(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2010-528677
(P2010-528677A)
(43)公表日　平成22年8月26日(2010.8.26)

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード（参考）
C12N 15/09	(2006.01)	C12N 15/00	ZNAA	4B024
A01K 67/027	(2006.01)	A01K 67/027		

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 30 頁）

(21)出願番号	特願2010-512195 (P2010-512195)
(86)(22)出願日	平成20年6月13日 (2008.6.13)
(85)翻訳文提出日	平成22年1月25日 (2010.1.25)
(86)国際出願番号	PCT/US2008/007398
(87)国際公開番号	WO2008/156668
(87)国際公開日	平成20年12月24日 (2008.12.24)
(31)優先権主張番号	60/929,098
(32)優先日	平成19年6月13日 (2007.6.13)
(33)優先権主張国	米国 (US)
(31)優先権主張番号	60/929,095
(32)優先日	平成19年6月13日 (2007.6.13)
(33)優先権主張国	米国 (US)

(71)出願人　501177322
スターンベルド　バイオテクノロジー　ノース　アメリカ，　インコーポレイテッド
アメリカ合衆国　デラウェア　１９８０１，　ウィルミントン，　オレンジ　ストリート　１２０９
(74)代理人　100078282
弁理士　山本　秀策
(74)代理人　100062409
弁理士　安村　高明
(74)代理人　100113413
弁理士　森下　夏樹

最終頁に続く

(54)【発明の名称】乳中に外因性タンパク質を産生するトランスジェニック哺乳動物

(57)【要約】
本発明は、哺乳動物に対して毒性であり得る目的のタンパク質の産生に有用な、非ヒトトランスジェニック哺乳動物に関連する。この哺乳動物は、目的のタンパク質、好ましくは組換えヒトインスリンの不活性形態の乳中における産生に関してトランスジェニックであるという事実によって特徴付けられる。組換えヒトインスリンは哺乳動物においてある程度の生物学的活性を有し、そして哺乳動物に対して毒性であり得るので、この分子をトランスジェニック哺乳動物において産生することは不可能である。従って、本発明は、発現ベクターにおいてβカゼインプロモーターのコントロール下にある、修飾ヒトインスリン前駆体をコードする配列を含む遺伝的構築物をクローニングすることを含む。また、発現プラスミドを、線維芽細胞のような、胎仔ウシ体細胞にトランスフェクトすること、および核移植によってウシ卵母細胞を除核してトランスジェニック胚を産生することを含む。

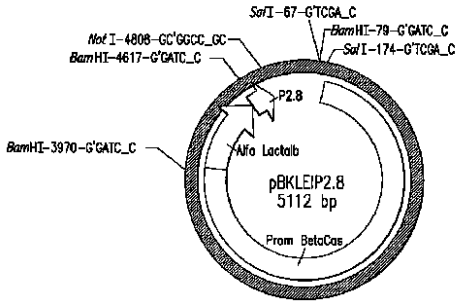


FIG.4

【特許請求の範囲】
【請求項１】
βカゼインプロモーターに作動可能に連結した、修飾インスリン前駆体をコードする核酸配列を含む、プラスミド。
【請求項２】
前記修飾インスリン前駆体が修飾哺乳動物インスリン前駆体である、請求項１に記載のプラスミド。
【請求項３】
前記修飾哺乳動物インスリン前駆体が、修飾ヒトインスリン前駆体、修飾ウシインスリン前駆体、修飾ブタインスリン前駆体、修飾ヒツジインスリン前駆体、修飾ヤギインスリン前駆体、または修飾げっ歯類インスリン前駆体である、請求項２に記載のプラスミド。
【請求項４】
前記修飾哺乳動物インスリン前駆体が修飾ヒトインスリン前駆体である、請求項３に記載のプラスミド。
【請求項５】
抗生物質耐性遺伝子をさらに含む、請求項４に記載のプラスミド。
【請求項６】
前記抗生物質耐性遺伝子がネオマイシン耐性遺伝子である、請求項５に記載のプラスミド。
【請求項７】
ｐβｍｈｕＩＰである、請求項６に記載のプラスミド。
【請求項８】
プラスミドｐβｍｈｕＩＰ。
【請求項９】
ヤギβカゼイン遺伝子由来のイントロンおよび非翻訳エキソンをコードする核酸配列を含む、ヤギβカゼインプロモーターをコードする核酸配列およびニワトリβグロビンインスレーターの断片をコードする核酸配列をさらに含む、請求項６に記載のプラスミド。
【請求項１０】
ｐＮＪＫ　ＩＰである、請求項９に記載のプラスミド。
【請求項１１】
プラスミドｐＮＪＫ　ＩＰ。
【請求項１２】
βカゼイン遺伝子の第一エキソンの非翻訳断片をコードする核酸配列をさらに含む、請求項６に記載のプラスミド。
【請求項１３】
ウシαラクトアルブミン遺伝子の断片をコードする核酸配列、および前記修飾インスリン前駆体の上流にあるエンテロキナーゼ切断部位をコードする核酸配列をさらに含む、請求項１２に記載のプラスミド。
【請求項１４】
ｐβＫＬＥ　ＩＰである、請求項１３に記載のプラスミド。
【請求項１５】
プラスミドｐβＫＬＥ　ＩＰ。
【請求項１６】
前記修飾インスリン前駆体が、その乳中に該修飾インスリン前駆体を発現する非ヒトトランスジェニック動物において低血糖を引き起こさない、請求項１に記載のプラスミド。
【請求項１７】
前記修飾インスリン前駆体が修飾Ｃペプチドを含む、請求項１６に記載のプラスミド。
【請求項１８】
前記修飾Ｃペプチドが、天然に存在するプロインスリンには通常に見出されないアミノ酸を含む、請求項１７に記載のプラスミド。

【請求項１９】
前記修飾Ｃペプチドが、以下の３アミノ酸：Ａｌａ－Ａｌａ－Ｌｙｓを含む、請求項１８に記載のプラスミド。
【請求項２０】
前記修飾インスリン前駆体が修飾Ｂ鎖をさらに含む、請求項１６に記載のプラスミド。
【請求項２１】
前記修飾Ｂ鎖が、天然に存在するＢ鎖のＣ末端以外を全て含む、請求項２０に記載のプラスミド。
【請求項２２】
哺乳動物細胞に請求項１に記載のプラスミドをトランスフェクトするための方法であって、該方法は、リポソームに該プラスミドを挿入する工程、および該リポソームと該哺乳動物細胞とを接触させる工程を包含する、方法。
【請求項２３】
哺乳動物細胞へ請求項２２に記載のプラスミドをトランスフェクトするための方法であって、リポソームは陽イオン性脂質である、方法。
【請求項２４】
その乳中に修飾インスリン前駆体を産生する非ヒトトランスジェニック哺乳動物。
【請求項２５】
前記哺乳動物が、ウシ種、ブタ種、ヒツジ種、ヤギ種またはげっ歯類種である、請求項２４に記載の非ヒトトランスジェニック哺乳動物。
【請求項２６】
前記哺乳動物がウシ種である、請求項２５に記載の非ヒトトランスジェニック哺乳動物。
【請求項２７】
前記修飾インスリン前駆体が修飾哺乳動物インスリン前駆体である、請求項２４に記載の非ヒトトランスジェニック哺乳動物。
【請求項２８】
前記修飾哺乳動物インスリン前駆体が、修飾ヒトインスリン前駆体、修飾ウシインスリン前駆体、修飾ブタインスリン前駆体、修飾ヒツジインスリン前駆体、修飾ヤギインスリン前駆体、または修飾げっ歯類インスリン前駆体である、請求項２７に記載の非ヒトトランスジェニック哺乳動物。
【請求項２９】
前記修飾哺乳動物インスリン前駆体が修飾ヒトインスリン前駆体である、請求項２８に記載の非ヒトトランスジェニック哺乳動物。
【請求項３０】
前記修飾インスリン前駆体が、前記非ヒトトランスジェニック動物において低血糖を引き起こさない、請求項２４に記載の非ヒトトランスジェニック哺乳動物。
【請求項３１】
前記修飾インスリン前駆体が修飾Ｃペプチドを含む、請求項３０に記載の非ヒトトランスジェニック哺乳動物。
【請求項３２】
前記修飾Ｃペプチドが、天然に存在するプロインスリンには通常に見出されないアミノ酸を含む、請求項３１に記載の非ヒトトランスジェニック哺乳動物。
【請求項３３】
前記修飾Ｃペプチドが、以下の３アミノ酸：Ａｌａ－Ａｌａ－Ｌｙｓを含む、請求項３２に記載の非ヒトトランスジェニック哺乳動物。
【請求項３４】
前記修飾インスリン前駆体が修飾Ｂ鎖をさらに含む、請求項３１に記載の非ヒトトランスジェニック哺乳動物。
【請求項３５】

前記修飾Ｂ鎖が、天然に存在するＢ鎖のＣ末端以外を全て含む、請求項３４に記載の非ヒトトランスジェニック哺乳動物。

【請求項３６】

前記哺乳動物のゲノムは組み込まれたプラスミドを含み、該プラスミドは修飾インスリン前駆体をコードする配列を含み、該配列は、該哺乳動物の乳腺細胞において該配列の発現を誘導するプロモーターに作動可能に連結されている、請求項２４に記載の非ヒトトランスジェニック哺乳動物。

【請求項３７】

前記哺乳動物が、ウシ種、ブタ種、ヒツジ種、ヤギ種またはげっ歯類種である、請求項３６に記載の非ヒトトランスジェニック哺乳動物。

【請求項３８】

前記哺乳動物がウシ種である、請求項３７に記載の非ヒトトランスジェニック哺乳動物。

【請求項３９】

前記修飾インスリン前駆体が修飾哺乳動物インスリン前駆体である、請求項２４に記載の非ヒトトランスジェニック哺乳動物。

【請求項４０】

前記修飾哺乳動物インスリン前駆体が、修飾ヒトインスリン前駆体、修飾ウシインスリン前駆体、修飾ブタインスリン前駆体、修飾ヒツジインスリン前駆体、修飾ヤギインスリン前駆体、または修飾げっ歯類インスリン前駆体である、請求項３９に記載の非ヒトトランスジェニック哺乳動物。

【請求項４１】

前記修飾哺乳動物インスリン前駆体が修飾ヒトインスリン前駆体である、請求項４０に記載の非ヒトトランスジェニック哺乳動物。

【請求項４２】

前記プロモーターがβカゼインプロモーターである、請求項４１に記載の非ヒトトランスジェニック哺乳動物。

【請求項４３】

前記プラスミドが抗生物質耐性遺伝子をさらに含む、請求項４２に記載の非ヒトトランスジェニック哺乳動物。

【請求項４４】

前記抗生物質耐性遺伝子がネオマイシン耐性遺伝子である、請求項４３に記載の非ヒトトランスジェニック哺乳動物。

【請求項４５】

前記プラスミドがｐβｍｈｕＩＰである、請求項４４に記載の非ヒトトランスジェニック哺乳動物。

【請求項４６】

その乳中に修飾ヒトインスリン前駆体を産生するウシ種の非ヒトトランスジェニック哺乳動物であって、該哺乳動物のゲノムは組み込まれたプラスミドを含み、該プラスミドは、修飾ヒトインスリン前駆体をコードする配列および該哺乳動物の乳腺細胞において該配列の発現を誘導するβカゼインプロモーターを含む、非ヒトトランスジェニック哺乳動物。

【請求項４７】

前記プラスミドがネオマイシン耐性遺伝子をさらに含む、請求項４６に記載の非ヒトトランスジェニック哺乳動物。

【請求項４８】

前記プラスミドがｐβｍｈｕＩＰである、請求項４７に記載の非ヒトトランスジェニック哺乳動物。

【請求項４９】

前記組み込まれたプラスミドが、前記哺乳動物の体細胞および生殖細胞において見出さ

れる、請求項４８に記載の非ヒトトランスジェニック哺乳動物。
【請求項５０】
前記修飾ヒトインスリン前駆体が、前記非ヒトトランスジェニック動物において低血糖を引き起こさない、請求項４６に記載の非ヒトトランスジェニック哺乳動物。
【請求項５１】
前記修飾ヒトインスリン前駆体が修飾Ｃペプチドを含む、請求項５０に記載の非ヒトトランスジェニック哺乳動物。
【請求項５２】
前記修飾Ｃペプチドが、天然に存在するプロインスリンには通常に見出されないアミノ酸を含む、請求項５１に記載の非ヒトトランスジェニック哺乳動物。
【請求項５３】
前記修飾Ｃペプチドが、以下の３アミノ酸：Ａｌａ－Ａｌａ－Ｌｙｓを含む、請求項５２に記載の非ヒトトランスジェニック哺乳動物。
【請求項５４】
前記修飾ヒトインスリン前駆体が修飾Ｂ鎖をさらに含む、請求項５１に記載の非ヒトトランスジェニック哺乳動物。
【請求項５５】
前記修飾Ｂ鎖が、天然に存在するＢ鎖のＣ末端以外を全て含む、請求項５４に記載のプラスミド。
【請求項５６】
非ヒトトランスジェニック哺乳動物を作製する方法であって、該方法は：
ａ）修飾インスリン前駆体をコードする核酸配列をプラスミドにクローニングし、それによって、該配列を、乳腺細胞において該配列の発現を誘導するプロモーターに作動可能に連結し、発現プラスミドを得る工程；
ｂ）該発現プラスミドが体細胞のゲノムに組み込まれるように該体細胞を該プラスミドでトランスフェクトして、トランスジェニック体細胞を得る工程；
ｃ）成熟卵母細胞を除核し、除核した卵母細胞を得る工程；
ｄ）該トランスジェニック体細胞のうちの１つを該除核した卵母細胞と融合して、単一細胞の胚を得る工程；
ｅ）該胚を受容性の哺乳動物の子宮に移植する工程；ならびに
ｆ）該トランスジェニック哺乳動物の出産まで妊娠をモニターする工程、
を包含する、方法。
【請求項５７】
前記プロモーターがβカゼインプロモーターであり、前記修飾インスリン前駆体が修飾ヒトインスリン前駆体である、請求項５６に記載の方法。
【請求項５８】
前記発現プラスミドがネオマイシン耐性遺伝子をさらに含む、請求項５７に記載の方法。
【請求項５９】
前記発現プラスミドがｐβｍｈｕＩＰである、請求項５８に記載の方法。
【請求項６０】
前記哺乳動物が、その乳中に修飾ヒトインスリン前駆体を産生するウシであり、該哺乳動物のゲノムは組み込まれたプラスミドを含み、該プラスミドは、該修飾ヒトインスリン前駆体をコードする配列および該哺乳動物の乳腺細胞において該配列の発現を誘導するβカゼインプロモーターを含む、請求項５６に記載の方法。
【請求項６１】
前記プラスミドがネオマイシン耐性遺伝子をさらに含む、請求項６０に記載の方法。
【請求項６２】
前記プラスミドがｐβｍｈｕＩＰである、請求項６１に記載の方法。
【請求項６３】

前記体細胞が線維芽細胞である、請求項５６に記載の方法。
【請求項６４】
前記トランスジェニック体細胞が、その乳中において前記修飾インスリン前駆体を産生するためにトランスジェニックであるメスからの単離によって得られる、請求項５６に記載の方法。
【請求項６５】
前記トランスジェニック体細胞が線維芽細胞である、請求項６４に記載の方法。
【請求項６６】
乳腺細胞において遺伝子の発現を誘導するプロモーターに作動可能に連結された、前記修飾インスリン前駆体をコードする配列が、前記哺乳動物の体細胞および生殖細胞において見出される、請求項５６または６４に記載の方法。
【請求項６７】
前記哺乳動物が、ウシ種、ブタ種、ヒツジ種、ヤギ種またはげっ歯類種である、請求項５６または６４に記載の方法。
【請求項６８】
前記哺乳動物がウシ種である、請求項６７に記載の方法。
【請求項６９】
前記修飾インスリン前駆体が修飾哺乳動物インスリン前駆体である、請求項５６または６４に記載の方法。
【請求項７０】
前記修飾哺乳動物インスリン前駆体が、修飾ヒトインスリン前駆体、修飾ウシインスリン前駆体、修飾ブタインスリン前駆体、修飾ヒツジインスリン前駆体、修飾ヤギインスリン前駆体、または修飾げっ歯類インスリン前駆体である、請求項６９に記載の方法。
【請求項７１】
前記修飾哺乳動物インスリン前駆体が修飾ヒトインスリン前駆体である、請求項７０に記載の方法。
【請求項７２】
前記修飾インスリン前駆体が、前記非ヒトトランスジェニック動物において低血糖を引き起こさない、請求項５６または６４に記載の方法。
【請求項７３】
前記修飾インスリン前駆体が修飾Ｃペプチドを含む、請求項７２に記載の方法。
【請求項７４】
前記修飾Ｃペプチドが、天然に存在するプロインスリンには通常に見出されないアミノ酸を含む、請求項７３に記載の方法。
【請求項７５】
前記修飾Ｃペプチドが、以下の３アミノ酸：Ａｌａ－Ａｌａ－Ｌｙｓを含む、請求項７４に記載の方法。
【請求項７６】
前記修飾インスリン前駆体が修飾Ｂ鎖をさらに含む、請求項７３に記載の方法。
【請求項７７】
前記修飾Ｂ鎖が、天然に存在するＢ鎖のＣ末端以外を全て含む、請求項７６に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【背景技術】
【０００１】
ヒト医療に関わるタンパク質因子およびホルモンは、過去数十年来、製薬産業によって、抽出または組換え技術によって産生されてきた。望ましい遺伝子を含む遺伝構築物の発現を、細菌、酵母、または哺乳動物細胞系統において成功裏に達成した。しかし、適当な糖鎖付加パターンを必要とするもののような、複雑なタンパク質を得るための哺乳動物細胞培養の使用は、高コストの手順を含む。

【０００２】
商業的に重要な生物学的材料の産生のために、過去数十年にますます組換えＤＮＡ技術が使用されてきた。そのために、様々な医学的に重要なヒトタンパク質をコードするＤＮＡ配列がクローニングされた。これらは、インスリン、プラスミノーゲン活性化因子、アルファ１－アンチトリプシン、および凝固因子ＶＩＩＩおよびＩＸを含む。現在、新興の組換えＤＮＡ技術によっても、これらのタンパク質は通常、血液および組織から精製され、それはＡＩＤＳおよび肝炎を引き起こすもののような感染性の病原菌を伝染させるリスクを有し得る、高価なおよび時間のかかる過程である。

【０００３】
望ましい医学的に重要なタンパク質を産生するための、細菌におけるＤＮＡ配列の発現は魅力的な提案のようであるが、実際は、多くの場合、細菌細胞においては、外来タンパク質は不安定であり、そして正しくプロセシングされないので、細菌は宿主として不十分であることが判明する。

【０００４】
この問題を認識して、哺乳動物組織培養物におけるクローニングされた遺伝子の発現が試みられ、そしてある例では実現性のある戦略であることが判明した。しかし、哺乳動物細胞のバッチ発酵は、高価であり、そして技術的に大変な過程である。

【０００５】
従って、正しく修飾された真核細胞ポリペプチドのような、生物学的物質の産生のための、高収率、低コストの過程に対する必要性が存在する。ヒトに対して感染性である病原体の欠如は、そのような過程における利点である。

【０００６】
乳中に大量のヒトタンパク質を得る目的で、望ましい遺伝子の、ウシのようなトランスジェニック哺乳動物を得る可能性は、業界にとって大きな関心であった。文献においていくつかのグループが、トランスジェニックウシまたはヤギにおける、ヒト血清アルブミン、アルファアンチトリプシン、およびいくつかの他の例の産生における成功を報告している。

【０００７】
以前にマウスまたはラットにおいて、多くの実験が行われ、そして授乳中のメスにおいて乳腺転写因子にのみ反応する、βカゼインまたはラクトアルブミンプロモーターが採用されたので、導入遺伝子の発現は常に乳腺に限られることが好ましかった。

【０００８】
乳中のみにおける異種性タンパク質の発現は、宿主哺乳動物の健康に対する望ましくない影響を避け、そして精製のための容易な方法を提供することを意味する。

【０００９】
細菌または細胞培養物中の異種性タンパク質の発現は、宿主哺乳動物に対する組換えタンパク質の毒性効果によって阻害または妨害され得る。あるタンパク質が、天然には無毒性のものでさえ、宿主にとって有害であり、死さえも引き起こすために、特定のシステムにおいて発現できない多くの例を、文献中に見出し得る。死因は、細胞内の高濃度のタンパク質、高濃度の分泌されたタンパク質、または外来性の宿主において細胞変性活動を引き起こす、タンパク質およびいくつかの細胞成分との特異的相互作用であり得る。

【００１０】
これらの欠点を克服して、毒性タンパク質の異種性遺伝子発現を達成するために、融合タンパク質を用いること、もとのタンパク質配列を修飾すること、タンパク質の異なるポリペプチドを別々に発現すること等を含む、いくつかの方法が開発された（非特許文献１を参照のこと）。

【００１１】
トランスジェニックウシにおいて組換えタンパク質を発現する場合、同様の効果を得ることができる。トランスジェニック哺乳動物の産生において、細胞をトランスフェクトして、目的の異種性遺伝子を有するトランスジェニッククローンを得て、そして次いでそれ

を使用してトランスジェニック哺乳動物を産生する。この過程は一般的に、目的の配列の宿主ゲノムへの挿入を引き起こし、それは次に、もし特異的なプロモーターを使用したなら標的組織または腺における、またはもし一般的なプロモーターを採用したなら全身性の、異種性タンパク質の発現を引き起こす。タンパク質発現のレベルは、挿入が起こったゲノム内の位置を含む、様々な因子に依存する。

【００１２】

遺伝子発現が、組織特異的プロモーターによって誘導される場合でも、外来性タンパク質の末梢循環システムへの漏出が、いくつかのタンパク質で多くの異なる哺乳動物種において観察された（Ｌｉｆｅ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ、２００６年1月 ２５；７８（９）：１００３－９、Ｅｐｕｂ ２００５年9月１５日；ならびにＪｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ、２００６年7月 １３；１２４（２）：４６９－７２、Ｅｐｕｂ ２００６年5月２３日を参照のこと）。この漏出は、発現のレベル、漏出のレベル、異種性タンパク質の性質、種間の関係（宿主および外来性タンパク質）および異種性タンパク質の宿主受容体と相互作用する能力に依存して、関連する生物学的結果を有し得る。宿主相同性タンパク質との類似性を考慮して、これら遺伝子導入で発現したタンパク質のいくつかは、外来性の宿主においてその天然の生物学的活性を発揮し得、そしてその哺乳動物の死を引き起こし得る病理学的効果を引き起こし得る（非特許文献２を参照のこと）。それに加えて、その異種性タンパク質は、対応する相同性宿主受容体との相互作用によって、哺乳動物の健康に影響を与えないが、いくつかの異種性タンパク質が細菌において発現した場合に起こる、毒性の非特異的効果によって影響を与える可能性がある。

【００１３】

本発明は、哺乳動物に対して毒性効果を有する、タンパク質のトランスジェニック哺乳動物における発現に現在関連する欠点に対して、革命的な解決策を提供する。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【００１４】

【非特許文献１】Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ ａｎｄ Ｐｕｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ、２００１年8月；２２（３）：４２２－９

【非特許文献２】Ｅｎｄｏｃｒｉｎｏｌｏｇｙ １９９７年7月；１３８（７）：２８４９－５５

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【００１５】

本発明は、哺乳動物に対して毒性であり得る、目的のタンパク質の産生に有用な、非ヒト哺乳動物に関連する。この哺乳動物は、目的のタンパク質の不活性形態の、その乳における産生に関してトランスジェニックであるという事実によって特徴付けられる。目的のタンパク質の不活性形態は、目的のタンパク質を発現する非ヒトトランスジェニック哺乳動物に対して毒性ではない、目的のタンパク質の形式である。本明細書中で使用される場合、毒性は、重篤な害または死亡を引き起こすことを意味する。目的のタンパク質の不活性形態は、目的のタンパク質の不活性形態を発現する非ヒトトランスジェニック哺乳動物において、いくらかの生物学的活性を有し得る；しかし、目的のタンパク質の不活性形態は、その非ヒトトランスジェニック哺乳動物に対して毒性ではない（すなわち、その哺乳動物は死なない、および重篤な害をこうむらない）。そのタンパク質の不活性形態は、インビトロで活性化され得る。あるいは非天然種のタンパク質である、この不活性タンパク質は、組換え修飾ヒトインスリン前駆体であり得るが、それに限らない。目的のタンパク質は、組換えヒトインスリンであり得るが、それに限らない。その非ヒトトランスジェニック哺乳動物は、ウシ種の哺乳動物であり得るが、それに限らない。

【００１６】

本発明はさらに、哺乳動物の乳腺細胞（ｍａｍｍａｒｙ ｃｅｌｌ）において目的のタンパク質の不活性形態の発現を提供するプラスミドに関連し、ここでその発現は、βカゼ

インプロモーターによって調節される。

【００１７】

本発明はさらに、非ヒトトランスジェニック哺乳動物に毒性であり得る目的のタンパク質の、非ヒトトランスジェニック哺乳動物を採用する産生の方法に関連する。そのタンパク質の潜在的な毒性を、そのタンパク質を不活性タンパク質として発現することによって回避する。あるいはそのタンパク質の非天然種である、この不活性タンパク質は、組換え修飾ヒトインスリン前駆体であり得るが、それに限らない。目的のタンパク質は、組換えヒトインスリンであり得るが、それに限らない。その非ヒトトランスジェニック哺乳動物は、ウシ種の哺乳動物であり得るが、それに限らない。

【００１８】

本発明はまた、その乳中に組換え修飾インスリン前駆体を産生する、非ヒトトランスジェニック哺乳動物を作製すること、その非ヒトトランスジェニック哺乳動物から乳を得る工程、その乳から前駆体を精製すること、組換えインスリンを得るために精製した前駆体に酵素的切断およびペプチド転移を行うこと、および組換えインスリンを精製することを含む、組換えインスリンを産生する方法に関連する。その組換えインスリンは、組換えヒトインスリンであり得るが、それに限らない。そのトランスジェニック哺乳動物は、ウシ種の哺乳動物であり得るが、それに限らない。

【図面の簡単な説明】

【００１９】

【図１】図１は、修飾ヒトインスリン前駆体（ｍｈｕＩＰ）をコードする遺伝子配列、および乳腺細胞にその発現を誘導するプロモーターを含む、発現プラスミドｐβｍｈｕＩＰの模式図を示す。

【図２】図２は、ｍｈｕＩＰをコードする配列を含む、開始構築物の模式図を示す。

【図３】図３は、修飾ヒトインスリン前駆体（ｍｈｕＩＰ）をコードする遺伝子配列、乳腺細胞にその発現を誘導するプロモーター、およびニワトリβグロビンインスレーターのコーディング配列の断片を含む、発現プラスミドｐＮＪＫ　ＩＰの模式図を示す。

【図４】図４は、修飾ヒトインスリン前駆体（ｍｈｕＩＰ）をコードする配列、乳腺細胞にその発現を誘導するプロモーター、ウシαラクトアルブミン遺伝子のコーディング配列の大きな部分、およびエンテロキナーゼ切断部位を含む、発現プラスミドｐβＫＬＥ　ＩＰの模式図を示す。

【発明を実施するための形態】

【００２０】

本発明は、哺乳動物に対して毒性であり得る、目的のタンパク質の産生のために有用な、非ヒト哺乳動物に関連する。その哺乳動物は、その乳における目的のタンパク質の不活性形態の産生に関してトランスジェニックであるという事実によって特徴付けられる。不活性タンパク質という用語は、目的のタンパク質を発現する、非ヒトトランスジェニック哺乳動物に対して毒性でない、目的のタンパク質の形式を指す。本発明のさらなる実施態様において、不活性タンパク質という用語は、さらなる翻訳後修飾なしに、生物学的活性を欠くタンパク質を指す。不活性タンパク質の例は、前駆体タンパク質（すなわちプロペプチド）、さらなるプロセシングなしにそのタンパク質を生物学的に不活性にする修飾（すなわち天然タンパク質と比較した場合のアミノ酸置換、追加、または欠失）を含むタンパク質、または修飾前駆体タンパク質（すなわち天然プロペプチドと比較した場合のアミノ酸置換、追加、または欠失を含むプロペプチド）を含む。言い換えると、目的のタンパク質の潜在的な毒性を、タンパク質を、目的のタンパク質を発現する非ヒトトランスジェニック哺乳動物を殺さない不活性タンパク質として発現することによって回避する。あるいはそのタンパク質の非天然種である、この不活性タンパク質は、以下のものの前駆体、修飾前駆体、または修飾形態であり得るが、それに限らない：抗体、ホルモン、増殖因子、酵素、凝固因子、アポリポタンパク質、受容体、薬剤、医薬品、生物製剤（ｂｉｏｃｅｕｔｉｃａｌｓ）、栄養補助食品、癌遺伝子、腫瘍抗原、腫瘍抑制因子、サイトカイン、ウイルス抗原、寄生虫抗原、および細菌抗原。好ましくは、その不活性タンパク質は、そ

の修飾インスリン前駆体を発現する非ヒトトランスジェニック哺乳動物において低血糖を引き起こさない、組換え修飾インスリン前駆体である。より好ましくは、その不活性タンパク質は、組換え修飾哺乳動物インスリン前駆体、および最も好ましくは、組換え修飾ヒトインスリン前駆体である。目的のタンパク質は、組換えインスリン、より好ましくは組換え哺乳動物インスリン、および最も好ましくは組換えヒトインスリンであり得るが、それに限らない。この非ヒト哺乳動物は、ウシ種の哺乳動物であり得るが、それに限らない。他の種のトランスジェニック哺乳動物は、ブタ種、ヒツジ種、ヤギ種、またはげっ歯類種であり得るが、それに限らない。

【００２１】

インスリンは、体内においてグルコースの輸送、利用、および貯蔵のコントロールを司る主なホルモンである。膵臓のβ細胞は、プロインスリンとして知られるインスリンの１本鎖前駆体を分泌する。プロインスリンは、３つのドメイン：アミノ末端Ｂ鎖、カルボキシル末端Ａ鎖、およびＣペプチドとして知られる、中央の連結ペプチドから成る。プロインスリンのタンパク質分解が、連結ペプチド（Ｃペプチド）と共にプロインスリン鎖におけるある塩基性アミノ酸の除去を引き起こして、生物学的に活性なポリペプチド、インスリンを生じる。

【００２２】

実施態様において、修飾タンパク質は、タンパク質の天然に存在する形態ではない、タンパク質の形式である。実施態様において、その修飾インスリン前駆体は、アミノ末端Ｂ鎖およびカルボキシル末端Ａ鎖を含む。しかし、その修飾インスリン前駆体は修飾Ｃペプチドを含む。その修飾インスリン前駆体において、天然に存在するプロインスリンにおいて見出される、連結Ｃペプチドをコードするアミノ酸が、天然に存在するプロインスリンにおいて見出されないアミノ酸によって置換される。実施態様において、その修飾Ｃペプチドは、以下の３アミノ酸：Ａｌａ－Ａｌａ－Ｌｙｓを含む。さらに、その修飾インスリン前駆体は、修飾Ｂ鎖を含み得る。実施態様において、その修飾Ｂ鎖は、天然に存在するＢ鎖のＣ末端アミノ酸以外を全て含む。

【００２３】

さらなる実施態様において、その修飾インスリン前駆体は、約６ｋＤの分子量を有する、５３アミノ酸から成る修飾ヒトインスリン前駆体である。その修飾ヒトインスリン前駆体は、天然に存在するＢ鎖のアミノ酸１－２９を有する修飾Ｂ鎖、および３アミノ酸、Ａｌａ－Ａｌａ－Ｌｙｓを有する修飾Ｃペプチドを含む。糖尿病の治療に必須であり、そしてその適用がよく確立されている、ヒトインスリンを得るために、その修飾ヒトインスリン前駆体に、酵素的切断およびペプチド転移を行い得る。

【００２４】

本発明はまた、その乳における組換え修飾ヒトインスリン前駆体の産生に関してトランスジェニックであり、その組換え修飾ヒトインスリン前駆体は、その哺乳動物を生育不能にしないという事実によって特徴付けられる、非ヒト哺乳動物に関連する。

【００２５】

本発明はさらに、組換えヒトインスリンの産生に有用な、ウシ種のトランスジェニック哺乳動物に関連する。ヒトインスリンは、ウシにおいて活性であることが公知である。トランスジェニックタンパク質は、血流に漏出し得るので、ヒトインスリンをその成熟した形式で発現するウシは、低血糖に関連する症状を示すことが予測され得る。従って、組換えヒトインスリンを発現するトランスジェニックウシは、成育不能であり得る。しかし、本発明はこの限界を克服し、そしてトランスジェニック哺乳動物に対して毒性であり得るタンパク質の、トランスジェニック哺乳動物における発現を可能にする。本発明は、目的のタンパク質の不活性形態を発現する。その不活性タンパク質を、トランスジェニック哺乳動物の乳から精製し、そしてインビトロで成熟（すなわち活性）形式のタンパク質に変換する。確実に、発現した場合にはその哺乳動物にとって有害な治療的タンパク質（例えばヒトインスリン）を産生する手段として有用な、ウシのような哺乳動物は、予期しない、そして革新的な寄与を構成する。

【００２６】
本発明はさらに、その乳中に組換え修飾インスリン前駆体を産生する、非ヒトトランスジェニック哺乳動物に関連し、そのゲノムは組み込まれたプラスミドを含み、そのプラスミドは、プロモーターと作動可能に連結した、修飾インスリン前駆体をコードする核酸配列を含み、このプロモーターは、その哺乳動物の乳腺細胞においてその配列の発現を誘導する。その非ヒト哺乳動物は、ウシ種の哺乳動物であり得るが、それに限らない。トランスジェニック哺乳動物の他の種は、ブタ種、ヒツジ種、ヤギ種、またはげっ歯類種であり得るが、それに限らない。その修飾インスリン前駆体は、修飾哺乳動物インスリン前駆体、より好ましくは修飾ヒトインスリン前駆体、修飾ウシインスリン前駆体、修飾ブタインスリン前駆体、修飾ヒツジインスリン前駆体、修飾ヤギインスリン前駆体、修飾げっ歯類インスリン前駆体、および最も好ましくは修飾ヒトインスリン前駆体であり得る。そのプロモーターは、βカゼインプロモーターであり得る。適当なβカゼインプロモーターは、ウシβカゼインプロモーター、またはヤギβカゼインプロモーターを含むがそれに限らない。他のβカゼインプロモーターは、ブタβカゼインプロモーター、ヒツジβカゼインプロモーター、またはげっ歯類βカゼインプロモーターを含むがそれに限らない。その組み込まれたプラスミドはまた、ネオマイシン耐性遺伝子のような、抗生物質耐性遺伝子を含み得る。さらに、その組み込まれたプラスミドは、ｐβｍｈｕＩＰであり得る。その組み込まれたプラスミドはまた、ｐＮＪＫ　ＩＰまたはｐβＫＬＥ　ＩＰであり得る。
【００２７】
本発明はさらに、上記で記載した組み込まれたプラスミドが、その哺乳動物の体細胞および生殖細胞の両方で見出される、非ヒトトランスジェニック哺乳動物に関連する。
【００２８】
本発明はさらに、その乳中に組換え修飾ヒトインスリン前駆体を産生する、ウシ種の非ヒトトランスジェニック哺乳動物に関連し、そのゲノムは組み込まれたプラスミドを含み、そのプラスミドは修飾ヒトインスリン前駆体をコードする核酸配列、およびその哺乳動物の乳腺細胞においてその配列の発現を誘導するβカゼインプロモーターを含む。適当なβカゼインプロモーターは、ウシβカゼインプロモーター、またはヤギβカゼインプロモーターを含むがそれに限らない。他のβカゼインプロモーターは、ブタβカゼインプロモーター、ヒツジβカゼインプロモーター、またはげっ歯類βカゼインプロモーターであり得るが、それに限らない。その組み込まれたプラスミドは、ネオマイシン耐性遺伝子のような、抗生物質耐性遺伝子を含み得る。さらに、その組み込まれたプラスミドは、ｐβｍｈｕＩＰであり得る。その組み込まれたプラスミドはまた、ｐＮＪＫ　ＩＰまたはｐβＫＬＥ　ＩＰであり得る。
【００２９】
本発明はまた、βカゼインプロモーターに作動可能に連結した修飾インスリン前駆体をコードする核酸配列、および抗生物質耐性細胞の選択を可能にする抗生物質耐性遺伝子を含むプラスミドに関連する。適当なβカゼインプロモーターは、ウシβカゼインプロモーターまたはヤギβカゼインプロモーターを含むがそれに限らない。他のβカゼインプロモーターは、ブタβカゼインプロモーター、ヒツジβカゼインプロモーター、またはげっ歯類βカゼインプロモーターを含むが、それに限らない。実施態様において、その抗生物質耐性遺伝子は、ジェネティシン耐性細胞の選択を可能にする、ネオマイシン耐性遺伝子である。そのようなプラスミドの例は、図１に示すようなｐβｍｈｕＩＰである。そのようなプラスミドのさらなる例は、図３に示すようなｐＮＪＫ　ＩＰ、および図４に示すようなｐβＫＬＥ　ＩＰである。
【００３０】
本発明はさらに、修飾インスリン前駆体をコードする核酸配列を含むプラスミドに関連し、ここでその修飾インスリン前駆体は、修飾哺乳動物インスリン前駆体である。その修飾哺乳動物インスリン前駆体は、修飾ヒトインスリン前駆体、修飾ウシインスリン前駆体、修飾ブタインスリン前駆体、修飾ヒツジインスリン前駆体、修飾ヤギインスリン前駆体、または修飾げっ歯類インスリン前駆体であり得る。実施態様において、その修飾哺乳動

物インスリン前駆体は、修飾ヒトインスリン前駆体である。

【００３１】

本発明はさらに、修飾インスリン前駆体を発現する非ヒトトランスジェニック哺乳動物において低血糖を引き起こさない、修飾インスリン前駆体をコードする核酸配列を含むプラスミドに関連する。

【００３２】

本発明はさらに、修飾Ｃペプチドを含む修飾ヒトインスリン前駆体をコードする核酸配列を含むプラスミドに関連する。その修飾ヒトインスリン前駆体において、天然に存在するヒトプロインスリンにおいて見出される連結Ｃペプチドをコードするアミノ酸が、天然に存在するプロインスリンにおいて見出されないアミノ酸によって置換される。実施態様において、その修飾Ｃペプチドは、以下の３アミノ酸：Ａｌａ－Ａｌａ－Ｌｙｓを含む。さらに、その修飾ヒトインスリン前駆体は、修飾Ｂ鎖を含み得る。実施態様において、その修飾Ｂ鎖は、天然に存在するＢ鎖のアミノ酸１－２９を含む。

【００３３】

本発明はさらに、修飾インスリン前駆体をコードする核酸配列を含むプラスミドに関連し、それはさらに１つまたはそれ以上の、プラスミドの安定性を増強する、プラスミドから転写されたｍＲＮＡの安定性を増強する、修飾インスリン前駆体の分解を低下させる、および／または修飾インスリン前駆体の発現を増加させる、さらなる遺伝因子を含む。適当な遺伝因子は、調節性エレメント（例えばプロモーター、エンハンサー、インスレーター、または転写終結点）、インスリンではない遺伝子のコーディング配列の断片、またはインスリンではない遺伝子のコーディング配列を含むがそれに限らない。実施態様において、その遺伝因子は、ニワトリβグロビンインスレーターのコーディング配列の断片である。そのようなプラスミドの例は、図３に示すようなｐＮＪＫ　ＩＰである。他の実施態様において、その遺伝因子は、ウシαラクトアルブミン遺伝子のコーディング配列の断片である。そのようなプラスミドの例は、図４に示すようなｐβＫＬＥ　ＩＰである。

【００３４】

プラスミドｐβｍｈｕＩＰ、ｐＮＪＫ　ＩＰおよびｐβＫＬＥ　ＩＰは、ブダペスト条約の合意のもとで寄託された。寄託場所の名前および住所は、ＤＳＭＺ－Ｄｅｕｔｓｃｈｅ　Ｓａｍｍｌｕｎｇ　ｖｏｎ　Ｍｉｋｒｏｏｒｇａｎｉｓｍｅｎ　ｕｎｄ　Ｚｅｌｌｋｕｌｔｕｒｅｎ　ＧｍｂＨ、Ｉｎｈｏｆｆｅｎｓｔｒ．７Ｂ、Ｄ－３８１２４　Ｂｒａｕｎｓｃｈｗｅｉｇ、Ｇｅｒｍａｎｙである。ｐβｍｈｕＩＰは、２００８年４月４日にＤＳＭＺに寄託され、そしてＤＳＭＺ寄託番号ＤＳＭ２１３５９を与えられた。ｐＮＪＫ　ＩＰは２００８年４月４日にＤＳＭＺに寄託され、そしてＤＳＭＺ寄託番号ＤＳＭ２１３６０を与えられた。ｐβＫＬＥ　ＩＰは、２００８年６月１２日にＤＳＭＺに寄託された。

【００３５】

本発明はさらに、上記で記載した遺伝的構築物をトランスフェクトする方法に関連する。実施態様において、上記で記載した遺伝的構築物を、その遺伝的構築物をリポソームに挿入し、そしてそのリポソームを哺乳動物細胞と接触させることによって、哺乳動物細胞にトランスフェクトする。そのリポソームは、陽イオン性脂質であり得る。

【００３６】

適当な培地におけるネオマイシン耐性細胞の選択の方法は、当業者に公知である。細胞の損傷を避けるために、そのような細胞を注意深く取らなければならない。

【００３７】

本発明はまた、G_0期、または細胞周期の異なる時期で停止した細胞の、除核した哺乳動物卵母細胞、最も好ましくはウシ卵母細胞への核移植の方法に関連する。

【００３８】

本発明は、哺乳動物のホルモン刺激した子宮、最も好ましくはウシの子宮への、トランスジェニック胎芽移植の方法に関連する。

【００３９】

本発明はさらに、不活性な目的のタンパク質をコードする核酸配列を、プラスミドにクローニングし、それによってその配列を、乳腺細胞におけるその配列の発現を誘導するプロモーターに作動可能に連結し、発現プラスミドを得る工程；プラスミドが細胞のゲノムに組み込まれるように、体細胞をその発現プラスミドでトランスフェクトして、トランスジェニック体細胞を得る工程；成熟卵母細胞を除核して、除核した卵母細胞を得る工程；１つのトランスジェニック体細胞を、除核した卵母細胞と融合して、単一細胞の胚を得る工程；その胚を受容性哺乳動物の子宮に移植する工程；ならびにトランスジェニック哺乳動物の出産まで妊娠をモニターする工程を含む、非ヒトトランスジェニック哺乳動物を作製する方法に関連する。その目的の不活性なタンパク質は、哺乳動物において低血糖を引き起こさない修飾インスリン前駆体であり得る。その修飾インスリン前駆体は、好ましくは修飾哺乳動物インスリン前駆体、より好ましくは修飾ヒトインスリン前駆体、修飾ウシインスリン前駆体、修飾ブタインスリン前駆体、修飾ヒツジインスリン前駆体、修飾ヤギインスリン前駆体、または修飾げっ歯類インスリン前駆体、そして最も好ましくは修飾ヒトインスリン前駆体である。その非ヒトトランスジェニック哺乳動物は、ウシ種の哺乳動物であり得るが、それに限らない。トランスジェニック哺乳動物の他の種は、ブタ種、ヒツジ種、ヤギ種、またはげっ歯類種であり得るが、それに限らない。そのプロモーターは、βカゼインプロモーターであり得る。適当なβカゼインプロモーターは、ウシβカゼインプロモーターまたはヤギβカゼインプロモーターを含むがそれに限らない。他のβカゼインプロモーターは、ブタβカゼインプロモーター、ヒツジβカゼインプロモーター、またはげっ歯類βカゼインプロモーターを含むが、それに限らない。そのプラスミドはまた、ネオマイシン耐性遺伝子のような抗生物質耐性遺伝子を含み得る。さらに、その発現プラスミドは、ｐβｍｈｕＩＰであり得る。その発現プラスミドはまた、ｐＮＪＫ　ＩＰまたはｐβＫＬＥ　ＩＰであり得る。

【００４０】

本発明はさらに、修飾Ｃペプチドを含む修飾インスリン前駆体をコードする核酸配列を含む、目的のタンパク質の不活性形態を発現する非ヒトトランスジェニック哺乳動物を作製する方法に関連する。その修飾インスリン前駆体において、天然に存在するプロインスリンにおいて見出される連結Ｃペプチドをコードするアミノ酸が、天然に存在するプロインスリンにおいて見出されないアミノ酸によって置換される。実施態様において、その修飾Ｃペプチドは、以下の３アミノ酸：Ａｌａ－Ａｌａ－Ｌｙｓを含む。さらに、その修飾インスリン前駆体は、修飾Ｂ鎖を含み得る。実施態様において、その修飾Ｂ鎖は、天然に存在するＢ鎖のＣ末端アミノ酸以外を全て含む。

【００４１】

本発明はさらに、目的のタンパク質の不活性形態を発現する、非ヒトトランスジェニック哺乳動物を作製する方法に関連し、ここで体細胞は線維芽細胞であり得る。さらに、そのトランスジェニック体細胞を、その乳中に目的のタンパク質の不活性形態を発現する、メストランスジェニック動物から単離し得る。そのトランスジェニック体細胞は、線維芽細胞であり得る。

【００４２】

本発明はさらに、目的のタンパク質の不活性形態を発現する、非ヒトトランスジェニック哺乳動物を作製する方法に関連し、ここでその目的のタンパク質の不活性形態をコードする核酸配列は、その哺乳動物の体細胞および生殖細胞の両方で見出される。

【００４３】

本発明はさらに、その乳中に組換え修飾ヒトインスリン前駆体を産生する、ウシ種の非ヒトトランスジェニック哺乳動物を作製する方法に関連し、そのゲノムは組み込まれたプラスミドを含み、そのプラスミドは修飾ヒトインスリン前駆体をコードする核酸配列およびその哺乳動物の乳腺細胞におけるその配列の発現を誘導するβカゼインプロモーターを含む。適当なβカゼインプロモーターを上記で記載する。組み込まれたプラスミドは、ネオマイシン耐性遺伝子のような、抗生物質耐性遺伝子を含み得る。さらにその組み込まれたプラスミドは、ｐβｍｈｕＩＰであり得る。その組み込まれたプラスミドはまた、ｐＮ

ＪＫ　ＩＰまたはｐβＫＬＥ　ＩＰであり得る。

【００４４】

本発明はさらに、その乳中に目的のタンパク質の不活性形態を産生する非ヒトトランスジェニック哺乳動物を作製する工程；その非ヒトトランスジェニック哺乳動物から乳を得る工程；乳からその不活性タンパク質を精製する工程；インビトロで目的のタンパク質の不活性形態を変換する工程；ならびに目的のタンパク質を精製する工程を含む、目的のタンパク質の不活性形態を産生する方法に関連し、ここで目的のタンパク質は非ヒトトランスジェニック哺乳動物に対して毒性であり得る。その不活性タンパク質は、以下のものの前駆体、修飾前駆体または修飾形態であり得るが、それに限らない：抗体、ホルモン、増殖因子、酵素、凝固因子、アポリポタンパク質、受容体、薬剤、医薬品、生物製剤、栄養補助食品、癌遺伝子、腫瘍抗原、腫瘍抑制因子、サイトカイン、ウイルス抗原、寄生虫抗原、および細菌抗原。好ましくはその不活性タンパク質は、組換え修飾インスリン前駆体、より好ましくは組換え修飾哺乳動物インスリン前駆体、および最も好ましくは組換え修飾ヒトインスリン前駆体であり得る。その非ヒトトランスジェニック哺乳動物は、ウシ種の哺乳動物であり得るが、それに限らない。トランスジェニック哺乳動物の他の種は、ブタ種、ヒツジ種、ヤギ種、またはげっ歯類種であり得るが、それに限らない。

【００４５】

本発明はまた、目的のタンパク質の不活性形態をコードする核酸配列をプラスミドにクローニングすることによって、その配列を、その配列の乳腺細胞での発現を誘導するプロモーターに作動可能に連結し、発現プラスミドを得る工程；そのプラスミドが体細胞のゲノムに組み込まれるように、そのプラスミドで体細胞、任意で線維芽細胞をトランスフェクトし、トランスジェニック体細胞を得る工程；成熟卵母細胞を除核し、除核した卵母細胞を得る工程；そのトランスジェニック体細胞のうちの１つをその除核した卵母細胞と融合して、単一細胞の胚を得る工程；その胚を受容性の哺乳動物の子宮に移植する工程；ならびにそのトランスジェニック哺乳動物の出産まで妊娠をモニターする工程を含む過程によって作製された、非ヒトトランスジェニック哺乳動物において、目的のタンパク質の不活性形態を産生する方法に関連する。その目的の不活性なタンパク質は、哺乳動物において低血糖を引き起こさない修飾インスリン前駆体であり得る。その修飾インスリン前駆体は、好ましくは修飾哺乳動物インスリン前駆体、より好ましくは修飾ヒトインスリン前駆体、修飾ウシインスリン前駆体、修飾ブタインスリン前駆体、修飾ヒツジインスリン前駆体、修飾ヤギインスリン前駆体、または修飾げっ歯類インスリン前駆体、そして最も好ましくは修飾ヒトインスリン前駆体である。その非ヒトトランスジェニック哺乳動物は、ウシ種の哺乳動物であり得るが、それに限らない。トランスジェニック哺乳動物の他の種は、ブタ種、ヒツジ種、ヤギ種、またはげっ歯類種であり得るが、それに限らない。そのプロモーターは、βカゼインプロモーターであり得る。適当なβカゼインプロモーターは、上記で記載する。そのプラスミドはまた、ネオマイシン耐性遺伝子のような抗生物質耐性遺伝子を含み得る。さらに、その発現プラスミドは、ｐβｍｈｕＩＰであり得る。そのプラスミドはまた、プラスミドの安定性を増強する、プラスミドから転写されたｍＲＮＡの安定性を増強する、修飾インスリン前駆体の分解を減少させる、および／または修飾インスリン前駆体の発現を増加させる、１つまたはそれ以上のさらなる遺伝因子を含み得る。適当な遺伝因子は、調節性エレメント（例えばプロモーター、エンハンサー、インスレーター、または転写終結点）、目的のタンパク質ではない遺伝子のコーディング配列の断片、または目的のタンパク質ではない遺伝子のコーディング配列を含むがそれに限らない。その発現プラスミドは、ｐＮＪＫ　ＩＰまたはｐβＫＬＥ　ＩＰであり得る。

【００４６】

実施態様において、目的のタンパク質の不活性形態を発現する非ヒトトランスジェニック哺乳動物を、修飾Ｃペプチドを含む修飾インスリン前駆体をコードする核酸配列を用いてクローニングする。その修飾インスリン前駆体において、天然に存在するプロインスリンにおいて見出される連結Ｃペプチドをコードするアミノ酸が、天然に存在するプロインスリンにおいて見出されないアミノ酸によって置換される。実施態様において、その修飾

Ｃペプチドは、以下の３アミノ酸：Ａｌａ－Ａｌａ－Ｌｙｓを含む。さらに、その修飾インスリン前駆体は、修飾Ｂ鎖を含み得る。実施態様において、その修飾Ｂ鎖は、天然に存在するＢ鎖のＣ末端アミノ酸以外を全て含む。

【００４７】

さらなる実施態様において、目的のタンパク質の不活性形態を発現する非ヒトトランスジェニック哺乳動物を、体細胞が線維芽細胞であり得る過程によって作製する。さらに、そのトランスジェニック体細胞を、その乳中に目的のタンパク質の不活性形態を発現するメストランスジェニック動物から単離し得る。そのトランスジェニック体細胞は、線維芽細胞であり得る。

【００４８】

さらなる実施態様において、目的のタンパク質の不活性形態をコードする核酸配列は、目的のタンパク質の不活性形態を発現する非ヒトトランスジェニック哺乳動物の体細胞および生殖細胞の両方で見出される。

【００４９】

本発明はさらに、その乳中に組換え修飾ヒトインスリン前駆体を産生する、非ヒトトランスジェニック哺乳動物において、ヒトインスリンの不活性形態を産生する方法に関連し、そのゲノムは組み込まれたプラスミドを含み、そのプラスミドは修飾ヒトインスリン前駆体をコードする核酸配列、およびその哺乳動物の乳腺細胞におけるその配列の発現を誘導するβカゼインプロモーターを含む。適当なβカゼインプロモーターは、上記で記載する。その組み込まれたプラスミドは、ネオマイシン耐性遺伝子のような抗生物質耐性遺伝子を含み得る。さらに、その組み込まれたプラスミドは、ｐβｍｈｕＩＰであり得る。その組み込まれたプラスミドはまた、プラスミドの安定性を増強する、プラスミドから転写されたｍＲＮＡの安定性を増強する、修飾インスリン前駆体の分解を減少させる、および／または修飾インスリン前駆体の発現を増加させる、１つまたはそれ以上のさらなる遺伝因子を含み得る。適当な遺伝因子は、調節性エレメント（例えばプロモーター、エンハンサー、インスレーター、または転写終結点）、インスリンではない遺伝子のコーディング配列の断片、またはインスリンではない遺伝子のコーディング配列を含むがそれに限らない。その組み込まれたプラスミドは、ｐＮＪＫ　ＩＰまたはｐβＫＬＥ　ＩＰであり得る。

【００５０】

さらに、本発明は、その乳中にその不活性タンパク質を産生するトランスジェニック哺乳動物の乳から、目的のタンパク質の不活性形態を精製する方法に関連する。その精製方法は、クロマトグラフィおよびろ過工程を含み得る。異なる型のクロマトグラフィを採用し得、そしてイオン交換クロマトグラフィまたは逆相クロマトグラフィを含む。そのイオン交換クロマトグラフィは、陽イオン交換クロマトグラフィであり得る。さらに、複数のクロマトグラフィ工程を行い得る。

【００５１】

本発明はさらに、非ヒトトランスジェニック哺乳動物から乳を得る工程、その非ヒトトランスジェニック哺乳動物の乳を清澄化して、清澄化した乳を得る工程、および清澄化した乳をクロマトグラフィにかけて純粋な不活性タンパク質を得る工程を含む、その乳中にその不活性タンパク質を産生する非ヒトトランスジェニック哺乳動物の乳から、目的のタンパク質の不活性形態を精製する方法に関連する。そのクロマトグラフィ工程は、イオン交換クロマトグラフィまたは逆相クロマトグラフィを含み得る。そのイオン交換クロマトグラフィは、陽イオン交換クロマトグラフィであり得る。その逆相クロマトグラフィは、Ｃ４またはＣ１８逆相マトリクスのような逆相マトリクスを使用し得る。さらに、複数のクロマトグラフィ工程を行い得る。

【００５２】

本発明はさらに、非ヒトトランスジェニック哺乳動物から乳を得る工程、その非ヒトトランスジェニック哺乳動物の乳を清澄化して、清澄化した乳を得る工程、清澄化した乳を陽イオン交換クロマトグラフィにかけて陽イオン交換クロマトグラフィにかけた材料を得

る工程、陽イオン交換クロマトグラフィにかけた材料を逆相クロマトグラフィにかけて、純粋な不活性タンパク質を得る工程を含む、その乳中にその不活性タンパク質を産生する非ヒトトランスジェニック哺乳動物の乳から、目的のタンパク質の不活性形態を精製する方法に関連する。

【００５３】

その目的の不活性タンパク質は、組換え修飾インスリン前駆体、好ましくは組換え修飾哺乳動物インスリン前駆体、より好ましくは組換え修飾ヒトインスリン前駆体、組換え修飾ウシインスリン前駆体、組換え修飾ブタインスリン前駆体、組換え修飾ヒツジインスリン前駆体、組換え修飾ヤギインスリン前駆体、または組換え修飾げっ歯類インスリン前駆体、そして最も好ましくは組換え修飾ヒトインスリン前駆体であり得る。さらに、その修飾インスリン前駆体は、その修飾インスリン前駆体を発現する非ヒトトランスジェニック哺乳動物において、低血糖を引き起こさない。その修飾インスリン前駆体において、天然に存在するプロインスリンにおいて見出される連結Ｃペプチドをコードするアミノ酸が、天然に存在するプロインスリンにおいて見出されないアミノ酸によって置換される。実施態様において、その修飾Ｃペプチドは、以下の３アミノ酸：Ａｌａ－Ａｌａ－Ｌｙｓを含む。さらに、その修飾インスリン前駆体は、修飾Ｂ鎖を含み得る。実施態様において、その修飾Ｂ鎖は、天然に存在するＢ鎖のＣ末端アミノ酸以外を全て含む。その非ヒトトランスジェニック哺乳動物は、ウシ種の哺乳動物であり得るが、それに限らない。トランスジェニック哺乳動物の他の種は、ブタ種、ヒツジ種、ヤギ種、またはげっ歯類種であり得るが、それに限らない。

【００５４】

本発明はさらに、目的のタンパク質の不活性形態を、目的のタンパク質の成熟（すなわち活性）形式に変換し、そして次いで目的のタンパク質を精製する方法に関連する。その変換は、目的のタンパク質の前駆体の酵素的切断を含み得る。その酵素的切断は、トリプシン分解（ｔｒｙｐｓｉｎｏｌｙｓｉｓ）を含み得る。目的のタンパク質の精製は、クロマトグラフィ工程を含み得る。これらのクロマトグラフィ工程は、逆相クロマトグラフィを含み得る。その逆相クロマトグラフィは、Ｃ４またはＣ１８逆相マトリクスのような逆相マトリクスを使用し得る。さらに、複数のクロマトグラフィ工程を行い得る。

【００５５】

本発明はさらに、組換え修飾インスリン前駆体を、組換えインスリンに変換し、そして次いでその組換えインスリンを精製する方法に関連する。その変換は、組換え修飾インスリン前駆体の酵素的切断およびペプチド転移を含み得る。その酵素的切断は、トリプシン分解を含み得る。組換えインスリンの精製は、クロマトグラフィ工程を含み得る。これらのクロマトグラフィ工程は、逆相クロマトグラフィまたはイオン交換クロマトグラフィを含み得る。さらに、複数のクロマトグラフィ工程を行い得る。

【００５６】

本発明はまた、組換え修飾インスリン前駆体を、組換えインスリンに変換し、そして次いでその組換えインスリンを精製する方法に関連する。この方法は、組換え修飾インスリン前駆体に、トリプシン分解およびペプチド転移を行い、トリプシン分解およびペプチド転移した材料を得る工程、トリプシン分解およびペプチド転移した材料を最初の逆相クロマトグラフィにかけて、最初の逆相クロマトグラフィにかけた材料を得る工程、最初の逆相クロマトグラフィにかけた材料を第二の逆相クロマトグラフィにかけて、第二の逆相クロマトグラフィにかけた材料を得る工程、および第二の逆相クロマトグラフィにかけた材料を第三の逆相クロマトグラフィにかけて、純粋な組換えインスリンを得る工程を含む。逆相クロマトグラフィの工程は、逆相マトリクス、好ましくはＣ４またはＣ１８逆相マトリクスの使用を含む。

【００５７】

その組換えインスリンおよび組換え修飾インスリン前駆体は、それぞれ組換え哺乳動物インスリンおよび組換え修飾哺乳動物インスリン前駆体、より好ましくは、それぞれ組換えヒトインスリンおよび組換え修飾ヒトインスリン前駆体、組換えウシインスリンおよび

組換え修飾ウシインスリン前駆体、組換えブタインスリンおよび組換え修飾ブタインスリン前駆体、組換えヒツジインスリンおよび組換え修飾ヒツジインスリン前駆体、組換えヤギインスリンおよび組換え修飾ヤギインスリン前駆体、または組換えげっ歯類インスリンおよび組換え修飾げっ歯類インスリン前駆体、および最も好ましくは、組換えヒトインスリンおよび組換え修飾ヒトインスリン前駆体であり得る。さらに、その修飾インスリン前駆体は、その修飾インスリン前駆体を発現する非ヒトトランスジェニック哺乳動物において低血糖を引き起こさない。その修飾インスリン前駆体において、天然に存在するプロインスリンにおいて見出される連結Ｃペプチドをコードするアミノ酸が、天然に存在するプロインスリンにおいて見出されないアミノ酸によって置換される。実施態様において、その修飾Ｃペプチドは、以下の３アミノ酸：Ａｌａ－Ａｌａ－Ｌｙｓを含む。さらに、その修飾インスリン前駆体は、修飾Ｂ鎖を含み得る。実施態様において、その修飾Ｂ鎖は、天然に存在するＢ鎖のＣ末端アミノ酸以外を全て含む。

【００５８】

本発明はさらに、その乳中に目的のタンパク質の不活性形態を産生する非ヒトトランスジェニック哺乳動物を作製する工程、その非ヒトトランスジェニック哺乳動物からその乳を得る工程、乳からその不活性形態を精製する工程、精製不活性タンパク質に酵素的切断を行うことによって、インビトロで不活性タンパク質を変換する工程、および最終的に目的のタンパク質を精製する工程を含む、目的のタンパク質を産生する方法に関連する。

【００５９】

本発明はさらに、その乳中に組換え修飾インスリン前駆体を産生する非ヒトトランスジェニック哺乳動物を作製する工程、その非ヒトトランスジェニック哺乳動物からその乳を得る工程、乳からその組換え修飾インスリン前駆体を精製する工程、精製前駆体に酵素的切断およびペプチド転移を行うことによって、インビトロで前駆体を組換えインスリンに変換する工程、および最終的に組換えインスリンを精製する工程を含む、組換えインスリンを産生する方法に関連する。

【００６０】

さらに、本発明はまた、その乳中に組換え修飾インスリン前駆体を産生する非ヒトトランスジェニック哺乳動物を作製する工程、その非ヒトトランスジェニック哺乳動物から乳を得る工程、その乳を清澄化して、清澄化した乳を得る工程、清澄化した乳を陽イオン交換クロマトグラフィにかけて陽イオン交換クロマトグラフィにかけた材料を得る工程、陽イオン交換クロマトグラフィにかけた材料を逆相クロマトグラフィにかけて、純粋な組換え修飾インスリン前駆体を得る工程、純粋な組換え修飾インスリン前駆体にトリプシン処理およびペプチド転移を行って、トリプシン処理およびペプチド転移を行った材料を得る工程、トリプシン処理およびペプチド転移を行った材料を最初の逆相クロマトグラフィにかけて、最初の逆相クロマトグラフィにかけた材料を得る工程、最初の逆相クロマトグラフィにかけた材料を第二の逆相クロマトグラフィにかけて、第二の逆相クロマトグラフィにかけた材料を得る工程、および第二の逆相クロマトグラフィにかけた材料を第三の逆相クロマトグラフィにかけて、純粋な組換えインスリンを得る工程を含む、組換えインスリンを産生する方法に関連する。

【００６１】

その組換えインスリンおよび組換え修飾インスリン前駆体は、それぞれ組換え哺乳動物インスリンおよび組換え修飾哺乳動物インスリン前駆体、より好ましくは、それぞれ組換えヒトインスリンおよび組換え修飾ヒトインスリン前駆体、組換えウシインスリンおよび組換え修飾ウシインスリン前駆体、組換えブタインスリンおよび組換え修飾ブタインスリン前駆体、組換えヒツジインスリンおよび組換え修飾ヒツジインスリン前駆体、組換えヤギインスリンおよび組換え修飾ヤギインスリン前駆体、または組換えげっ歯類インスリンおよび組換え修飾げっ歯類インスリン前駆体、および最も好ましくは、組換えヒトインスリンおよび組換え修飾ヒトインスリン前駆体であり得る。その非ヒトトランスジェニック哺乳動物は、ウシ種の哺乳動物であり得るが、それに限らない。トランスジェニック哺乳動物の他の種は、ブタ種、ヒツジ種、ヤギ種、またはげっ歯類種であり得るが、それに限

らない。逆相クロマトグラフィの工程は、逆相マトリクス、好ましくはＣ４またはＣ１８逆相マトリクスの使用を含む。

【００６２】

以下の実施例は、本発明の様々な局面および特徴の説明であり、制限しない。

【実施例】

【００６３】

実施例１

発現プラスミドの構築

修飾ヒトインスリン前駆体のコーディング配列に融合した、５’ノンコーディングβカゼイン遺伝子領域の短い断片を含む、ウシβカゼイン遺伝子プロモーターの大きな部分を含む構築物を産生した。短い非翻訳断片は、βカゼイン遺伝子の第一エキソンの断片である。採用されたβカゼイン領域は約３．８ｋｂであった。

【００６４】

発現プラスミドｐβｍｈｕＩＰ（図１を参照のこと）の構築を、修飾ヒトインスリン前駆体（ｍｈｕＩＰ）のコーディング配列、およびウシβカゼインプロモーター遺伝子の大きな部分（βカゼインウシ遺伝子の５’領域由来の３，８００ｂｐに対応する）を、適当なベクターに挿入することによって行った。このプロモーターは、この場合には異種性修飾ヒトインスリン前駆体の、そのコントロール下における、遺伝子の組織特異的および発達的に調節された発現を確実にする。

【００６５】

トランスジェニック細胞の適当な選択のために、ネオマイシンホスホトランスフェラーゼをコードする遺伝子を、プラスミドに含めた。この遺伝子は、抗生物質ジェネティシンによるトランスジェニック細胞の選択を可能にし、そしてそれはＳＶ４０プロモーターのコントロール下にある。

【００６６】

トランスフェクトした細胞の選択、またはウシ細胞ゲノムへのＤＮＡ組み込みの効率を改善するために、他の構築物はオリジナルのもの由来であり得る。

【００６７】

構築物を、制限酵素分析およびＤＮＡ配列決定によって分析した。構築物の、ｍｈｕＩＰを発現する能力を、蛍光抗体認識によって、乳腺細胞系統において以前に試験した。

【００６８】

プラスミドｐβｍｈｕＩＰの調製を、下記で詳細に説明する。

【００６９】

ｐβｍｈｕＩＰの調製

ｍｈｕＩＰ（修飾Ｃペプチドを含むヒトプロインスリン）をコードする配列を含む、開始構築物を産生した。ｍｈｕＩＰのＣペプチドが、天然に存在するプロインスリンで見出されるＣペプチドよりも短いこと以外は、ｍｈｕＩＰはヒトプロインスリンと同様である。

【００７０】

図２は、開始構築物の模式図を描写する。最初に、ウシシグナルペプチドをコードする領域、続いてインスリンのＢ鎖（Ｃ末端アミノ酸を欠く）をコードする配列を見出し得る。次いで、３アミノ酸、Ａｌａ－Ａｌａ－Ｌｙｓのスペーサーをコードする領域、それに続いてインスリンの完全なＡ鎖をコードする配列、そして最後にｍＲＮＡポリＡをコードする領域を見出し得る。３アミノ酸スペーサー、Ａｌａ－Ａｌａ－Ｌｙｓは、天然に存在するプロインスリンにおいて見出されるＣペプチドを置換する。

【００７１】

制限酵素ＢａｍＨＩおよびＮｏｔＩの認識部位を含む、６つのオーバーラップする、化学的に合成したオリゴヌクレオチドからｍｈｕＩＰ配列を再建することによって、開始構築物を産生した。そのプライマー配列を下記に示す：

【００７２】

【化１】

Ins1:

5′-ACTGGGATCCATGGCCCTGTGGACACGCCTGCGGCCCCTGCTGGCC

CTGCTGGCGC TCTGGCCCCCCCCCCCCGGCCCG-3′

Ins2:

5′-CTCCGCACACCAGGTACAGCGCCTCCACCAGGTGGGAGCCACACAG

ATGCTGGTTG ACGAAGGCGCGGGCCGGGGGGGGG-3′

Ins3:

5′-ACCTGGTGTGCGGAGAGCGCGGCTTCTTCTACACGCCCAAGGCTGC

TAAGGGCATT G TGGAACAATGCTGTACCAG-3′

Ins4:

5′-GTGTGGGGCTGCCTGCAGGCTGCGTCTAGTTGCAGTAGTTCTCCAGC

TGGTAGAGG GAGCAGATGCTGGTACAGCA-3′

Ins5:

5′-CAGGCAGCCCCACACCCGCCGCCTCCTGCACCGAGAGAGATGGAAT

AAAGCCCTTG AACCAGCCCTGCTGTGCCGTCTGT-3′

Ins6:

5′-TGACGCGGCCGCAGCGTGGAGAGAGCTGGGAGGGGCTCACAACAG

TGCCGGGAAG

TGGGGCTTGGCCCAGGGCCCCCAAGACACACAGCAGGCACAGCA-3′

再建過程を、ＰＣＲによって行った。プライマーＩｎｓ１およびＩｎｓ２（産物ｆ１２）、Ｉｎｓ３およびＩｎｓ４（産物ｆ３４）、およびＩｎｓ５およびＩｎｓ６（産物ｆ５６）の混合物から、ＰＣＲ産物を産生した。次いで、同じ過程を、単一の混合物中で、ｆ１２およびｆ３４のオーバーラップする断片を用いて行い、それは産物ｆ１４を与える。最後に、ｆ１４産物を、ｆ５６を含む混合物内のＰＣＲで用いて、全長ｍｈｕＩＰを含む約４１０ｂｐの断片を増幅した（断片ｆ１６）。

【００７３】

断片ｆ１６を得たら、それを適当なベクターにクローニングし、そしてその対応する挿入物と共にそのクローニングベクターのさらなる増幅のために、コンピテントＥ．ｃｏｌｉ細菌細胞に形質転換した。そのベクターはｐＢＫＣＭＶ由来であった。ｐＢＫＣＭＶは、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ　Ｃｏ．（Ｃａｒｌｓｂａｄ、ＣＡ）から入手可能な発現ベクターであり、それはＣＭＶプロモーター、ネオマイシン耐性遺伝子、およびカナマイシン耐性遺伝子をコードする。そのＣＭＶプロモーターを、３．８ｋｂのウシβカゼインプロモーターで置換し、そしてＢａｍＨＩおよびＮｏｔＩ制限部位を用いて、断片ｆ１６をできたベクターにクローニングした。

【００７４】

増幅後、クローニングされた挿入物の正体を確認するために、制限試験（ｒｅｓｔｒｉｃｔｉｏｎ　ｔｅｓｔｓ）を行った。最終的な確認を、配列決定によって達成した。

【００７５】

その後、開始構築物を、プラスミドベクターの４ｋＢのウシβカゼインプロモーターの下流に、方向性を持って挿入した（ＢａｍＨＩ／ＮｏｔＩ）。そのプラスミドベクターは

、ネオマイシン耐性遺伝子も含んでいた。最終構築物である、できたベクター、ｐβｍｈｕＩＰは、βカゼインプロモーター、ｍｈｕＩＰをコードする配列、およびネオマイシン耐性遺伝子を含んでいた。

【００７６】

ヒトプロインスリンは、３つのドメイン：アミノ末端Ｂ鎖（３０アミノ酸）、カルボキシル末端Ａ鎖（２１アミノ酸）、およびＣペプチドとして知られる、中央の連結ペプチド（３１アミノ酸）から成る。ｍｈｕＩＰは、Ｂ鎖のＣ末端アミノ酸が除去され、そしてＣペプチドをコードするアミノ酸が、通常Ｃペプチドにおいて見出されない３アミノ酸、Ａｌａ－Ａｌａ－Ｌｙｓで置換されていることにおいて、ヒトプロインスリンの天然に存在する形態と異なる。Ａ鎖およびＢ鎖のみから成る成熟ヒトインスリンは、Ｃペプチドの切断後に形成される。宿主のペプチダーゼはＣペプチドを切断および除去し、成熟インスリンを形成し得るので、ヒトプロインスリンを発現するトランスジェニック哺乳動物は、成育不能である。上記で説明したように、成熟ヒトインスリンが、その哺乳動物の血流に漏出し得るので、非ヒトトランスジェニック哺乳動物における成熟ヒトインスリンの発現は、その哺乳動物を殺し得る。対照的に、ｐβｍｈｕＩＰを用いて作製された非ヒトトランスジェニック哺乳動物は、トランスジェニック哺乳動物にいかなる有意な低血糖も発症させず、そしてそのトランスジェニック哺乳動物に毒性ではない、修飾ヒトインスリン前駆体を発現する。以下に制限されることなく、修飾ヒトインスリン前駆体の３アミノ酸スペーサーをコードする領域は、天然に存在するヒトプロインスリンにおいて見出されるＣペプチドと異なっているので、宿主ペプチダーゼは３アミノ酸スペーサーを認識および切断できない。従って、その修飾ヒトインスリン前駆体は不活性なままであり、そしてそのトランスジェニック動物において低血糖を引き起こさず、それは特許請求される発明の重要な利点である。

【００７７】

このプロモーターのコントロール下でのみｍｈｕＩＰを発現するために、βカゼインプロモーターおよび適当に融合したｍｈｕＩＰを含むクローンを選択した。

【００７８】

この発現プラスミドのサイズは、約８．４ｋｂｐである。

【００７９】

体細胞のトランスフェクション

次いでプラスミドｐβｍｈｕＩＰを、リン酸カルシウムまたはリポソーム法を用いて、体細胞の一次培養物をトランスフェクトするために使用した。一般的に胎仔ウシ線維芽細胞を、トランスフェクションのために採用した。

【００８０】

培養物にジェネティシンを加えることによって、トランスフェクトした細胞を選択した。２から８週間の期間後、ジェネティシンに耐性の細胞が、トランスジェニッククローンを得るためのドナー細胞として使用するために適当であった。トランスフェクトした、選択された細胞を、ＰＣＲによって分析して、その細胞がその発現カセットを含んでいることを確認した。

【００８１】

実施例２

卵母細胞の除核および成熟除核した卵母細胞における中期核移植

ウシ卵母細胞の採取およびインビトロにおける成熟

ウシ卵母細胞を、屠殺場の卵巣から吸引し、そしてＴＣＭ－１９９＋５％ＦＣＳ＋３ｍＭ　ＨＥＰＥＳ＋抗真菌薬中で成熟させた。次いで選択された卵母細胞を、５％CO_2の雰囲気下で、３９℃で２０時間、ＴＣＭ－１９９＋ロスコビチン中に置いた。その後、卵母細胞を、５％CO_2の雰囲気下で、３９℃で２４時間、ＴＣＭ－１９９＋５％ＦＣＳ＋ＦＳＨ（卵胞刺激ホルモン）＋抗生物質中に置いた。成熟卵母細胞を、１ｍｇ／ｍｌのウシ精巣ヒアルロニダーゼを含むＰＢＳ中で２分間ボルテックスすることによって、剥皮した。

【００８２】
実施例３
卵丘細胞を使用する核移植
除核
卵母細胞を、Ｎａｒｉｓｈｉｇｅ水力マイクロマニピュレーターおよびＮｉｋｏｎ Ｄｉａｐｈｏｔ顕微鏡を用いて、機械的に除核した。２０μｍの斜めに切って、そして鋭利にしたピペットによって、除核を行った。卵母細胞を、５μｇ／ｍｌのビスベンジミジン（ｂｉｓｂｅｎｚｉｍｉｄｉｎｅ）（Ｈｏｅｃｈｓｔ３３３４２（Ｓｉｇｍａ Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｃｏ.、Ｓｔ. Ｌｏｕｉｓ、ＭＯ、ＵＳＡ））色素で予め２０分間染色した。紫外線下で染色した染色体を可視化することによって、中期細胞を除核した。中期染色体を、ピペットに吸引した後評価した。トランスジェニック体細胞を、卵黄周囲腔に移し、そして除核した卵母細胞にしっかりと向かい合わせた。
【００８３】
融合、活性化および胚培養
トランスジェニック体細胞および除核した卵母細胞を、融合する膜が電極に平行であるように、融合チャンバーにおいて手動で並べた。これを、胚を取り扱うガラスのピペットを用いて行った。
【００８４】
１５μｓの１８０ボルト／ｃｍの１回の電気パルスを用いて融合を行い（ＢＴＸ Ｅｌｅｃｔｒｏ Ｃｅｌｌ Ｍａｎｉｐｕｌａｔｏｒ ２００（ＢＴＸ Ｉｎｃ.、Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ、Ｃａ、ＵＳＡ））、そしてＢＴＸ Ｏｐｔｉｍｉｚｅｒ－Ｇｒａｐｈｉｃ Ｐｕｌｓｅ Ａｎａｌｙｚｅｒによってモニターした。胚をパルスするためのチャンバーは、ガラスの顕微鏡スライド上に０．５ｍｍ離して設置された、２本の０．５ｍｍのステンレススチールワイア電極から成る。融合の３時間後、５μＭのイオノマイシンを含むＴＬ－ＨＥＰＥＳ中で４分間、および２ｍＭの６－ＤＭＡＰを含むＴＣＭ－１９９中で３時間インキュベートすることによって、活性化を誘発した。
【００８５】
次いで活性化した卵母細胞を、ＳＯＦ培地中で、５％CO_2＋５％O_2＋９０％N_2の雰囲気下で、６．５日間、胚盤胞の発達まで培養した。
【００８６】
その後、代理ウシへの胎芽移植が行われた。一般的に、レシピエントのウシあたり２つの胚盤胞を、非外科的に移植し、そして３０－３５日における妊娠を、超音波検査によって決定した。
【００８７】
移植されたウシを、自然な分娩まで、正常に妊娠を経過させた。最終的に、外科的アプローチ（帝王切開）を、分娩のために使用し得た。新生仔に、最初の４８時間はＩｇを多く含む初乳を与え、そして次いで合成、後には天然の（それらは全て動物由来の化合物を含まない）食物を使用した。
【００８８】
実施例４
トランスジェニック仔ウシに行った試験
本実施例において、本発明者らは、実施例１から３において記載された手順の結果として得られた、特定のトランスジェニック仔ウシに行った試験の完全な説明を提示する。それでも、同じセットのアッセイを、トランスジェニックメスのサブクローニング、トランスジェニックメスの過剰排卵に続く人工授精、またはトランスジェニックまたは非トランスジェニックメスの、望ましいタンパク質に関してトランスジェニックである雄ウシ由来の精液による人工授精のような、トランスジェニック仔ウシを得るための他の方法の結果として産まれたウシに対して行い得たことが、明らかなままであるべきである。
【００８９】
ウシβカゼインプロモーターおよび修飾ヒトインスリン前駆体をコードする配列が、ト

ランスジェニック仔ウシの細胞ゲノムに含まれていることが、ネガティブコントロールとして非トランスジェニックジャージー種仔ウシ由来のＤＮＡを用いて、仔ウシの白血球から精製したＤＮＡに対して行ったＰＣＲ反応によって証明された。仔ウシのホモログβカゼイン遺伝子と異なる、独特のＤＮＡ断片として、それらは一緒に見出され得る。

【００９０】

Ｐｈａｒｍａｃｉａ自動配列決定装置を用いることによって、挿入された配列が、クローニングプラスミドに含まれた修飾ヒトインスリン前駆体をコードする配列に対応することが実証された。挿入配列は、分泌シグナルおよびターミネーターを含む。本発明者らの仔ウシにおいて、修飾ヒトインスリン前駆体配列の発現を調節するウシβカゼインプロモーターも配列決定した。それらの要素は全て、クローンが産生された細胞を形質転換するために使用した遺伝的構築物から予測された理論的配列に正確に一致する。

【００９１】

実施例５

乳からの組換えｍｈｕＩＰの精製、ｍｈｕＩＰのヒトインスリンへの変換、およびヒトインスリンの精製

乳からの前駆体の精製手順の展開に必要な、ある量の組換えｍｈｕＩＰタンパク質を、形質転換したＰｈｉｃｈｉａ　ｐａｓｔｏｒｉｓの発酵から得た。この目的のために、ｍｈｕＩＰをコードする配列を、発現ベクターの酵母分泌シグナル配列の下流に、メタノールによって誘導されるプロモーターのコントロール下にサブクローニングし、そして酵母細胞において形質転換した。

【００９２】

その後、適当なクローンの選択を行い、そして選択したクローンから液体培養物を作製した。

【００９３】

形質転換した酵母クローンの発酵を、炭素源、オリゴエレメントとしてグリセロールを含む培地中で行った。誘導のためにメタノールを使用した。この発酵は、培養物１リットルあたり０．５グラムのｍｈｕＩＰを生じた。

【００９４】

発酵が終了したら、純粋な産物を得るために、精製工程を行った。

【００９５】

最初の目的は、酵母培養物から純粋な組換えｍｈｕＩＰを得ることであった。従って、形質転換したＰｈｉｃｈｉａ　ｐａｓｔｏｒｉｓ培養の上清を、精製水で１０倍に希釈し、そして氷酢酸を用いてそのｐＨを３．０に調整した。この溶液の伝導率を、それが７ｍＳ／ｃｍより高い値を示さないように実証した。その後トランスジェニック哺乳動物の乳からの組換えｍｈｕＩＰの精製過程、およびその後の組換えヒトインスリンへの変換の展開のための開始材料を得るために、精製過程を行った。

【００９６】

最初に、前述の溶液を、１００ｃｍ／ｈの流速で、ＳＰセファロースＦＦ樹脂（Ａｍｅｒｓｈａｍ）を採用する陽イオン交換クロマトグラフィ工程にかけた。添加（樹脂１ｍＬあたり１０ｍＬの上清を添加した）およびカラムの平衡化を、５％酢酸を採用して行った。タンパク質の溶出のために、全容量がカラムの２５容量に達するまでに、１００：０の溶液比から始まって０：１００の溶液比まで、ｐＨ３において５％酢酸：１ＭのＮａＣｌの勾配を適用した。

【００９７】

第二の精製工程において、陽イオン交換クロマトグラフィからの溶出物を、逆相クロマトグラフィにかけた。前の溶出物を、精製水で５倍に希釈し、そしてトリフルオロ酢酸（ＴＦＡ）によってｐＨを３に調整した。

【００９８】

できた溶液を、Ｃ４　Ｂａｋｅｒ　Ｗｉｄｅ　Ｐｏｒｅ樹脂を含むカラムに添加した。流速を、１００ｃｍ／ｈに設定した。添加および平衡化のために、０．１％のＴＦＡ／水

を使用した。溶出のために、全容量がカラムの５０容量に達するまでに、１００：０の溶液比から始まって０：１００比までの、０．１％ＴＦＡ／水－アセトニトリルの勾配を適用した。

【００９９】

前の精製工程の全体的な収率は約４２％であり、そして９５％より高い純度を有するｍｈｕＩＰを得た。

【０１００】

乳からの組換えｍｈｕＩＰの精製（そのトランスジェニック哺乳動物はその乳中に前駆体を分泌するため）、組換えｍｈｕＩＰの組換えヒトインスリンへの変換、および組換えヒトインスリンの最終的な精製を含む過程を展開した。この展開の開始材料を、純粋な組換えｍｈｕＩＰ（上記で記載したようにＰｈｉｃｈｉａ　ｐａｓｔｏｒｉｓから得た）を、通常のウシ乳と混合することによって得た。

【０１０１】

徹底的な精製過程を展開した。この過程は、最終的にカゼインのミセル中に保持された組換えｍｈｕＩＰのより良い可溶性を達成するために、得た溶出物のタンジェンシャルろ過および希釈によって脱脂乳を得る工程（清澄化）、およびこの溶液を陽イオン交換クロマトグラフィカラムに通す工程を含んでいた。できた溶液を、逆相クロマトグラフィ（Ｃ４）工程にかけ、そして組換えｍｈｕＩＰが豊富な画分に、その後トリプシン分解およびペプチド転移を行った。最後に、生物製剤製品を製造する場合、製品中の潜在的な混入物の存在を回避するために、目的のタンパク質を均一に精製しなければならないのは必須であるので、組換えヒトインスリンの精製を行った。

【０１０２】

乳からの組換えｍｈｕＩＰの精製、後の組換えヒトインスリンへの変換、および最終的な組換えヒトインスリンの精製の手順は、以下の工程を順番に含む：（ａ）タンジェンシャルフローろ過（清澄化）、（ｂ）陽イオン交換クロマトグラフィ、（ｃ）逆相クロマトグラフィ（Ｃ４）、（ｄ）トリプシン分解およびペプチド転移、（ｅ）逆相クロマトグラフィ（Ｃ４）、（ｆ）逆相クロマトグラフィ（Ｃ４）、および（ｇ）逆相クロマトグラフィ（Ｃ１８）。

【０１０３】

清澄化

新鮮な乳を、前に記載したようにＰ．ｐａｓｔｏｒｉｓで産生した、十分な量の純粋な組換えｍｈｕＩＰと混合した。その後、その産物をタンジェンシャルフローろ過工程にかけた。フィルターのポアサイズは０．１μｍであり、そしてその過程の収率は８０％であった。

【０１０４】

陽イオン交換クロマトグラフィ

前の工程から生じた材料を、陽イオン交換マトリクスを採用するクロマトグラフィにかけた。クロマトグラフィにかける溶液のｐＨを、氷酢酸で３．０に調整した。伝導率を、７ｍＳ／ｃｍより高くないように確認した。

【０１０５】

このクロマトグラフィ工程を、ＳＰセファロースＦＦ樹脂（Ａｍｅｒｓｈａｍ）を採用して、１００ｃｍ／ｈの流速で行った。添加およびカラムの平衡化を、５％酢酸を採用して行った。タンパク質の溶出のために、全容量がカラムの２５容量に達するまでに、１００：０の溶液比から始まって、０：１００の溶液比までの、ｐＨ３における５％酢酸－１ＭのＮａＣｌの勾配を適用した。

【０１０６】

そのクロマトグラフィ工程は、９０％の収率を有していた。選択した組換えｍｈｕＩＰを含む画分を、全タンパク質に関して（Ｂｒａｄｆｏｒｄ法によって）、および目的のタンパク質に関して（ウェスタンブロットによって）アッセイし、そして２－８℃で保存した。

【０１０７】
逆相クロマトグラフィ（１）
前の工程からできた材料を、次いでＣ４　Ｂａｋｅｒ　Ｗｉｄｅ　Ｐｏｒｅ樹脂を採用する逆相クロマトグラフィにかけた。流速を１００ｃｍ／ｈに設定した。添加および平衡化のために、０．１％のＴＦＡ／水を用いた。溶出のために、全容量がカラムの５０容量に達するまでに、１００：０の溶液比から始まって、０：１００の溶液比までの、０．１％ＴＦＡ／水－アセトニトリルの勾配を適用した。
【０１０８】
この工程は、６８％の収率を有していた。
【０１０９】
トリプシン分解およびペプチド転移
前の工程からできた材料を、トリプシンで処理した。
【０１１０】
トリプシン分解のために、１０ｍＭのｍｈｕＩＰ溶液を、トリプシンと（２００μＭの濃度で）、１２℃で２４時間インキュベートした。
【０１１１】
インキュベーションが終了したら、ヒトインスリンのＢ鎖の位置３０にスレオニンを加えるために、ペプチド転移反応を行った。この目的のために、０．８ＭのＴｈｒ－Ｏｂｕ、５０％のＤＭＦ／ＥｔＯＨ（１：１）、２６％のＨ２Ｏ、酢酸、１０ｍＭのｍｈｕＩＰ、および２００μＭのトリプシンを含む溶液を調製し、そしてペプチド転移反応を、完了まで進ませた。
【０１１２】
ペプチド転移工程が終了したら、純粋な組換えヒトインスリンを得るために、できた溶液を３つの連続する逆相クロマトグラフィ工程にかけた。
【０１１３】
逆相クロマトグラフィ（２）
前の工程からできた材料を、逆相クロマトグラフィにかけた。
【０１１４】
最初に、前の消化の材料を、５０ｍＭのNaH_2PO_4、ｐＨ５．０を用いて、０．１２５ｍｇ／ｍＬまで希釈した。その後、溶液１００ｍＬあたり５０μＬの酢酸を加えた。サンプルは次いで透明であり、ｐＨは約４．５であり、そしてサンプルは添加する用意ができた。
【０１１５】
緩衝液の組成を下記に記載する：
移動相Ａ（ＭＰＡ）：２１０ｍＬの硫酸塩緩衝液＋７９０ｍＬの精製水（約４８ｍＳの伝導率）
移動相Ｂ（ＭＰＢ）：１０５ｍＬの硫酸塩緩衝液＋４０％のアセトニトリル、精製水１ＬまでＱ．Ｓ．Ｐ．。
【０１１６】
１Ｌの硫酸塩緩衝液は、１３２．１グラムのNH_4SO_4、１４ｍＬのH_2SO_4を含み、そしてそのｐＨを２．００に調整する。
【０１１７】
添加後、以下のように１００ｃｍ／ｈの流速で溶出を行った：最初に、全容量が１３５ｍＬに達するまでに、１００：０の溶液比から始まって５５：４５の溶液比まで、ＭＰＡ－ＭＰＢの勾配を適用した；その後、全容量が３６０ｍＬに達するまでに、５５：４５の溶液比から始まって、２５：７５の溶液比まで、別のＭＰＡ－ＭＰＢの勾配を適用した；ならびに最後に、全容量が５０ｍＬに達するまでに、２５：７５の溶液比から始まって、０：１００の溶液比まで、最終的なＭＰＡ－ＭＰＢの勾配を適用した。
【０１１８】
得た画分は、９８％以上の純度で組換えヒトインスリンを含み、そしてこの工程の収率

は約８５％である。
【０１１９】
逆相クロマトグラフィ（３）
前の工程からできた材料を、そのｐＨを７．４に調整することによって、この工程のために調節した。
【０１２０】
できた溶液を、次いでＣ４　Ｂａｋｅｒ　Ｗｉｄｅ　Ｐｏｒｅマトリクスを採用してクロマトグラフィにかけた。流速を、１００ｃｍ／ｈに設定した。添加および平衡化のために、０．１％のＴＦＡ／水を使用した。溶出のために、全容量がカラムの５０容量に達するまでに、１００：０の溶液比から始まって、０：１００の溶液比まで、０．１％ＴＦＡ／水－アセトニトリルの勾配を適用した。
【０１２１】
この工程は、約６５％の収率を有していた。
【０１２２】
逆相クロマトグラフィ（４）
前の工程で得た材料を、そのｐＨを３．０に調整することによって、最終的な逆相クロマトグラフィ工程のために調節した。
【０１２３】
次いで調節した材料を、Ｃ１８逆相マトリクスを採用してクロマトグラフィにかけた。流速を、１００ｃｍ／ｈに設定した。添加および平衡化のために、０．１％のＴＦＡ／水を使用した。溶出のために、全容量がカラムの５０容量に達するまでに、１００：０の溶液比から始まって、０：１００の溶液比まで、０．１％ＴＦＡ／水－アセトニトリルの勾配を適用した。
【０１２４】
この工程は、約６１％の収率を有していた。
【０１２５】
実施例６
発現プラスミドｐＮＪＫ　ＩＰの構築
ニワトリβグロビンインスレーターのコーディング配列の断片に融合した、ヤギβカゼイン遺伝子プロモーターの大きな部分を含む、トランスジェニックウシ乳腺においてｍｈｕＩＰを発現するための、代替構築物を産生した。インスレーターは、遺伝子発現を阻害する付近のサイレンシング配列を含む、付近の調節性エレメントからプロモーターを保護するＤＮＡ配列エレメントである。ニワトリβグロビンインスレーターを含むこの代替構築物を、あらゆる付近のサイレンシング配列による、βカゼインプロモーターの阻害を防ぐために産生した。
【０１２６】
最初に、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ　Ｃｏ．（Ｃａｒｌｓｂａｄ、ＣＡ）から入手可能な市販のベクターであるｐＢＣ１から、ニワトリβグロビンインスレーターの２．４ｋｂの断片、ヤギβカゼイン遺伝子からのイントロンおよび非翻訳エキソンを含む、３．１ｋｂのヤギβカゼインプロモーター配列、ヤギβカゼイン遺伝子からのイントロンおよび非翻訳エキソンの間のＸｈｏＩクローニング部位、および３’βカゼインゲノム配列からのポリＡシグナルおよび隣接する領域を含む、１５ｋｂの断片を切除することによって、この代替プラスミドの構築を行った。
【０１２７】
この１５ｋｂの断片を、ｐβｍｈｕＩＰのバックボーンにクローニングした。最初に、ｐβｍｈｕＩＰから３．８ｋｂのウシβカゼインプロモーターおよび、ｍｈｕＩＰ断片を切除した。ＳａｌＩおよびＮｏｔＩ制限部位を用いて、１５ｋｂの断片をこのベクターに挿入した。次いで、４１０ｂｐのｍｈｕＩＰｆ１６断片を、１５ｋｂの断片に存在するＸｈｏＩクローニング部位にクローニングした（上記で記載したように、ヤギβカゼイン遺伝子からのイントロンおよび非翻訳エキソンの間）。

【０１２８】
その対応する挿入物と共にクローニングベクターをさらに増幅するために、できたベクター（ｐＮＪＫ　ＩＰ、図３）を、コンピテントＥ．ｃｏｌｉ細菌細胞に形質転換した。
【０１２９】
増幅後、ｍｈｕＩＰｆ１６断片挿入物の方向を確認するために、制限部位分析を行った。最終的な確認を、配列決定によって達成した。
【０１３０】
実施例７
発現プラスミドｐβＫＬＥ　ＩＰの構築
ウシαラクトアルブミン遺伝子の大きな部分のコーディング配列、続いてエンテロキナーゼ切断部位、それに続いて修飾ヒトインスリン前駆体（ｍｈｕＩＰ）のコーディング配列に融合した、βカゼイン遺伝子の第一エキソンの短い非翻訳断片を含むウシβカゼイン遺伝子プロモーターの大きな部分を含む、トランスジェニックウシ乳腺においてｍｈｕＩＰを発現するための、代替構築物を産生した。この代替構築物は、αラクトアルブミン－ｍｈｕＩＰ融合タンパク質を発現する。そのより大きな配列のために、この代替構築物は、より高い安定性でｍＲＮＡを生じる。それに加えて、αラクトアルブミンは、ウシ乳腺において天然に発現するタンパク質であるので、この代替構築物は、ｍｈｕＩＰの分解を最小にし、そしてｍｈｕＩＰの発現を増加させるはずである。
【０１３１】
この構築物を産生するために、最初に、αラクトアルブミン遺伝子の大きな部分をクローニングするために、鋳型としてウシ末梢血の白血球由来のＤＮＡを用いてＰＣＲ反応を行った。そのＰＣＲ産物は、第二のエキソンの終わりまで、約７００ｂｐのαラクトアルブミンを含んでおり、そしてαラクトアルブミンシグナル配列を含んでいた。
【０１３２】
最初のＰＣＲ反応は、以下のオリゴヌクレオチドを採用した：
【０１３３】
【化２】

NES: GGA GGT GAG CAG TGT GGT GAC

ALB: GAA GTT ACT CAC TGT CAC AGG AGA

次いで、第二のＰＣＲ反応を、以下のオリゴヌクレオチドを採用して行った：
【０１３４】
【化３】

SIG: TCA CCA AAA TGA TGT CCT TTG TC

LAC: TGT CAC AGG AGA TGT TAC AGA

この手順によって、６２０ｂｐの断片が得られ、そしてＳｍａＩ制限部位を用いてｐＵＣにクローニングした（ｐＵＣαラクトアルブミン）。
【０１３５】
以下のオリゴヌクレオチドを用いて、所内（ｉｎ－ｈｏｕｓｅ）ＩＰクローニングプラスミドからＰＣＲによってｍｈｕＩＰ遺伝子を有する断片を得た：
【０１３６】
【化４】

EKB: tag gct agc gat gat gat gat aaa ttc gtt aac

cag cac ctg

CadAr: tca gcg gcc gc tta gtt gca gta gtt

できた２６０ｂｐの断片は、ｍｈｕＩＰのコーディング配列の上流に、エンテロキナーゼ認識部位をコードする短い配列を含んでいた。エンテロキナーゼ切断部位は、残りのペ

プチドからのＩＰの分離を可能にする。次いで２６０ｂｐの断片を、ＮｈｅＩで消化し、そしてｐＵＣαラクトアルブミンの適合性のＸｂａＩ制限部位に挿入した。２６０ｂｐの断片が正しい方向でαラクトアルブミン遺伝子の下流に位置している、できた構築物を選択した。この構築物は、αラクトアルブミンシグナル配列を含むウシαラクトアルブミン遺伝子の大きな部分のコーディング配列、続いてエンテロキナーゼ認識部位、それにさらに続いて修飾ヒトインスリン前駆体（ｍｈｕＩＰ）のコーディング配列を有する。

【０１３７】

ｐＵＣαラクトアルブミンプラスミドを、最初にＥｃｏＲＩで消化し、そしてできた付着末端をクレノウ処理した。それに加えて、ＮｏｔＩ消化を行い、そしてできた遺伝子断片を単離した。αラクトアルブミン遺伝子融合物をライゲーションするために、βカゼインプロモーターを有するｐＢＫプラスミドを、当該プロモーター領域の３’末端に位置する独特のＢａｍＨＩ部位で消化した。従って、断片由来のＥｃｏＲＩ平滑末端にライゲーションするために、ＢａｍＨＩ部位も平滑末端にしたが、挿入物のＮｏｔＩ末端に相同の末端を提供するために、ｐＢＫプラスミドのＮｏｔＩ消化を前に行った。

【０１３８】

その対応する挿入物と共にクローニングベクターをさらに増幅するために、ｐβＫＬＥＩＰを次いでコンピテントＥ．ｃｏｌｉ細菌細胞に形質転換した。

【０１３９】

増幅後、最終的な確認を配列決定によって達成した。

【０１４０】

いまや本発明を完全に説明したので、当業者によって、本発明の範囲またはそのあらゆる実施態様に影響を与えることなく、広くそして同等の範囲の条件、処方、および他のパラメーターの範囲内で、同じことを行い得ることが理解される。本明細書中で引用された全ての特許および出版物は、その全体として、本明細書中で完全に参考文献に組み込まれる。

【図１】

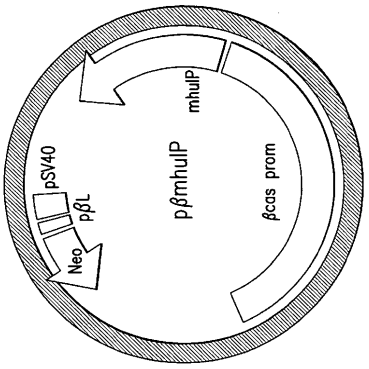


FIG.1

【図２】

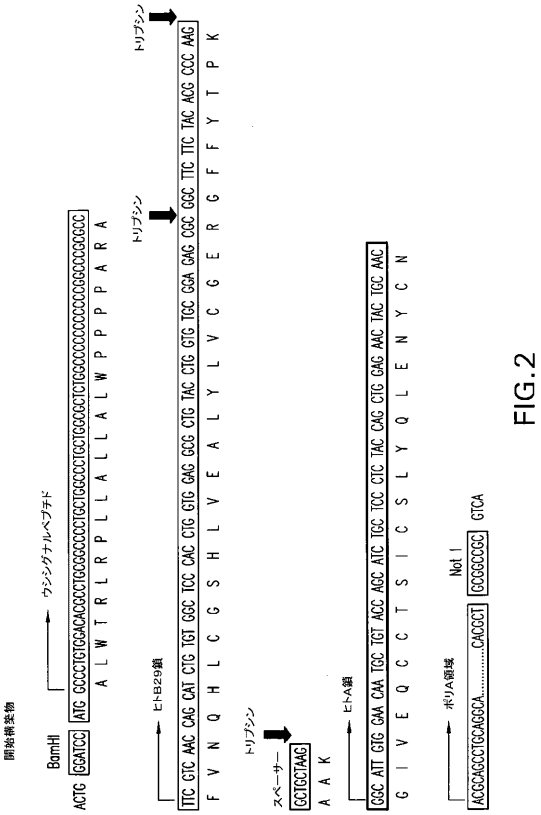


FIG.2

【図３】

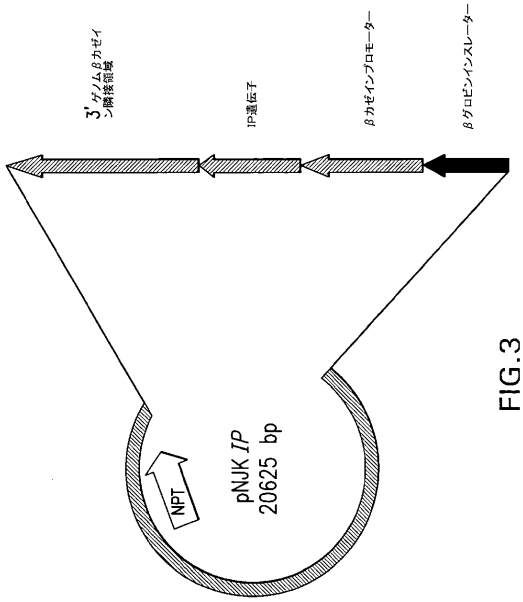


FIG.3

【図４】

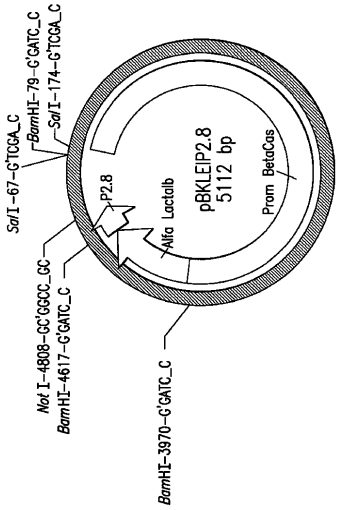


FIG.4

【配列表】

2010528677000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 08/07398

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC(8) - C12P 21/02; C12N 15/00; C12Q 1/68 (2008.04)
USPC - 800/7, 800/21, 435/6, 435/320.1
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC(8) - C12P 21/02; C12N 15/00; C12Q 1/68 (2008.04)
USPC - 800/7, 800/21, 435/6, 435/320.1

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
USPC - 800/24

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
PubWEST(USPT,PGPB,EPAB,JPAB); Google Patents; Google Scholar
Search terms: plasmid, proinsulin or insulin precursor, beta casein, bovine, transgenic, milk, liposome, C peptide, hypoglycemia, Ala-Aly-Lys, B chain, B29, lactalbumin, enterokinase, neomycin resistance, chicken globin insulator

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 20050177878 A1 (MELO et al.) 11 August 2005 (11.08.2005) para [0003], [0022]-[0023], [0032], [0035]-[0036], [0040]-[0041], [0046]-[0047], [0053], [0059], [0082] and [0087]-[0088]; claim 48.	1-77
Y	US 7,105,314 B2 (KJELDSEN) 12 September 2006 (12.09.2006) col 1, ln 65-66; col 2, ln 12; col 5, ln 19-26; col 7, ln 9-11 and 37-38; col 9, ln 59-62; and col 11, ln 13-14.	1-77
Y	US 20060179500 A1 (MEADE et al.) 10 August 2006 (10.08.2006) para [0002] and [0006].	9-11
Y	US 20020146779 A1 (COTTINGHAM et al.) 10 October 2002 (10.10.2002) para [0004], [0021] and [0031].	13-15
Y	DEREWENDA et al., X-ray analysis of the single chain B29-A1 peptide-linked insulin molecule. A completely inactive analogue, Journal of Molecular Biology, 20 July 1991, Vol 22, No 2, pp 425-33 (p 425, col 2, para 2).	16-21, 30-35, 50-55 and 72-77

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
22 August 2008 (22.08.2008)	29 AUG 2008
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201	Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2007)

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MT,NL,NO,PL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RS,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,SV,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 ベルコビッチ, アンドレアス
アルゼンチン国 シウダッド デ ブエノス アイレス, バルデネグロ ３１５０ 1エスティー シー
(72)発明者 プリンク, アイダ
アルゼンチン国 １４１６, シウダッド デ ブエノス アイレス, レメディオス デ エスカラーダ デ サン マーティン １０８６ 7ティーエイチ
(72)発明者 フェルナンデス, ナフュエル
アルゼンチン国 シーピー １２２２, シウダッド デ ブエノス アイレス, コンバート デ ロス ポゾス １１２９
(72)発明者 メロ, カルロス
アルゼンチン国 シーピー １６２９, プロビンシア デ ブエノス アイレス, ピラール, ルタ パナメリカーナ ケーエム ４９, クラブ デ カンポ ピュイレドン
(72)発明者 クリスクオロ, マルセロ
アルゼンチン国 シーピー １４２７, シウダッド デ ブエノス アイレス, グエバラ ３４９

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA03 BA02 CA04 CA20 DA02 EA04 GA10 GA11