproximación alternativa para obtener terneros transgénicos se describirá en este ejemplo. Este método comprende superocular una vaca transgénica por medio de un tratamiento hormonal, inseminando artificialmente dicha vaca; recolectando los embriones así generados; la implantación de dichos embriones en vacas subrogadas; y el desarrollo del embarazo hasta el nacimiento de los animales. Adelante se presenta una descripción de este procedimiento.

Superovulación

[0123] En la mañana del día 1 (es decir el día que inicio el procedimiento), 150 µg de prostaglandinas (D(+)) clorplotenol, Arsaprost®, Arsa) se administró a la vaca transgénica mediante ruta intramuscular. El animal fue sometido a una dieta diaria de 4 kg que contenía aproximadamente 15% de proteínas (antes del día 1), el animal se le había dado 2 kg de alimento, con el mismo contenido de proteínas. En la mañana del día 8, un dispositivo CIDR (liberación de droga interna controlada) de progesterona fue ubicado intravaginalmente. Además, 50 mg de progesterona y estradiol se administraron mediante ruta intramuscular. La cantidad

de alimento que el animal comió se levó a 6 kg/día, con el mismo contenido de proteínas. Luego, dos inyecciones intramusculares de FSH y LH (PLUSET®, Calier) se administró en los días 12, 13, y 14 (uno en la mañana y otro en la tarde). Al siguiente día (día 15), el tratamiento continuo con la administración, por ruta intramuscular, de dos inyecciones de PLUSET® (uno en la mañana y el otro en la tarde) y dos inyecciones de 150 µg de prostaglandinas cada uno (mismo régimen de administración). En la mañana del día 16, se removi6 el CIDR. La cantidad total de PLUSET® administrada a lo largo de toda la fase de ovulación fue de 350 IU.

Inseminación

[0124] La fase comprendió 3 administraciones sucesivas (la primera y la segunda, en la mañana y en la tarde del día 17, respectivamente, y la última en la mañana, del día 18) de semen proveniente de toro jersey donador, que había sido obtenido previamente y mantenido congelado para preservar la viabilidad de los espermatozoides.

Recolección de Embriones y su implantación en Vacas Portadoras

[0125] La recolección de embriones al fluir ambas trompas del útero de la vaca con 1 de l de DMPBS (Nutricell®) tuvo lugar en la mañana del día 26. Inmediatamente después, fueron transferidos 2 embriones no quirúrgicamente por vaca receptora, y se determinaron los embarazos en los días 30-35 mediante ultrasonografía.

[0126] Las vacas implantadas se les permitió pasar normalmente la gestación hasta el parto natural. Eventualmente se puede utilizar una aproximación

quirúrgica (Cesárea). Los recién nacidos se alimentaron con calostros ricos en IG durante las primeras 48 horas, y luego sintético, finalmente se utilizaron alimentos naturales (todos los cuales libres de compuestos) de origen animal.

[0127] En razón a que la generación de descendencia biológica obedece a la ley de Mendel, la mitad de los animales nacidos como consecuencia del procedimiento descrito anteriormente debe ser transgénico, y, de estos, la mitad deben ser machos y la otra mitad hembras. Por lo tanto, existe una alta probabilidad de obtener un macho transgénico (animal fundador), cuyo semen puede ser utilizado para establecer configurar un banco maestro de semen transgénico de jersey para ser utilizado en la inseminación de vacas transgénicas/no transgénicas superovuladas con el fin de expandir la herencia transgénica.

EJEMPLO 7

Purificación de hGH recombinante de leche

[0128] Una vez verificado que es correcto el peso molecular aproximado, los resultados de Western blot y la actividad biológica del hGH recombinante producido en la leche de ternera, se desarrolla un proceso de purificación extensiva, para que este sea imperativo cuando se elabora un producto biofarmacéutico, que la proteína de interés debe ser purificada hasta homogeneidad, con el fin de evitar la presencia de posibles contaminantes de dicho producto. Este proceso comprendió las etapas de: obtener la grasa de la leche por medio de centrifugación y dilución del supernadante obtenido para lograr una mejor solubilidad en hGH recombinante eventualmente retenido en las

micelas de caseína (clarificación): y pasar de esta solución a través de una columna de cromatografía de intercambio aniónico de leche expandido (una alternativa a esta etapa es el empleo de una columna de inmutioafinidad, ver Ejemplo (adelante); la solución resultante es sustraída de la etapa de HPLC (C4) de fase inversa; las fracciones ricas en hGH recombinante son posteriormente sometidas a cromatografía de intercambio aniónico.

[0129] El material purificado es desalado, concentrado y sometido a cromatografía de exclusión molecular. Esto se separa por peso molecular con el fin de obtener un hGH recombinante puro.

[0130] El procedimiento para la purificación de hormona de crecimiento humano (hGH) proveniente de la leche comprende las siguientes etapas en orden: (a) clarificación (b) cromatografía de intercambio aniónico de lecho expandido, (c) cromatografía de fase inversa, (d) cromatografía de intercambio aniónico, (e) cromatografía de exclusión molecular (desalado), (f) concentración y (g) cromatografía de exclusión molecular.

Clarificación

[00131] La leche fresca se mezcló con una cantidad suficiente de Tween 80 con el fin de obtener una solución al 0.5%. Después de la adición de Tween 80, se agregaron 2M de Tris-HCL para conseguir un pH de 7.3 ± 0.1 . Posteriormente, el producto se homogenizó durante 30 minutos, y luego se centrifugó a 14000 g con el fin de separar la capa de grasa. Finalmente, la solución resultante se diluyó con 0.5% de Tween 80 hasta una conductividad de menos de, o igual a, 1500 $\mu\text{S}/\text{cm}$.

El Ph se ajustó a 7.3 ± 0.1 con Tris-HCL 2 M y luego el producto se filtró a través de una membrana de poros de $0.8 \mu\text{m}$ y se almacenó convenientemente.

Cromatografía de Intercambio Aniónico de lecho Expandido

[0132] El material resultante de la etapa previa se cromatografió utilizando una matriz de intercambio aniónico de acuerdo a los siguientes parámetros:

1. **Equipo:**

A **Columna**

- 1) **Diámetro: 5 cm**
- 2) **peso de lecho: 30 cm (lecho compactado)**
- 3) **Matriz:**
 - a. **Línea de flujo QXL (Amersham)**
 - b. **volumen: 600 ml**

2. **Solución y amortiguadores:**

- A **0.5 NaOH**
- B **20% de etanol**
- C. **Amortiguador A: 2.20 mM Tris.HCL, Ph 7.3**
- D. **Amortiguador B: 500 mM Tris.HCL, Ph 7.3**
- E. **Amortiguador C: 20 mM Tris.HCL, 150 mM NaCL, pH 7.3**
- F. **Amortiguador D: 20 mM Tris.HCL, 500 mM NaCL, Ph 7.3**

3. **Material hacer cromatografiado**

- A. **Leche clarificada**
- B. **Condiciones de la muestra:**

- 1) volumen: 25 ± 5 l
- 2). Conductividad: $\leq 1500 \mu\text{S/cm}$
- 3). pH: 7.3 ± 0.1

[0133] Para equilibrar la columna, 1.5 volúmenes de la columna ("vc") (900 ml) de agua purificada fueron pasados a través de este, a un flujo de 115 ± 5 cm/hora (flujo descendente). Posteriormente, las siguientes soluciones o amortiguadores en las cantidades detalladas posteriormente fueron secuenciadamente pasadas a través de éste, a un flujo de 230 ± 30 cm/hora (flujo ascendente): 3.0 vc (1,800 ml) de 0.5 N de NaOH; 3.0 vc (1,800 ml) de agua purificada; 1.0 vc (600 ml) de amortiguador B; y finalmente, 3.0 vc (1,800 ml) de amortiguador A.

[0134] Una vez se ha equilibrado la columna, el material a ser cromatografiado se carga. Dicha carga se desarrolla a $12 \pm 3^\circ\text{C}$ y a un flujo de 230 ± 30 cm/hora. Posteriormente, se desarrolló la elusión a un flujo de 115 ± 15 cm/hora y a la misma temperatura. Primero, se pasó una cantidad suficiente de amortiguador A a través de la columna (flujo ascendente), y segundo la solución y amortiguadores detallados posteriormente fueron pasados en el siguiente orden (flujo descendente): 1.5 vc (900 ml) de amortiguador A; 2.0 vc (1,200 ml) de amortiguador C; y finalmente, 2.0 vc (1,200 ml) de amortiguador B.

[0135] Una vez ha finalizado la etapa, las siguientes soluciones de amortiguadores en las cantidades detalladas posteriormente fueron secuencialmente pasadas a través de la columna, con el fin de limpiarlas: 1.5 vc (900 ml) de agua purificada; 1.5 vc (900 ml) de NaOH 0.5 m, 2.0 vc (1,200 ml) de agua purificada; 1.0 vc (600 ml); finalmente, 1.5 vc (900 ml) de etanol 20%.

[0136] Las fracciones seleccionadas que contienen hGH fueron ensayadas para proteínas totales (mediante el método Bradford) y para la proteína de interés (mediante RIA), y almacenadas a 2-8°C.

Cromatografía de Fase Inversa

[0137] El material resultante de la etapa previa se cromatografía de acuerdo a los siguientes parámetros:

A. Equipo:

A. Columna:

- 1) Diámetro: 4 cm
- 2) Altura del lecho: 48 cm
- 3) Matriz
 - a) Empaque prep. LC de 15 µm Butilo de Poro Amplio BakerBondn (C4)
 - b) Volumen: 600 ml

2. Soluciones y amortiguadores:

A. Fase Móvil 1 (MP1): 30 mM de NaHCO₃, pH 7.2: Agua Purificada : Acetonitrilo (35:55:10)

B. Fase Mobil 2 (MP2): 30 mM de NaHCO₃, pH 7.2: agua purificada: acetonitrilo (20:10:70)

C. 50% de metanol

3. Material a ser cromatografiado

A grupo de fracciones seleccionadas resultantes de la etapa previa

B. Condiciones de la muestra:

- 1) Volumen: 30 ± 15 l
- 2) pH 7.3 ± 0.3

[0138] para equilibrar la columna, las siguientes soluciones o amortiguadores en las cantidades detalladas posteriormente fueron secuencialmente pasadas a través de esta, a un flujo de menos de, o igual a, 478 cm/hora: 0.3 v (180 ml) de metanol al 50%; posteriormente, un gradiente de metanol –MP2 50% se aplicó partiendo de una proporción de 100:0 a dichas soluciones hasta una proporción 0:100 de dichas soluciones en un volumen total de 1.0 vc (600 ml) se hizo reaccionar; una vez que terminó el gradiente, 1.0 vc (600 ml) de MP2 se pasó a través de la columna; posteriormente, un gradiente de MP2-MP1 se aplicó partiendo de una proporción de 100:0 de dichas soluciones hasta una proporción 0:100 de dichas soluciones en un volumen total de 1.0 vc (600 ml) hasta que una proporción de 0:100 de dichas soluciones en un volumen de 1.0 vc (600 ml) se alcanzó; y, finalmente, 2.0 vc (1,200 ml) de MPI se pasó a través de la columna.

[0139] Una vez se equilibró la columna, el material a ser cromatografiado se filtró a través de una membrana con poro de $0.45 \mu\text{m}$, y se cargó inmediatamente de manera posterior. Dicha carga se desarrolló a $20 \pm 5^\circ\text{C}$ y a un flujo de menos de, o igual a, 238 cm/hora. Posteriormente, la elución fue desarrollada a un flujo de 478 ± 78 cm/hora y a la misma temperatura, de la solución de amortiguadores detalladas posteriormente fueron pasados en el siguiente orden: 1.0 vc (600 ml) de MPI; un gradiente de MP1-MP2, partiendo de una proporción 65:35 de dichas soluciones hasta que se alcanzó una proporción de 45:55 de dichas soluciones en un volumen total de 18.0 vc (9,000 ml); 1.0 vc (600 ml) de MP1-MP2 en una proporción 45:55; y, finalmente, 2.0 vc (1,200 ml) de MP2.

[0140] Una vez ha finalizado la etapa, con el fin de limpiar la columna, se aplica un gradiente de MP2-metanol 50%, partiendo de una proporción 100:0 de dichas soluciones hasta que se alcanzó a una proporción 0:100 de dichas soluciones en un volumen total de 1.0 vc (800 ml); y, finalmente, 2,0 vc (1,200 ml) de metanol al 50% se pasó a través de la columna.

[0141] Las fracciones resultantes de esta cromatografía se ensayaron mediante SDS-PAGE homogéneo 20% y para hGH oxidado, y, dependiendo de los resultados, se desarrolló una selección. Posteriormente, el hGH seleccionado que contiene las fracciones fueron analizadas para proteínas totales (mediante el método Bradford), y almacenadas a 2-8°C.

Cromatografía de Intercambio Aniónico

[0142] El material resultante de la etapa previa se cromatografió utilizando una matriz de intercambio aniónico, como sigue:

1. Equipo:

A Columna:

- 1). Diámetro: 5 cm
- 2). Altura del lecho: 25 cm
- 3). Matriz
 - a) fuente 30 Q (farmacia)
 - b) Volumen: 500 ml

2. Soluciones y amortiguadores:

A. 20% etanol

55

- B. Solución K: NaHCO_3 0.5 N, NaCl 3M
- C. Solución L: 50 mM de Tris, Ph 7.50
- D. Solución M: HCL 0.1 N, NaCl 3M
- E. Fase Móvil 3 (MP3): Solución L: Acetonitrilo (70:30).
- F. Fase Móvil 4 (MP4) 50 mM Tris, 0.1 M NaCl , pH 7.50:
Acetonitrilo (70:30)

3. Material a ser cromatografiado

- A. fracciones seleccionadas resultantes de la etapa previa
- B. Condiciones de la muestra
 - 1). Volumen: 4.5 ± 11
 - 2). Ph: 7.2 ± 0.2

[0143] Para equilibrar y desinfectar la columna, fueron pasadas secuencialmente las soluciones o amortiguadores en las cantidades detalladas a continuación a través de ésta, a un flujo de menos de, o igual a, 183 ± 20 cm/hora: 1.0 vc (500 ml) de agua purificada; 1.0 vc (500 ml) de solución K; 1.0 vc (500 ml) de solución L; y, finalmente, 1.0 vc (500 ml) de MP3.

[0144] Una vez se equilibró la columna, se cargo el material a ser cromatografiado. Dicha carga se desarrolló a $20 \pm 5^\circ \text{C}$ y a un flujo de menos de, o igual a, 183 cm/hora. Posteriormente se desarrolló la elusión a un flujo de 183 ± 20 cm/hora y a la misma temperatura, y las soluciones y amortiguadores descritos a continuación se pasaron en el siguiente orden: 1.0 vc (500 ml) de MP3; un gradiente de MP3 – MP4, iniciando desde una proporción 15:85 de dichas soluciones hasta que se alcanzó una proporción de 25:75 de dichas soluciones en

un volumen total de 5.0 vc (2500 ml); y, finalmente, 2.0 vc (1000 ml) de MP4 se pasaron a través de la columna.

[0145] Una vez ha finalizado la etapa, se pasaron secuencialmente las siguientes soluciones o amortiguadores a través de la columna en las cantidades descritas a continuación, con el fin de limpiarla: un gradiente de MP4 – agua purificada, iniciando desde una proporción 100:0 de dichas soluciones hasta que se alcanzó una proporción de 0:100 de dichas soluciones en un volumen total de 0.5 vc (250 ml); 0.5 vc (250 ml) de agua purificada; un gradiente de agua purificada – solución K, iniciando desde una proporción 100:0 de dichas soluciones hasta que se alcanzó una proporción de 0:100 de dichas soluciones en un volumen total de 0.5 vc (250 ml); 1.0 vc (500 ml) de solución K; un gradiente de solución K – agua purificada, iniciando desde una proporción 100:0 de dichas soluciones hasta que se alcanzó una proporción de 0:100 de dichas soluciones en un volumen total de 0.5 vc (250 ml); un gradiente de agua purificada – solución M, iniciando desde una proporción 100:0 de dichas soluciones hasta que se alcanzó una proporción de 0:100 de dichas soluciones en un volumen total de 0.5 vc (250 ml); 1.0 vc (500 ml) de solución M; un gradiente de solución M – agua purificada, iniciando desde una proporción 100:0 de dichas soluciones hasta que se alcanzó una proporción de 0:100 de dichas soluciones en un volumen total de 0.5 vc (250 ml); 1.0 vc (500 ml) de agua purificada; un gradiente de agua purificada – solución L, iniciando desde una proporción 100:0 de dichas soluciones hasta que se alcanzó una proporción de 0:100 de dichas soluciones en un volumen total de 0.5 vc (250 ml); 0.5 vc (250 ml); 0.5 vc (250 ml) de solución L; un gradiente de solución L – agua purificada, iniciando desde una proporción 100:0 de dichas soluciones hasta que se alcanzó una proporción de 0:100 de dichas soluciones en un volumen total de 0.5 vc (250 ml); y, finalmente, 1.5 vc (750 ml) de agua purificada.

[0146] Las fracciones que contiene hGH seleccionado se ensayaron para proteínas totales (mediante el método Bradford), y se almacenaron a 2 – 8° C.

Cromatografía de Exclusión Molecular

[0147] El material resultante de la etapa previa se cromatografió utilizando una matriz de exclusión molecular, como sigue:

1. Equipo:

B. Columna:

- 1) Diámetro: 5 cm
- 2) Altura de lecho: 25 cm
- 3) Matriz
 - a) Cellufine GH25 (Millipore)
 - b) Volumen: 500 ml

2. Soluciones y amortiguadores:

- A. NaOH 0.5 N
- B. 20 % de etanol
- C. Amortiguador C: 150 mM de NaH_2PO_4 , Ph 7.2
- D. Amortiguador G: 320 mM de Glicina, 10 mM de NaH_2PO_4 , 0.1 % Tween 80, pH 6.9

3. Material a ser cromatografiado

- A. Fracciones seleccionadas resultantes de la etapa previa.
- B. Condiciones de la muestra
 - 1). Volumen: 0.5 ± 0.2 l
 - 2). Ph: 7.5 ± 0.5

[0148] Para equilibrar y desinfectar la columna, fueron pasadas secuencialmente las soluciones o amortiguadores en las cantidades detalladas a continuación a través de esta, a un flujo de menos de, o igual a, 180 cm/hora: 1.0 vc (500 ml) de agua purificada; 1.0 vc (500 ml) de NaOH 0.5 N; 0.5 vc (250 ml) de agua purificada; 0.5 vc (250 ml) del Amortiguador C, y finalmente, 2.0 vc (1000 ml) del Amortiguador G.

[0149] Una vez se equilibró la columna, se cargó el material a ser cromatografiado. Dicha carga se desarrolló a $20 \pm 5^\circ \text{C}$ y a un flujo de $183 \pm 20 \text{ cm/hora}$. Posteriormente se desarrolló la elución a la misma proporción de flujo y temperatura, y 1.0 vc (500 ml) del Amortiguador G se pasaron a través de la columna, tantas veces como el número de procedimientos que fue necesario desarrollar.

[0150] Una vez ha finalizado la etapa, se pasaron secuencialmente las siguientes soluciones o amortiguadores a través de la columna en las cantidades descritas a continuación, con el fin de limpiarla: 0.5 vc (250 ml) de agua purificada; 1.0 vc (500 ml) de NaOH 0.5 N; 0.5 vc (250 ml) de agua purificada; un ardiente de agua purificada; 0.5 vc (250 ml) del Amortiguador C; 0.5 vc (250 ml) de agua purificada; y, finalmente, 1.5 vc (750 ml) de etanol al 20 %.

[0151] Las fracciones que contienen hGH seleccionado se ensayaron para proteínas totales, y se almacenaron a $2-8^\circ \text{C}$.

Concentración

[0152] Las fracciones resultantes del ejemplo previo se concentraron de acuerdo con las condiciones descritas adelante:

- 1. Equipo:**
 - A. Bomba peristáltica: Watson Marlow-Cat.No. 302S**
 - B. Tubería: Watson Marlow-Cat No. 902.0080.016**
 - C. Concentrador: Prep. Scale. Millipore-Cat. No. CDU F006LC.**
- 2. soluciones y amortiguadores.**
 - A. 0.28% Dodecil Sulfato de Sodio (SDS).**
 - B. 0.06% de triton**
 - C. 0.125 N de NaOH**
 - D. Amortiguador G: 320 mM de glicina, 10 mM de NaH₂PO₄, 0.1% de Tween 80, pH 6.9.**
- 3. Material a ser procesado:**
 - A. Fracciones seleccionadas resultantes del ejemplo previo.**
 - B. Condiciones de Muestra:**
 - 1) volumen: 1.0±0.5 l**
 - 2) conductividad: 1200± 100 μS/cm**
 - 3) pH: 6.9±0.1**

[0153] El equipo fue limpiado primero, desinfectado y equilibrado, y la siguiente secuencia de soluciones y amortiguadores fue fluida a través del equipo: 2 l de 0.125 N de NaOH; 10 l de agua purificada; y, finalmente 2 l de amortiguador G. El equipo fue entonces listo para ser utilizado para concentración sobre las fracciones seleccionadas, luego de la metodología usual. El procedimiento de

concentración se desarrollo hasta alcanzar una concentración de proteína de 15 mg/ml, (evaluada por el método Bradford)

[0154] Las fracciones seleccionadas fueron filtradas a través de una membrana de 0.22 μm , ensayada para proteínas totales (mediante el método Bradford), y almacenada a 4°C.

[0155] La conductividad y el pH de las fracciones seleccionadas fue de 1,100-1,300 $\mu\text{S/cm}$ y 6.9 ± 0.1 , respectivamente.

Cromatografía de Exclusión Molecular

[0156] El material resultante de la etapa previa se cromatografió utilizando una matriz de exclusión molecular, como sigue:

1. Equipo

A Columna

- 1) diámetro: 5 cm
- 2) Altura de lecho: 92 cm
- 3) Matriz
 - a) Sefraquil S-200 Alta Resolución (Amersh Pharmacia)
 - b) Volumen: 1,800 ml

2. Soluciones y Amortiguadores

- A. NaOH al 0.5 N
- B. Etanol al 20%

C. Amortiguador H: 3320 mM de Glicina. 2.2. mM de NaH_2PO_4 , 1.8 mM de NaH_2PO_4 , pH 7.30

3. Material a ser cromatografiado

A. Fracciones seleccionadas de la etapa previa, concentradas

B. Condiciones de muestra:

- 1) Volumen: 40 ± 20 ml
- 2) Conductividad: $1,200 \pm 100$ $\mu\text{S}/\text{cm}$
- 3). pH: 7.3 ± 0.1

[0157] Para equilibrar y desinfectar una columna, las siguientes soluciones o amortiguadores en las cantidades detalladas a continuación fueron secuencialmente pasadas a través de este, a un flujo de menos de 46 cm/hora: 1.0 vc (1,800 ml) de agua purificada, 1.0 vc (1,800 ml) de NaOH al 0.5 N, y, finalmente, 2.0 vc (3,600 ml) de amortiguador H.

[0158] Una vez se equilibró la columna, el material a ser cromatografiado se cargó. Dicha carga se desarrollo a $20 \pm 5^\circ\text{C}$ y a un flujo de 46 ± 15 cm/hora. Posteriormente, se desarrollo la elusión a la misma proporción de flujo y temperatura, y 1.0 vc (1,800 ml) del amortiguador H se pasó a través de la columna, tantas veces como el número de procedimientos que fue necesario desarrollar.

[0159] Una vez habla finalizado la etapa, las siguientes soluciones o amortiguadores en las cantidades detalladas a continuación fueron secuencialmente pasadas a través de la columna, con el fin de limpiarla: 1.0 vc (1,800 ml) de agua purificada; y 1.5 vc (2,700 ml) de etanol al 20%.

[0160] Las fracciones que contienen hGH puro fueron asépticamente filtradas a través de una membrana de poro de 0.22 μm en botellas de plástico despirogenadas estériles ensayadas para proteínas totales, y almacenadas a menos 20°C.

EJEMPLO 8

Procedimiento Alternativo de Purificación de hGH Proveniente de Leche

[0161] En lugar del método de purificación previamente descrito, se pudo emplear un esquema alternativo con el fin de purificar el hGH recombinante contenido en la leche. Las diferencias principales entre el procedimiento descrito en el Ejemplo 7 y la alternativa presentada en este ejemplo es que la segunda etapa de la anterior involucra cromatografía de intercambio aniónico de lecho expandido, mientras que la etapa correspondiente del último implica cromatografía de inmunoafinidad. Las etapas de clarificación de ambos procedimientos son también ligeramente diferentes. En razón a que el resto de ambos esquemas de purificación son idénticos, solo las primeras dos etapas del procedimiento alternativo se describirán adelante.

Clarificación

[0162] Leche fresca fue mezclada con una cantidad suficiente de Tween 80, con el fin de obtener una solución al 0.5%. Después de la adición de Tween 80 se agregó un M de Tris para conseguir un Ph de 7.3 ± 0.3 . Posteriormente, el producto se homogenizó durante 30 minutos, y luego se centrifugo a 14000 g con el fin de separar la capa de grasa. Finalmente, la solución resultante se diluyó 20 veces

con amortiguador s (50 mM de Tris HCL, 500 Mm de NaCL, 0.5% de Tween 80, pH 7.3), y luego se filtró a través de una membrana de poro de 0.45 μ m y se almacenó convenientemente.

Cromatografía de Inmunoadfinidad

[0163] El material resultante de la etapa previa se cromatografió utilizando una matriz de interacción de inmunoadfinidad (Affigel 10 Ester de Azarosa, elaborado por BioRad, con anticuerpos monoclonales anti-GH covalentemente unidos, manipulados por bio Sidus) de acuerdo con los siguientes parámetros:

1. Equipo

A Columna

- 1) diámetro: 30 cm
- 2) Altura de lecho: 15 cm
- 3) Matriz

a) Ester de azarosa Affigel 10 (BioRad), con anticuerpos monoclonales anti-GH covalentemente unidos (Bio Sidus)

b) Volumen: 10 l

2. Soluciones de Amortiguadores:

- A. Amortiguador A: 50 Mm de Tris HCL, 500 mM de NaCL, pH 7.2
- B. Amortiguador B: 100 mM de Ácido Cítrico, pH 3.0
- C. Amortiguador C: 150 mM de NaH_2PO_4 .Ph 7.2
- D. Amortiguador D: 50 mM de Tris HCL, 500 mM de NaCL, 500 mM de Guanidina. HCL pH 7.2.

E. Amortiguador E: 50 mM de Tris HCL, 500 mM de NaCL, pH 7.2, 0.2% de Azida de Sodio, 0.1 g/l de Gentamicina

3. Material a ser cromatografiado

A. Leche clarificada

B. Condiciones de muestra:

- 1) Volumen: 30-50 l
- 2) Conductividad: 45 ± 15 mS/cm
- 3). pH: 7.3 ± 0.3

[0164] Para equilibrar y desinfectar la columna, si esta no había sido utilizada en los últimos 7 días, la siguiente solución de amortiguadores en las cantidades descritas a continuación fueron secuencialmente pasadas a través de éstas, a un flujo de al menos de 51 cm/hora: 1.0 volumen de la columna ("vc") (10 l) de amortiguador A; 2.0 vc (20 l) de amortiguador D; 2.0 vc (20 l) de amortiguador A; 1.0 vc (10 l) de amortiguador B; 2.0 vc (20 l) de amortiguador C; y, finalmente 1.0 vc (10 l) de amortiguador A.

[0165] De otra parte, si la columna había sido utilizada en los últimos 7 días, las siguientes soluciones o amortiguadores en las cantidades detalladas a continuación fueron secuencialmente pasadas a través de esta, a un flujo de menos de 51 cm/hora 1.0 vc (10 l) de amortiguador C; y, finalmente 2.0 vc (20 l) de amortiguador A.

[0166] Una vez se equilibró la columna, el material a ser cromatografiado se cargó, dicha carga se desarrollo a $5 \pm 3^\circ\text{C}$ y a un flujo de menos de 51 cm/hora. Posteriormente se desarrollo la elusión a un flujo de 42 ± 9 cm/hora y a la misma

temperatura, y las soluciones de amortiguadores descritos a continuación se pasaron en el siguiente orden: 2.0 vc (20 l) de amortiguador A; y 1.5 vc (15 l) de amortiguador B.

[0167] Una vez halla finalizado la etapa, las siguientes soluciones o amortiguadores en las cantidades detalladas a continuación fueron secuncialmente pasadas a través de la columna, con el fin de limpiarla: 2.0 vc (20 l) de amortiguador D; 2.0 vc (20 l) de amortiguador A; y, finalmente, 2.0 vc (20 l) de amortiguador E.

[0168] Las fracciones que contienen hGH seleccionado fueron ensayadas para proteínas totales (mediante el método Bradford) y para la proteína de interés (mediante RIA), y almacenadas a 4°C.

EJEMPLO 9

Control de Calidad del hGH Recombinante Puro

[0169] Dos tandas de hGH recombinante puro fueron sometidas a una serie de ensayos para verificar que el producto sea indistinguible del hGH natural. Tales procedimiento incluyeron, pero no están limitados a, SDS/PAGE, Western blot, actividad biológica *in vitro* (células nb2) y mapeo de péptido *in vivo* (ratas hipofisectomizadas), determinación de la secuencia de aminoácido completa, enfoque isoelectrico (IEF), y análisis HPLC de fase inversa y exclusión de tamaño. Los resultados obtenidos en todos aquellos ensayos fueron exactamente los mismos para ambos el hGH recombinante y el natural, lo que prueba que el hGH

recombinante puro corresponde exactamente al hGH natural, que es así adecuado para elaborar un producto biofarmacéutico.

[0170] Habiendo ahora descrito completamente la invención, se entenderá por aquellos expertos en la técnica que la misma se puede desarrollar dentro de un rango de condiciones, formulaciones y otros parámetros amplio y equivalente, sin afectar el alcance de la invención o cualquier modalidad de esta. Todas las patentes y publicaciones citadas aquí se incorporan frecuentemente aquí como referencia en su totalidad.

REIVINDICACIONES

Lo que se reivindica es:

1. Un método para producir una proteína que comprende:
 - a) elaborar un mamífero transgénico no humano que produce una proteína de interés en su leche;
 - b) obtener dicha leche a partir de dicho mamífero transgénico no humano; y
 - c) purificar dicha proteína de interés de dicha leche.
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho mamífero transgénico no humano se hace mediante un proceso que comprende:
 - a) obtener un gen que codifica una proteína de interés;
 - b) clonar dicho gen en un plásmido mediante el cual dicho gen se liga operablemente a un promotor que dirigirá la expresión de dicho gen en células mamarias, lo que resulta en un plásmido de expresión;
 - c) transfectar células somáticas con dicho plásmido de expresión de tal forma que dicho plásmido se incorpore dentro del genoma de dichas células somáticas, lo que resulta en células somáticas transgénicas;
 - d) enuclear un oocito maduro, lo que resulta en un oocito enucleado;
 - e) fusionar una de dichas células somáticas transgénicas con dicho oocito enucleado lo que resulta en un embrión monocelular;

- f) implantar dicho embrión en el útero de un mamífero receptivo; y
 - g) monitorear la gestación a través del nacimiento del mamífero transgénico.
3. El método de la reivindicación 2, en donde dicho promotor es un promotor de beta caseína, y en donde dicha proteína de interés es hormona de crecimiento humano.
 4. El método de la reivindicación 3, en donde el plásmido de expresión es pRβhGH.
 5. El método de la reivindicación 4, en donde dicho plásmido de expresión comprende adicionalmente un gen de resistencia a la neomicina.
 6. El método de la reivindicación 5, en donde dicho plásmido de expresión pRNeo.
 7. El método de la reivindicación 2, en donde dicho mamífero es un bovino que produce hormona de crecimiento humano recombinante en su leche, cuyo genoma comprende un plásmido integrado, en donde dicho plásmido comprende el gen de hormona de crecimiento humano y un promotor de beta caseína que dirige la expresión de dicho gen en células mamarias de dicho mamífero.
 8. El método de la reivindicación 7, en donde dicho plásmido es pRβhGH.

9. El método de la reivindicación 8, en donde dicho plásmido adicionalmente un gen de resistencia a la neomicina.
10. El método de la reivindicación 9, en donde dicho plásmido es pRNeo.
11. El método de la reivindicación 2, en donde dichas células somáticas son fibroblastos.
12. El método de la reivindicación 2, en donde dichas células somáticas transgénicas se obtienen mediante aislamiento de una hembra transgénica para la producción de dicha proteína de interés en su leche.
13. El método de la reivindicación 12, en donde dichas células somáticas transgénicas son fibroblastos.
14. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho mamífero transgénico no humano se elabora mediante un proceso que comprende:
- a) superovular un mamífero hembra no humano que es transgénico para la producción de dicha proteína de interés en su leche;
 - b) inseminar artificialmente dicho mamífero con semen obtenido de un mamífero macho no humano no transgénico, para producir embriones;
 - c) recolectar dichos embriones;
 - d) implantar dichos embriones en el útero de un mamífero receptivo;
- y

- e) monitorear la gestación a través del nacimiento del mamífero transgénico.

15. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho mamífero transgénico no humano se hace mediante un proceso que comprende:

- a) superovular un mamífero hembra no humano que es transgénico para la producción de dicha proteína de interés en su leche;
- b) inseminar artificialmente dicho mamífero con semen obtenido a partir de un mamífero macho no humano que es transgénico para la producción de dicha proteína de interés, para producir embriones;
- c) recolectar dichos embriones;
- d) implantar dichos embriones en el útero de un mamífero receptivo;
- y
- e) monitorear la gestación a través del nacimiento del mamífero transgénico.

16. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho mamífero transgénico no humano se elabora mediante un proceso que comprende:

- a) superovular un mamífero hembra no humano no transgénico;
- b) inseminar artificialmente dicho mamífero con semen obtenido de un mamífero macho no humano que es transgénico, para la producción de dicha proteína de interés, para producir embriones;
- c) recolectar dichos embriones;

d) implantar dichos embriones en el útero de un mamífero receptivo;

y

e) monitorear la preñez a través del nacimiento del mamífero transgénico

17.El método de una cualquiera de las reivindicaciones 2, 12, 14, 15 o 16, en donde dicho mamífero es de la especie bovina, especie porcina, especie ovina, especie caprina o especie de roedores.

18.El método de la reivindicación 17, en donde dicho mamífero es de la especie bovina.

19.El método de una cualquiera de las reivindicaciones 2, 12, 14, 15 o 16, en donde dicha proteína de interés es una hormona de crecimiento mamaria.

20.El método de la reivindicación 19, en donde dicha hormona de crecimiento mamaria es hormona de crecimiento humano, hormona de crecimiento bovino, hormona de crecimiento porcino, hormona de crecimiento ovino, hormona de crecimiento caprino u hormona de crecimiento de roedor.

21.El método de la reivindicación 20, en donde dicha hormona de crecimiento mamaria es hormona de crecimiento humano.

- 22.El método de la reivindicación 21, en donde dicho mamífero produce hormona de crecimiento humano en un nivel mayor de cerca de 1.0 g hGH/L leche.
- 23.El método de la reivindicación 22, en donde dicho mamífero produce hormona de crecimiento humano en un nivel mayor de cerca de 2.0 g hGH/L leche.
- 24.El método de la reivindicación 23, en donde dicho mamífero produce hormona de crecimiento humano en un nivel mayor de cerca de 3.0 g hGH/L leche.
- 25.El método de la reivindicación 24, en donde dicho mamífero produce hormona de crecimiento humano en un nivel mayor de cerca de 4.0 g hGH/L leche.
- 26.El método de la reivindicación 25, en donde dicho mamífero produce hormona de crecimiento humano en un nivel mayor de cerca de 5.0 g hGH/L leche.
- 27.El método de la reivindicación 26, en donde dicho mamífero produce hormona de crecimiento humano en un nivel mayor de cerca de 6.0 g hGH/L leche.
- 28.El método de la reivindicación 19, en donde la producción de dicha hormona de crecimiento mamaria por dicho mamífero estimula a dicho

mamífero a producir más leche que comprende dicha hormona de crecimiento mamaria.

29. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 2, 12, 14, 15 o 16, en donde el gen que codifica dicha proteína de interés (ligada a un promotor que dirige la expresión de dicho gen en células mamarias) se encuentra en células somáticas y células germinales de dicho mamífero.

30. Un método para purificar una hormona de crecimiento recombinante de leche de un mamífero transgénico no humano que produce una hormona de crecimiento recombinante que comprende:

- a) Clarificar la leche de un mamífero transgénico no humano que resulta en una leche clarificada; y
- b) Someter dicha leche clarificada a cromatografía, lo que resulta en hormona de crecimiento recombinante purificada.

31. El método de la reivindicación 30 en donde dicha cromatografía es cromatografía de intercambio de iones, cromatografía de fase reversa, cromatografía de exclusión molecular o cromatografía de afinidad.

32. El método de la reivindicación 31 en donde las etapas de se desarrollan múltiples etapas de cromatografía.

33. El método de la reivindicación 31 en donde dicha cromatografía de intercambio de iones es cromatografía de intercambio de anión.

34. El método de la reivindicación 31 en donde la cromatografía de afinidad se inmunocromatografía.

35. El método de la reivindicación 31, que comprende adicionalmente una etapa de concentración.

36. Un método para purificar una hormona de crecimiento recombinante de leche de un mamífero transgénico no humano que produce una hormona de crecimiento recombinante que comprende:

- a) Clarificar la leche de un mamífero transgénico no humano, lo que resulta en una leche clarificada;
- b) Someter dicha leche clarificada a cromatografía de intercambio de anión de lecho expandido, lo que resulta en un material cromatografiado de intercambio de anión;
- c) Someter dicho material cromatografiado de intercambio de anión a cromatografía de fase reversa, lo que resulta en material cromatografiado de fase reversa;
- d) Someter dicho material cromatografiado de fase reversa a cromatografía de intercambio de anión, lo que resulta en un material cromatografiado de intercambio de anión;
- e) Someter dicho material cromatografiado de intercambio aniónico a cromatografía de exclusión molecular, lo que resulta en un material cromatografiado de exclusión molecular;
- f) Concentrar dicho material cromatografiado por exclusión molecular, lo que resulta en un material concentrado, y

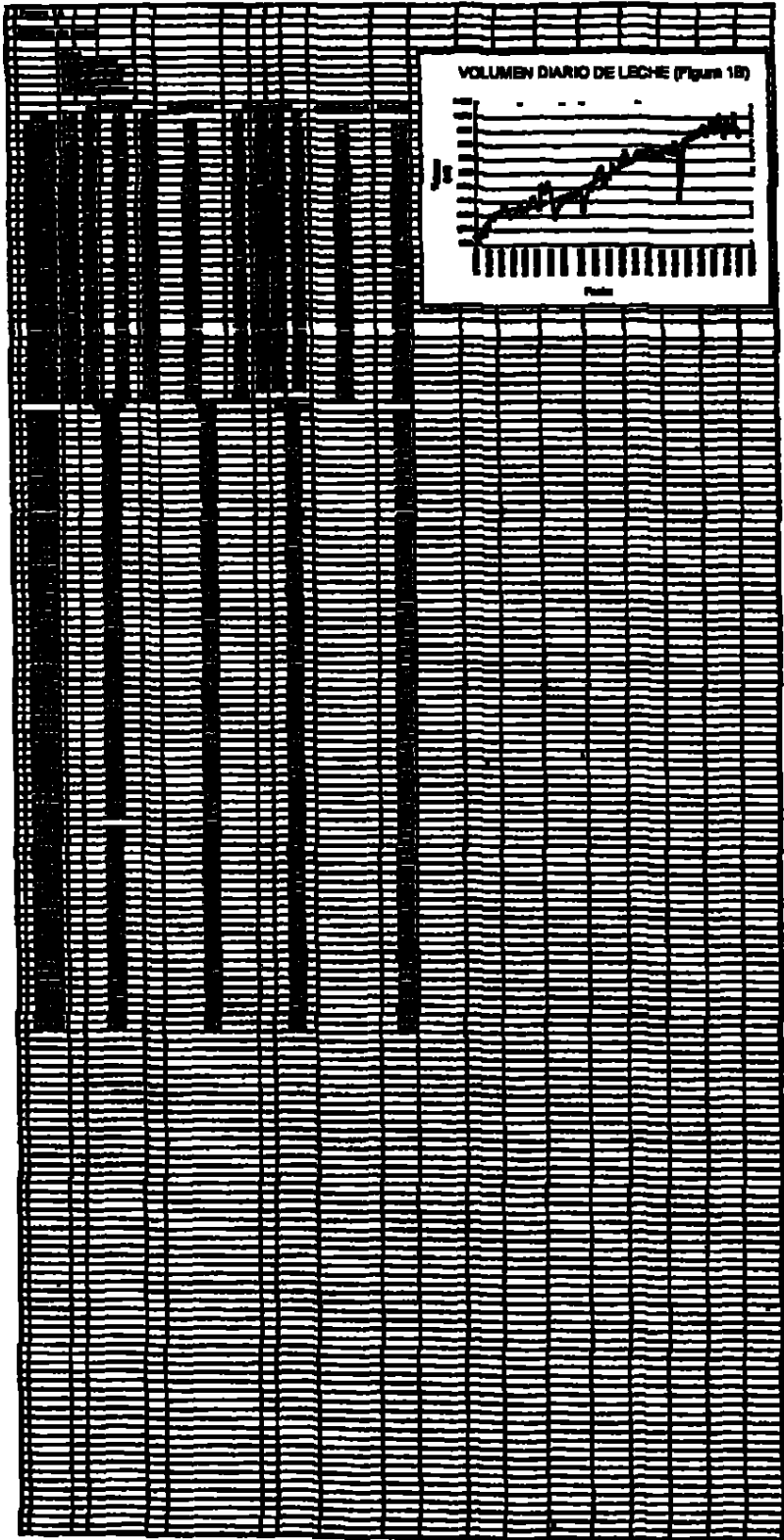
- g) Someter dicho material concentrado a cromatografía de exclusión molecular, lo que resulta en hormona de crecimiento recombinante pura.

37. Un método para purificar una hormona de crecimiento recombinante de leche de un mamífero transgénico no humano que produce una hormona de crecimiento recombinante que comprende:

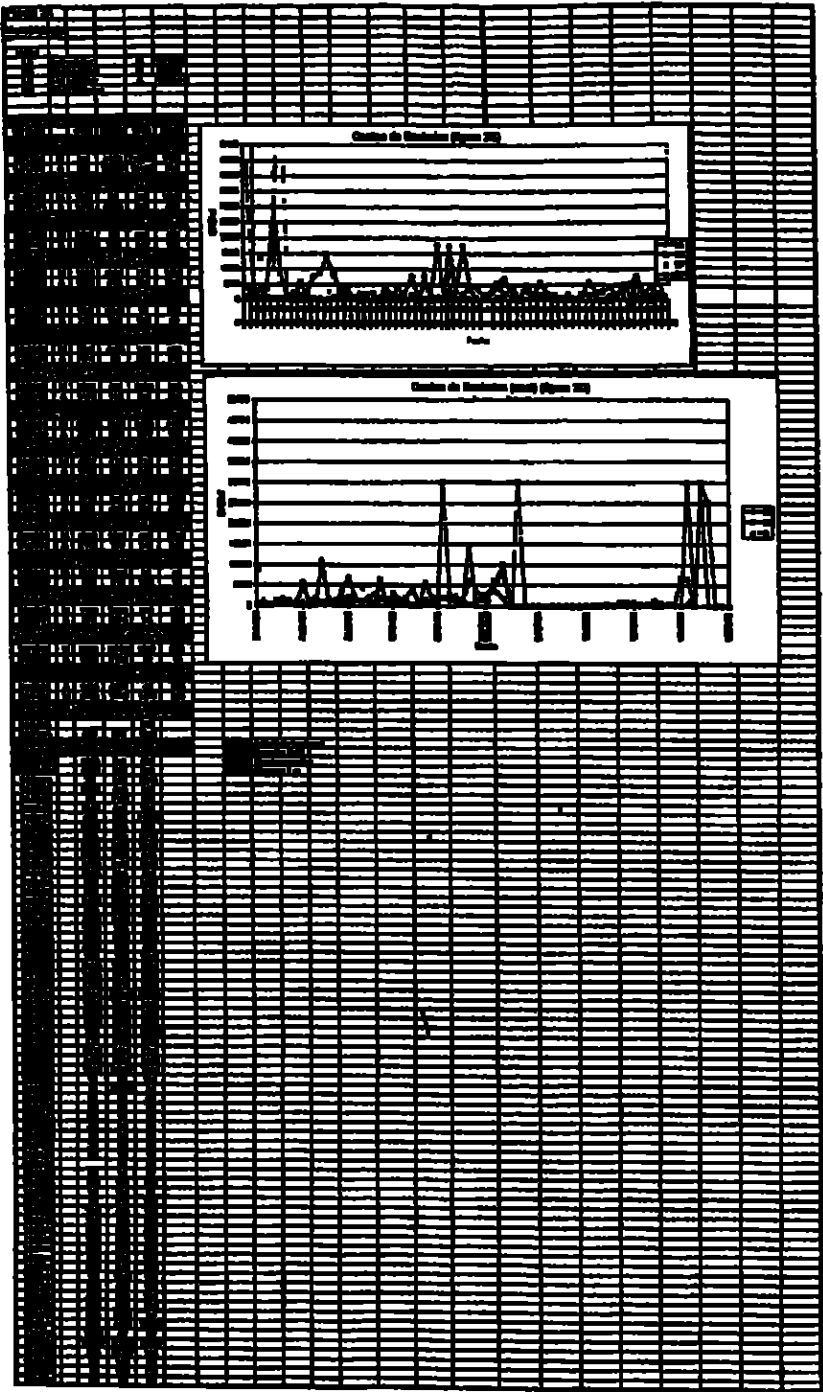
- a) Clarificar la leche obtenida de un mamífero transgénico, lo que resulta en leche clarificada;
- b) Someter dicha leche clarificada a cromatografía de inmutioafinidad, lo que resulta en un material cromatografiado de inmutioafinidad;
- c) Someter dicho material cromatografiado por inmutioafinidad a cromatografía de fase reversa, lo que resulta en un material cromatografiado de fase reversa;
- d) Someter dicho material cromatografiado de fase reversa a cromatografía de intercambio aniónico, lo que resulta en un material cromatografiado de intercambio aniónico;
- e) Someter dicho material cromatografiado de intercambio aniónico a cromatografía de exclusión molecular, lo que resulta en un material cromatografiado de exclusión molecular;
- f) Someter dicho material cromatografiado por exclusión molecular a concentración, lo que resulta en un material concentrado; y
- g) Someter dicho material concentrado a cromatografía de exclusión molecular, lo que resulta en hormona de crecimiento recombinante pura.

- 38.El método de cualquiera de las reivindicaciones 36 o 37, en donde dicha hormona de crecimiento es una hormona de crecimiento mamaria.
- 39.El método de la reivindicación 38, en donde dicha hormona de crecimiento mamaria es hormona de crecimiento humana, hormona de crecimiento bovino, hormona de crecimiento porcino, hormona de crecimiento ovino, hormona de crecimiento caprino, u hormona de crecimiento de roedor.
- 40.El método de la reivindicación 39, en donde dicha hormona de crecimiento mamaria es hormona de crecimiento humano.
- 41.El método de la reivindicación 40, en donde dicho mamífero produce hormona de crecimiento humano en un nivel mayor de cerca de 1.0 g leche hGH/L.
- 42.El método de la reivindicación 41, en donde dicho mamífero produce hormona de crecimiento humano en un nivel mayor de cerca de 2.0 g leche hGH/L.
- 43.El método de la reivindicación 42, en donde dicho mamífero produce hormona de crecimiento humano en un nivel mayor de cerca de 3.0 g leche hGH/L.

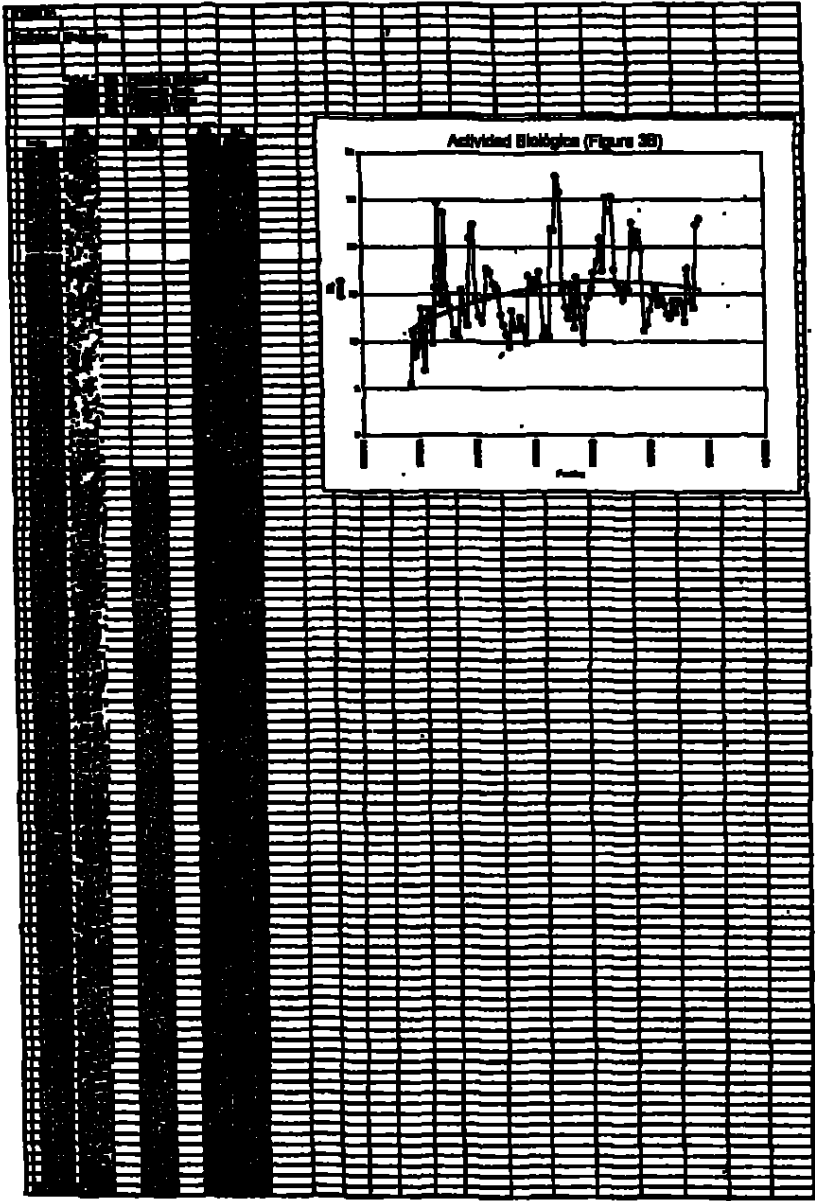
44. El método de la reivindicación 43, en donde dicho mamífero produce hormona de crecimiento humano en un nivel mayor de cerca de 4.0 g leche hGH/L.
45. El método de la reivindicación 44, en donde dicho mamífero produce hormona de crecimiento humano en un nivel mayor de cerca de 5.0 g leche hGH/L.
46. El método de la reivindicación 45, en donde dicho mamífero produce hormona de crecimiento humano en un nivel mayor de cerca de 6.0 g leche hGH/L.
47. El método de cualquiera de las reivindicaciones 36 o 37, en donde dicho mamífero transgénico no humano es de la especie bovina.
48. El método de cualquiera de las reivindicaciones 36 o 37, en donde dicho mamífero transgénico no humano es un cerdo, oveja, cabra o roedor.



HOJA SUSTITUTA (REGLA 26)

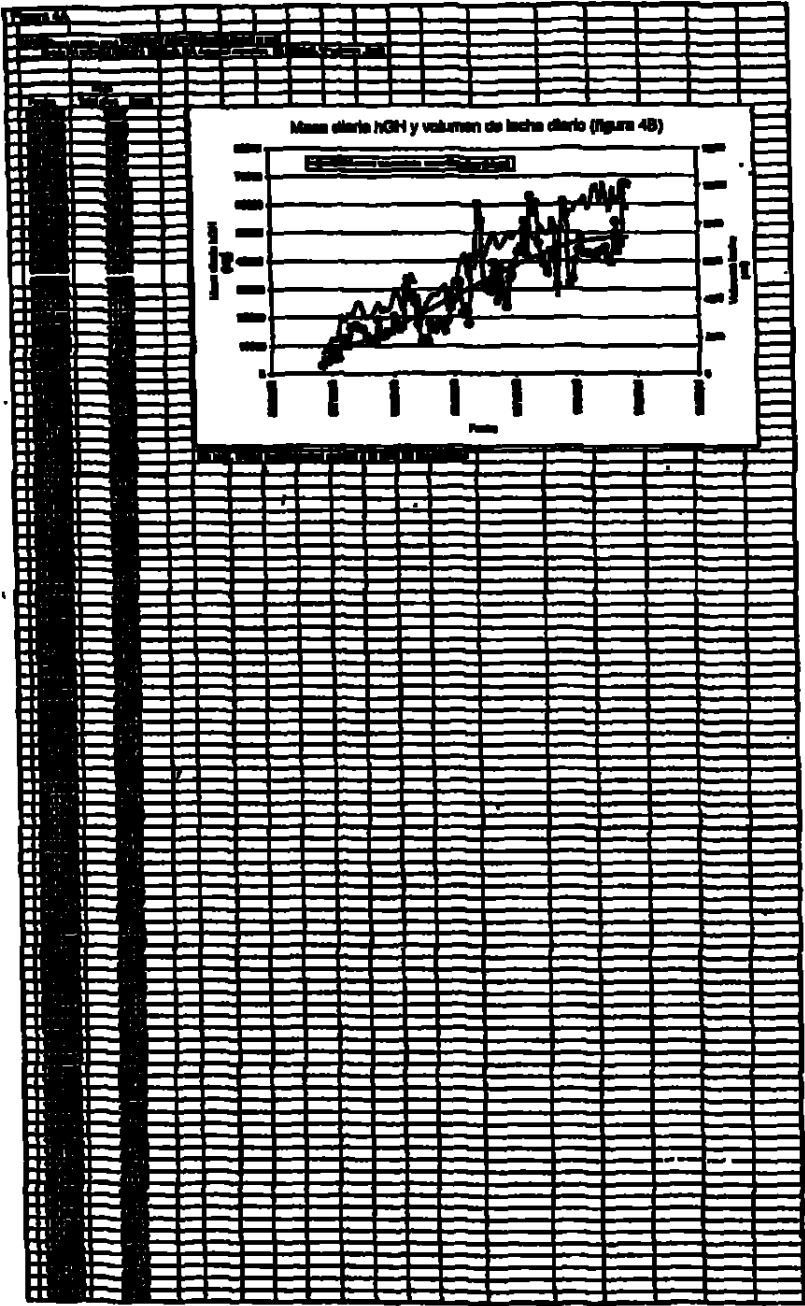


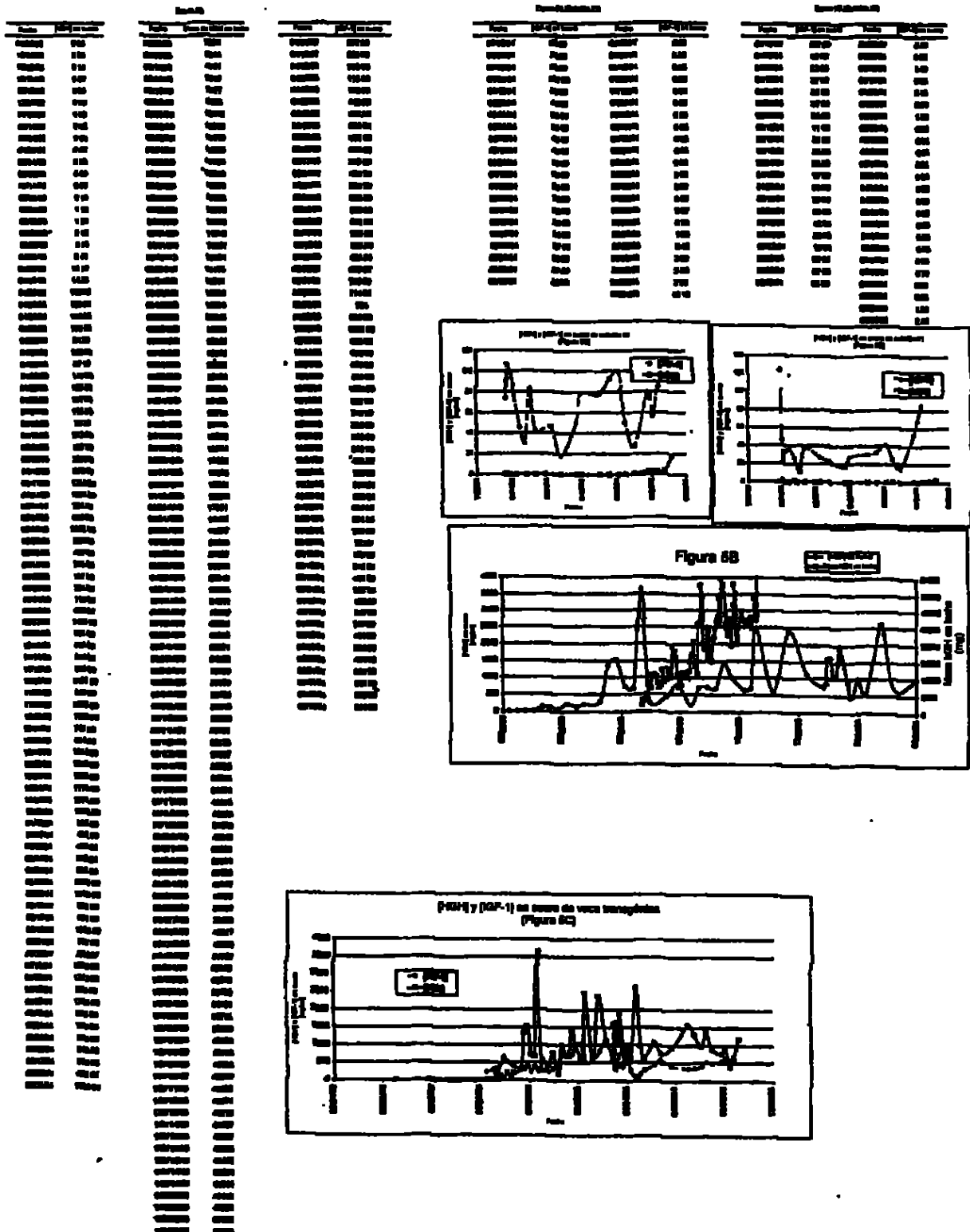
HOJA SUSTITUTA (REGLA 26)



HOJA SUSTITUTA (REGLA 26)

11





Sequence Listing

SEQUENCE LISTING

<110> Sterrenbeld Biotechnologie North
Melo, Carlos Alberto
Baranao, Lino
Carbonetto, Cesar

<120> Process for Producing Exogenous Protein in the Milk of Transgenic Mammals
and A Process for Purifying Proteins Therefrom

<130> 1909.010PC02

<160> 4

<170> PatentIn version 3.7

<210> 1

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer PB1

<400> 1

tctactcgag gatcatctat ctgtcccaaa g

31

<210> 2

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer PB2

<400> 2

ctaggatcca atgatctgat tttgtgg

27

<210> 3

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer PB4

<400> 3

ctaggatcca tggctacagg taagcgcc

28

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer GHTE

<400> 4

atgctgtgtc tggacgtcct

20

PATENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

FIRST NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF
THE COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL
APPLICATION (TO DESIGNATED OFFICES WHICH
DO NOT APPLY THE 30 MONTH TIME LIMIT
UNDER ARTICLE 22(1))

(PCT Rule 47.1(c))

To:

GOLDSTEIN, Jorge, A.
Stern, Kessler, Goldstein & Fox P.L.L.C.
1100 New York Avenue, N.W.
Washington, DC 20005
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing (day/month/year) 06 May 2005 (06.05.2005)		IMPORTANT NOTICE	
Applicant's or agent's file reference 1909.010PC02			
International application No. PCT/US2004/031819	International filing date (day/month/year) 29 September 2004 (29.09.2004)	Priority date (day/month/year) 30 September 2003 (30.09.2003)	
Applicant STERREBELD BIOTECHNOLOGIE NORTH AMERICA, INC. et al			

1. ATTENTION: For any designated Office(s), for which the time limit under Article 22(1), as in force from 1 April 2002 (30 months from the priority date), does apply, please see Form PCT/IB/308 (Second and Supplementary Notice) (to be issued promptly after the expiration of 28 months from the priority date).
2. Notice is hereby given that the following designated Office(s), for which the time limit under Article 22(1), as in force from 1 April 2002, does not apply, has/have requested that the communication of the international application, as provided for in Article 20, be effected under Rule 93bis.1. The International Bureau has effected that communication on the date indicated below:
14 April 2005 (14.04.2005)

CH

In accordance with Rule 47.1(c-bis)(i), those Offices will accept the present notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

3. The following designated Offices, for which the time limit under Article 22(1), as in force from 1 April 2002, does not apply, have not requested, as at the time of mailing of the present notice, that the communication of the international application be effected under Rule 93bis.1:

LU, SE, TZ, UG, ZM

In accordance with Rule 47.1(c-bis)(ii), those Offices accept the present notice as conclusive evidence that the Contracting State for which that Office acts as a designated Office does not require the furnishing, under Article 22, by the applicant of a copy of the international application.

4. TIME LIMITS for entry into the national phase

For the designated Office(s) listed above, and unless a demand for international preliminary examination has been filed before the expiration of 19 months from the priority date (see Article 39(1)), the applicable time limit for entering the national phase will, subject to what is said in the following paragraph, be 20 MONTHS from the priority date.

In practice, time limits other than the 20-month time limit will continue to apply, for various periods of time, in respect of certain of the designated Offices listed above. For regular updates on the applicable time limits (20 or 21 months, or other time limit), Office by Office, refer to the *PCT Gazette*, the *PCT Newsletter* and the *PCT Applicant's Guide*, Volume II, National Chapters, all available from WIPO's Internet site, at <http://www.wipo.int/pct/en/index.html>.

It is the applicant's sole responsibility to monitor all these time limits.

DOCKETED

Search Due 5/17/05
Chap II N.P. 3/30/06
9/26/05
12/23/05
2/28/06

TWD
CEA

RECEIVED
MAY 12 2005
Stern, Kessler, Goldstein & Fox, P.L.L.C.

Kat [signature]
PY [signature]
Simin Baharlou
[signature] 5:17

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

Authorized officer

Simin Baharlou

Facsimile No. +41 22 740 14 35

Facsimile No. +1 202 273 31 30

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINING AUTHORITY

To:
JORGE A. GOLDSTEIN
STERNE, KESSLER, GOLDSTEIN & FOX P.L.L.C.
1100 NEW YORK AVENUE, N.W.
WASHINGTON, DC 20005-3934

PCT

NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF
INTERNATIONAL PRELIMINARY
REPORT ON PATENTABILITY
(Chapter II of the Patent Cooperation Treaty)

(PCT Rule 71.1)

Date of mailing
(day/month/year)

14 OCT 2005

Applicant's or agent's file reference

1909.010PC02

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.

International filing date (day/month/year)

Priority date (day/month/year)

PCT/US04/31819

29 September 2004 (29.09.2004)

30 September 2003 (30.09.2003)

Applicant

STERRENBELD BIOTECHNOLOGIE NORTH AMERICA, INC

1. The applicant is hereby notified that this International Preliminary Examining Authority transmits herewith the international preliminary report on patentability and its annexes, if any, established on the international application.
2. A copy of the report and its annexes, if any, is being transmitted to the International Bureau for communication to all the elected Offices.
3. Where required by any of the elected Offices, the International Bureau will prepare an English translation of the report (but not of any annexes) and will transmit such translation to those Offices.
4. REMINDER

The applicant must enter the national phase before each elected Office by performing certain acts (filing translations and paying national fees) within 30 months from the priority date (or later in some Offices) (Article 39(1)) (see also the reminder sent by the International Bureau with Form PCT/IB/301).

Where a translation of the international application must be furnished to an elected Office, that translation must contain a translation of any annexes to the international preliminary report on patentability. It is the applicant's responsibility to prepare and furnish such translation directly to each elected Office concerned.

For further details on the applicable time limits and requirements of the elected Offices, see Volume II of the *PCT Applicant's Guide*.

The applicant's attention is drawn to Article 33(5), which provides that the criteria of novelty, inventive step and industrial applicability described in Article 33(2) to (4) merely serve the purposes of international preliminary examination and that "any Contracting State may apply additional or different criteria for the purposes of deciding whether, in that State, the claimed invention is patentable or not" (see also Article 27(5)). Such additional criteria may relate, for example, to exemptions from patentability, requirements for enabling disclosure, clarity and support for the claims.

Name and mailing address of the IPEA/ US

Mail Stop PCT, Attn: IPEA/US

Commissioner for Patents

P.O. Box 1450

Alexandria, Virginia 22313-1450

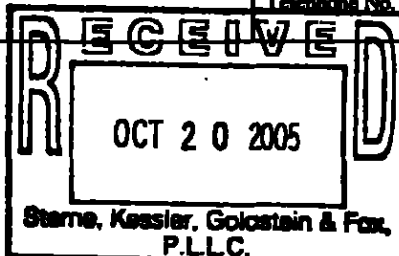
Facsimile No. (703) 305-3230

Form PCT/IPEA/416 (January 2004)

Authorized officer

Deborah Crouch, Ph.D.

Telephone No. 571-272-1600



2nd
LCH

2nd 10/20
101. 6/17 1

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY
(Chapter II of the Patent Cooperation Treaty)

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference 1909.010PC02	FOR FURTHER ACTION		See Form PCT/IPEA/416
International application No. PCT/US04/31819	International filing date (day/month/year) 29 September 2004 (29.09.2004)	Priority date (day/month/year) 30 September 2003 (30.09.2003)	
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC IPC(7): C12N 15/00; C12P 21/00; A01K 67/027; C07K 1/00, 14/00, 16/00 and US CL: 435/320.1, 458; 800/7, 14, 15, 16, 17, 18, 24; 530/412, 413, 415, 416, 417			
Applicant STERRENBELD BIOTECHNOLOGIE NORTH AMERICA, INC			
1. This report is the international preliminary examination report, established by this International Preliminary Examining Authority under Article 35 and transmitted to the applicant according to Article 36. 2. This REPORT consists of a total of <u>3</u> sheets, including this cover sheet. 3. This report is also accompanied by ANNEXES, comprising: a. ☐ (sent to the applicant and to the International Bureau) a total of ___ sheets, as follows: ☐ sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis of this report and/or sheets containing rectifications authorized by this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions). ☐ sheets which supersede earlier sheets, but which this Authority considers contain an amendment that goes beyond the disclosure in the international application as filed, as indicated in item 4 of Box No. I and the Supplemental Box. b. ☐ (sent to the International Bureau only) a total of (indicate type and number of electronic carrier(s)) _____, containing a sequence listing and/or tables related thereto, in electronic form only, as indicated in the Supplemental Box Relating to Sequence Listing (see Section 802 of the Administrative Instructions).			
4. This report contains indications relating to the following items: ☒ Box No. I Basis of the report ☐ Box No. II Priority ☐ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability ☐ Box No. IV Lack of unity of invention ☒ Box No. V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability, citations and explanations supporting such statement ☐ Box No. VI Certain documents cited ☐ Box No. VII Certain defects in the international application ☐ Box No. VIII Certain observations on the international application			
Date of submission of the demand 27 April 2005 (27.04.2005)		Date of completion of this report 28 September 2005 (28.09.2005)	
Name and mailing address of the IPEA/US Mail Stop PCT, Attn: IPEA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703) 305-3230		Authorized officer Deborah Crouch, Ph.D. <i>Janice Ford</i> Telephone No. 571-272-1600 <i>for</i>	

Form PCT/IPEA/409 (cover sheet)(April 2005)

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

International application No.

PCT/US04/31819

Box No. I Basis of the report

1. With regard to the language, this report is based on:

- ☒ the international application in the language in which it was filed.
- ☐ a translation of the international application into English, which is the language of a translation furnished for the purposes of:
- ☐ international search (under Rules 12.3 and 23.1(b))
 - ☐ publication of the international application (under Rule 12.4(a))
 - ☐ international preliminary examination (under Rules 55.2(a) and/or 55.3(a))

2. With regard to the elements of the international application, this report is based on (replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report):

- ☒ the international application as originally filed/furnished
- ☒ the description:
pages 1-44 as originally filed/furnished
pages* NONE received by this Authority on _____
pages* NONE received by this Authority on _____
- ☒ the claims:
pages 45-54 as originally filed/furnished
pages* NONE as amended (together with any statement) under Article 19
pages* NONE received by this Authority on _____
pages* NONE received by this Authority on _____
- ☒ the drawings:
pages 1-5 as originally filed/furnished
pages* NONE received by this Authority on _____
pages* NONE received by this Authority on _____
- ☐ a sequence listing and/or any related table(s) - see Supplemental Box Relating to Sequence Listing.

3. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/figs. _____
- ☐ the sequence listing (specify): _____
- ☐ any table(s) related to the sequence listing (specify): _____

4. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments annexed to this report and listed below had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/figs. _____
- ☐ the sequence listing (specify): _____
- ☐ any table(s) related to the sequence listing (specify): _____

* If item 4 applies, some or all of those sheets may be marked "superseded."

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

International application No.
PCT/US04/31819

Box No. V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement		
1. Statement		
Novelty (N)	Claims <u>3-10, 12-48</u>	YES
	Claims <u>1,2 and 11</u>	NO
Inventive Step (IS)	Claims <u>NONE</u>	YES
	Claims <u>1-48</u>	NO
Industrial Applicability (IA)	Claims <u>1-48</u>	YES
	Claims <u>NONE</u>	NO

2. Citations and Explanations (Rule 70.7)

Claims 1-48 meet the criteria set out in PCT Article 33(4), and thus meet industrial applicability because the subject matter claimed can be made or used in industry.

Claims 1, 2 and 11 lack novelty under PCT Article 33(2) as being anticipated by of US 6,395,958 issued May 28, 2002 (Strelchenko).

Strelchenko teaches the production of a protein in the milk of transgenic nonhuman bovines comprising introducing a DNA sequence encoding a growth hormone operably linked to a milk protein promoter were transfected into fibroblast cells (col. 34, line 62 to col. 35, line 3; col. 36, line 10-13 and line 31; and claim 1). The fibroblast cells were used as a nuclear donor in nuclear transfer experiments to produce a transgenic bovine that produces growth hormone in its milk. Thus, Strelchenko clearly anticipates the claims.

Claims 3, 4, 7, 8, 12, 13 and 17-29 lack an inventive step under PCT Article 33(3) as being obvious over US 6,395,958 issued May 28, 2002 (Strelchenko) in view of Cerdan et al (1998) Molecular Reproduction and Development 49, 236-245.

Strelchenko teaches the production of transgenic bovines by nuclear transfer where the bovines produce growth hormone in their milk (col. 51, line 7 to col. 52, line 25, col. 34, lines 44-60, col. 36, line 31 and col. 52, Table 4). Strelchenko further teaches the transfection of fibroblasts to produce transgenic nuclear donors (col. 36, line 10-13). Cerdan teaches a plasmid comprising a DNA sequence encoding human growth hormone operably linked to a bovine β -casein promoter, where the plasmid also contains a gene for ampicillin resistance, β -lactamase (page 237). The plasmid pRbGH contains the same elements as p3.8bfcas/hGH of Cerdan. Since the construct of Cerdan is the same as that of the claims, the bovines would obviously be reasonably expected to produce human growth hormone at the levels claimed. Thus, at the time of the instant invention, it would have been obvious to produce a bovine by nuclear transfer using a transgenic fibroblast as taught by Strelchenko comprising a DNA sequence encoding human growth hormone as taught by Cerdan.

Claims 5, 6, 9 and 10 lack an inventive step under PCT Article 33(3) as being obvious over US 6,395,958 issued May 28, 2002 (Strelchenko) in view of Cerdan et al (1998) Molecular Reproduction and Development 49, 236-245 and of US 6,451,527 B1 issued September 17, 2002 (Larocca).

Strelchenko teaches the production of transgenic bovines by nuclear transfer where the bovines produce growth hormone in their milk (col. 51, line 7 to col. 52, line 25, col. 34, lines 44-60, col. 36, line 31 and col. 52, Table 4). Cerdan teaches a plasmid comprising a DNA sequence encoding human growth hormone operably linked to a bovine β -casein promoter, where the plasmid also contains a gene for ampicillin resistance, β -lactamase (page 237). Furthermore, the original plasmid used in the construction of the plasmid, pOCH1 contained a gene for neomycin resistance. Larocca teaches a plasmid vector comprising an ampicillin resistance gene, a gene encoding green fluorescent protein operably linked to a CMV promoter and a gene encoding neomycin (col. 3, lines 29-39; column 21, lines 17-35 and column 22, lines 34-37). Larocca teaches that GFP and growth hormone are reporter genes that can be used for selection (col. 6, line 63 to col. 7, line 6). Thus, at the time of the instant invention, it would have been obvious to produce a bovine by nuclear transfer using a transgenic fibroblast as taught by Strelchenko comprising a DNA sequence encoding human growth hormone as taught by Cerdan and Larocca.

Claims 14-16 lack an inventive step under PCT Article 33(3) as being obvious over US 5,741,957 issued August 21, 1998 (Deboer) in view of Cerdan et al (1998) Molecular Reproduction and Development 49, 236-245

Deboer teaches the production of transgenic bovines producing growth hormone in their milk (column 31, line 46 to column 34, line 61). Deboer teaches the superovulation of female bovines and artificially inseminating them with semen from a transgenic male bovine (column 57, lines 20-27). Cerdan teaches a plasmid comprising a DNA sequence encoding human growth hormone operably linked to a bovine β -casein promoter, where the plasmid also contains a gene for ampicillin resistance, β -lactamase (page 237). Cerdan teaches a plasmid comprising a DNA sequence encoding human growth hormone operably linked to a bovine β -casein promoter, where the plasmid also contains a gene for ampicillin resistance, β -lactamase (page 237). Thus, at the time of the instant invention, it would have been obvious to produce a bovine producing human growth hormone in its milk where the cells of the mammal comprise a DNA sequence encoding human growth hormone as taught by Deboer in view of Cerdan and to superovulate nontransgenic females and inseminate them with semen from the transgenic male bovine to produce additional transgenic bovines. Given these teachings, it would also have been obvious to superovulate a transgenic female bovine and inseminate her with semen from a nontransgenic male bovine or from a transgenic bovine to produce additional bovines.

Claims 30-48 lack an inventive step under PCT Article 33(3) as being obvious over US 5,741,957 issued August 21, 1998 (Deboer) in view of Cerdan et al (1998) Molecular Reproduction and Development 49, 236-245

Deboer teaches the production of transgenic bovines producing growth hormone in their milk (column 31, line 46 to column 34, line 61). Deboer teaches methods of purifying from milk human serum albumin and human lactoferrin from milk by methods comprising precipitation to remove caseins (column 19, lines 50-54 and column 35, lines 57-61). The clarification step is followed by various modes of chromatography (column 36, lines 10-36). It is routine in the art at the time of the instant invention to vary chromatography procedures to increase yield. Cerdan teaches a plasmid comprising a DNA sequence encoding human growth hormone operably linked to a bovine β -casein promoter, where the plasmid also contains a gene for ampicillin resistance, β -lactamase (page 237). Cerdan teaches a plasmid comprising a DNA sequence encoding human growth hormone operably linked to a bovine β -casein promoter, where the plasmid also contains a gene for ampicillin resistance, β -lactamase (page 237). Thus, at the time of the instant invention, it would have been obvious to purify human growth hormone from the milk of transgenic bovines expressing a human growth hormone DNA sequences in their milk as taught by Deboer in view of Cerdan.

NEW CITATIONS

VII-3-1	Declaration: Entitlement to claim priority Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to claim the priority of the earlier application specified below, where the applicant is not the applicant who filed the earlier application or where the applicant's name has changed since the filing of the earlier application (Rules 4.17(iii) and 51bis.1(a)(iii)) Name	in relation to this international application STERRENBELD BIOTECHNOLOGIE NORTH AMERICA, INC. is entitled to claim priority of earlier application No. 60/506,735 by virtue of the following:
VII-3-1(i)		STERRENBELD BIOTECHNOLOGIE NORTH AMERICA, INC. is entitled as employer of the inventor, MELO, Carlos, Alberto
VII-3-1(j)		STERRENBELD BIOTECHNOLOGIE NORTH AMERICA, INC. is entitled as employer of the inventor, BARANAO, Lino
VII-3-1(k)		STERRENBELD BIOTECHNOLOGIE NORTH AMERICA, INC. is entitled as employer of the inventor, CARBONETTO, Cesar
VII-3-1(l)	This declaration is made for the purposes of:	all designations

VIII-3-2	Declaration: Entitlement to claim priority Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to claim the priority of the earlier application specified below, where the applicant is not the applicant who filed the earlier application or where the applicant's name has changed since the filing of the earlier application (Rules 4.17(II) and 51bis.1(a)(II)) Name	in relation to this international application STERRENBEID BIOTECHNOLOGIE NORTH AMERICA, INC. is entitled to claim priority of earlier application No. 60/556,026 by virtue of the following:
VIII-3-2(i)		STERRENBEID BIOTECHNOLOGIE NORTH AMERICA, INC. is entitled as employer of the inventor, MELLO, Carlos, Alberto
VIII-3-2(i)		STERRENBEID BIOTECHNOLOGIE NORTH AMERICA, INC. is entitled as employer of the inventor, BARANAO, Lino
VIII-3-2(i)		STERRENBEID BIOTECHNOLOGIE NORTH AMERICA, INC. is entitled as employer of the inventor, CARBONETTO, Cesar
VIII-3-2(x)	This declaration is made for the purposes of	all designations

VII-3-3	Declaration: Entitlement to claim priority Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to claim the priority of the earlier application specified below, where the applicant is not the applicant who filed the earlier application or where the applicant's name has changed since the filing of the earlier application (Rules 4.17(ii) and 81bis.1(ii)(B)) Name	in relation to this international application STERRENBEID BIOTECHNOLOGIE NORTH AMERICA, INC. is entitled to claim priority of earlier application No. 60/506,736 by virtue of the following:
VII-3-3(i)		STERRENBEID BIOTECHNOLOGIE NORTH AMERICA, INC. is entitled as employer of the inventor, MELO, Carlos, Alberto
VII-3-3(i)		STERRENBEID BIOTECHNOLOGIE NORTH AMERICA, INC. is entitled as employer of the inventor, BARANAO, Lino
VII-3-3(i)		STERRENBEID BIOTECHNOLOGIE NORTH AMERICA, INC. is entitled as employer of the inventor, CARBONETTO, Cesar
VII-3-3(x)	This declaration is made for the purposes of	all designations

VII-3-4	Declaration: Entitlement to claim priority Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to claim the priority of the earlier application specified below, where the applicant is not the applicant who filed the earlier application or where the applicant's name has changed since the filing of the earlier application (Rules 4.17(II) and 51bis.1(a)(II)) Name	in relation to this international application STERRENBELO BIOTECHNOLOGIE NORTH AMERICA, INC. is entitled to claim priority of earlier application No. 60/556,027 by virtue of the following:
VII-3-4(i)		STERRENBELO BIOTECHNOLOGIE NORTH AMERICA, INC. is entitled as employer of the inventor, MELO, Carlos, Alberto
VII-3-4(i)		STERRENBELO BIOTECHNOLOGIE NORTH AMERICA, INC. is entitled as employer of the inventor, BARANAO, Lino
VII-3-4(i)		STERRENBELO BIOTECHNOLOGIE NORTH AMERICA, INC. is entitled as employer of the inventor, CARBONETTO, Cesar
VIII-3-4(x)	This declaration is made for the purposes of:	all designations

Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISION DE NUEVAS CREACIONES EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT	
(21) N° de solicitud: 06-39628		(51) Int Cl: C12N 015/000, A61K 67/27, C12P 21/00, A61P 5/06	
22) Fecha de solicitud: 2005.04.26		(71) Solicitante(s) STERRENBELD BIOTECHNOLOGIE NORTH AMERICA, INC.	
(30) Prioridad	(31) No. Prioridad	(32) Fecha	(33) País
	80/508,735	30/09/03	US
	80/508,736	30/09/03	US
	80/556,027	25/03/04	US
	80/556,026	25/03/04	US
		(72) Inventor(es) CARLOS ALBERTO MELO LINO BARANAO CESAR CARBONNETTO	
		(74) Apoderado: EMILIO FERRERO	
(85) Fecha limite inicio fase nacional: 30 de abril 2006		(87) Publicación internacional	
(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT		Fecha: 14 de abril de 2005	
Fecha de presentación de la solicitud: 29/09/2004		N° publicación: WO 2005/033274 A3	
No. de solicitud PCT/US2004/031819			
(54) Título: UN PROCESO PARA PRODUCIR PROTEINA EXOGENA EN LA LECHE DE MAMIFEROS TRANSGENICOS Y UN PROCESO PARA PURIFICAR PROTEINAS DE ESTA MANERA.			

Reivindicación(es):

1. Un plásmido que comprende un gen que codifica una proteína de interés operablemente ligada a un promotor de beta caseína y a un gen β lactamasa.
2. El plásmido de la reivindicación 1, en donde dicha proteína de interés es una hormona de crecimiento.
3. El plásmido de la reivindicación 2, en donde dicha hormona de crecimiento es una hormona de crecimiento de mamífero.
4. El plásmido de la reivindicación 3, en donde dicha hormona de crecimiento mamario es hormona de crecimiento humano, hormona de crecimiento bovino, hormona de crecimiento porcino, hormona de crecimiento ovino, hormona de crecimiento caprino, u hormona de crecimiento de roedor.
5. El plásmido de la reivindicación 4, en donde dicha hormona de crecimiento mamario es una hormona de crecimiento humano.
6. El plásmido de la reivindicación 5, que es pR β hGH.
7. El plásmido de la reivindicación 6, que comprende adicionalmente un gen de resistencia a la neomicina.
8. El plásmido de la reivindicación 7, que es pRNeo.
9. El plásmido de la reivindicación 8, que comprende adicionalmente un gen que codifica una proteína verde fluorescente (GFP) ligada operablemente a un promotor de citomegalovirus (CMV).
10. El plásmido de la reivindicación 9, que es pRNeoGreen.
11. El plásmido de la reivindicación 5, en donde el promotor de beta caseína comprende 1230 bp del promotor beta caseína de longitud completa y 49 bp del primer exón no codificado del gen beta caseína.

12. El plásmido de la reivindicación 11, que comprende adicionalmente un gen de resistencia a la neomicina.
13. El plásmido de la reivindicación 12, que es pVE β cashGH.
14. Un fragmento lineal del plásmido de acuerdo con la reivindicación 8, en donde dicho gen β lactamasa se separa por digestión con ApaLI.
15. Un fragmento lineal del plásmido de acuerdo con la reivindicación, 10, en donde dicho gen β lactamasa se separa por digestión con ApaLI.
16. Un fragmento lineal del plásmido de acuerdo con la reivindicación 13, en donde dicho gen β lactamasa se separa por digestión con ApaLI.
17. El plásmido pR β hGH.
18. El plásmido pRNeo
19. El plásmido pRNeoGreen.
20. Un método para transfección de construcciones genéticas de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 19 dentro de células de mamíferos, que comprende la combinación de lípidos catiónicos para utilización de liposoma.
21. Un mamífero transgénico no humano que produce una hormona de crecimiento recombinante en su leche.
22. El mamífero transgénico no humano de la reivindicación 21, en donde dicho mamífero es de la especie bovina, especie porcina, especie ovina, especie caprina o especie de roedores.
23. El mamífero transgénico no humano de la reivindicación 22, en donde dicho mamífero es de la especie bovina.
24. El mamífero transgénico no humano de la reivindicación 21, en donde dicha hormona de crecimiento es una hormona de crecimiento de mamífero.



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

Delegatura de Propiedad Industrial División de Nuevas Creaciones

REQUISITOS NECESARIOS PARA PRESENTACIÓN Y AGILIZACIÓN DEL TRAMITE

		USUARIO	RADICADOR
PATENTE DE INVENCION ()	MODELO DE UTILIDAD ()	()	()
-Indicación de que se solicita la concesión de una patente.		()	()
-Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud.		()	()
-Descripción de la invención.		()	()
-Dibujos de ser estos pertinentes.		()	()
-Comprobante de Pago de las tasas establecidas.		()	()
COMPLETA ()	INCOMPLETA ()	()	()
DISEÑO INDUSTRIAL ()			
-Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial.		()	()
-Datos de identificación del solicitante o de la persona que se 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 ()			
-Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial.		()	()
-Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud.		()	()
-Representación gráfica del Esquema Trazado.		()	()
-Comprobante de Pago de las tasas establecidas.		()	()
COMPLETA ()	INCOMPLETA ()	()	()

Firma Responsable:

Fecha:

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

Doctor(a)
FERRERO EMILIO

REFERENCIA	Radicación No.	06 39628
	Solicitud internacional	US2004/031819
	Fecha inicio fase nacional	30/04/2006
	Trámite	11
	Evento	379
	Actuación	430
	Oficio No.	8444

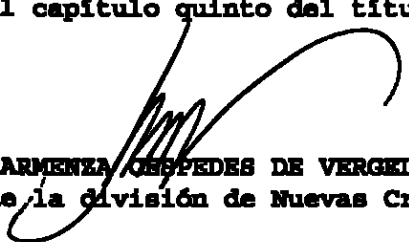
Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se 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. (Art. 26-k) Decisión 486.

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

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 Unica No.10 de 2001.


ALIX CARMONA OSPEDES DE VERGEL
 Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 04 AGO. 2008
 jramos

1
040608.