



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 600 37 397 T2** 2008.06.05

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 148 779 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **600 37 397.5**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US00/00264**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **00 903 133.7**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2000/040693**

(86) PCT-Anmeldetag: **06.01.2000**

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: **13.07.2000**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **31.10.2001**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **12.12.2007**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **05.06.2008**

(51) Int Cl.⁸: **A01K 67/00** (2006.01)

A01K 67/027 (2006.01)

C12N 5/00 (2006.01)

C12N 5/02 (2006.01)

C07K 1/00 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

114995 P 06.01.1999 US

(73) Patentinhaber:

**Merrimack Pharmaceuticals, Inc., Cambridge,
Mass., US**

(74) Vertreter:

**Patentanwälte
HANSMANN-KLICKOW-HANSMANN, 22767
Hamburg**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LI, LU, MC, NL, PT, SE**

(72) Erfinder:

**LINDSAY, Stace, Cambridge, MA 02140, US;
MULROY, Robert, Cambridge, MA 02138, US;
SEMENIUK, Daniel, Lawrenceville, GA 30043, US**

(54) Bezeichnung: **EXPRESSION VON AUSGESCHIEDENEM, MENSCHLICHEM ALPHA-FETOPROTEIN IN TRANS-GENEN TIEREN**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

Hintergrund der Erfindung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft die Expression und Sekretion von rekombinantem Protein bei transgenen Tieren.

[0002] Alpha-Fetoprotein (AFP) ist ein durch den Dottersack und die fetale Leber hergestelltes Glykoprotein von 70 kDa. AFP ist im fetalen Serum in Milligramm-Spiegeln zugegen und sinkt bei der Geburt auf Nanogramm-Spiegel herab, wie sie normalerweise im adulten Serum gefunden werden: erhöhte Spiegel von AFP in adultem Serum deuten auf einen Dottersacktumor, ein Hepatom oder eine Leberregeneration hin. Die Rolle von AFP während der fetalen Entwicklung ist nicht bekannt, obwohl darauf hingewiesen wurde, dass AFP einen Fetus während der Gestation vor einer maternalen Immunreaktion oder vor den Wirkungen von maternalem Östrogen schützt.

[0003] In-vitro- und In-vivo-Experimente haben gezeigt, dass AFP in Abhängigkeit von der Zielzelle, der relativen Konzentration von AFP und der Anwesenheit anderer Zytokine und Wachstumsfaktoren sowohl das Zellwachstum stimulierende als auch hemmende Aktivitäten besitzt. Zum Beispiel kann AFP das Wachstum vieler Arten von Tumorzellen hemmen und hemmt insbesondere das Östrogen-stimulierte Zellwachstum. Umgekehrt stimuliert AFP das Wachstum normaler embryonaler Fibroblasten. Von AFP wurde auch gezeigt, dass es sowohl immunsuppressive als auch immunproliferative Wirkungen zeigt. Um die verschiedenen biologischen Eigenschaften von AFP zu nutzen, ist es erforderlich, ausreichende Mengen dieses Moleküls in einer wirksamen und kosteneffizienten Weise zu gewinnen.

Zusammenfassung der Erfindung

[0004] In einem ersten Aspekt bietet die Erfindung ein im Wesentlichen reines Nukleinsäuremolekül, umfassend: (i) eine Nukleinsäuresequenz, die rekombinantes humanes Alpha-Fetoprotein (rHuAFP) kodiert, (ii) einen milchspezifischen Promotor, wobei der Promotor funktionsfähig mit der rHuAFP-kodierenden Sequenz verknüpft ist, und (iii) eine Leadersequenz, die ein Proteinsekretionssignal kodiert, das die Sekretion des rHuAFP durch milchproduzierende Zellen in die Milch eines Säugetiers ermöglicht.

[0005] In einem zweiten Aspekt bietet die Erfindung ein nicht-menschliches transgenes Säugetier, das rekombinantes humanes Alpha-Fetoprotein (rHuAFP) in seiner Milch exprimiert, wobei milchproduzierende Zellen des Säugetiers ein Transgen enthalten, das folgendes umfasst: (i) eine Nukleinsäuresequenz, die rHuAFP kodiert, (ii) einen milchspezifischen Promotor, wobei der Promotor funktionsfähig mit der

rHuAFP-kodierenden Sequenz verknüpft ist, und (iii) eine Leadersequenz, die ein Proteinsekretionssignal kodiert, das die Sekretion des rHuAFP durch milchproduzierende Zellen in die Milch eines Säugetiers ermöglicht.

[0006] In einer bevorzugten Ausführungsform des zweiten Aspektes der Erfindung kann das Säugetier eine Ziege, eine Kuh, ein Schaf oder ein Schwein sein.

[0007] In einem dritten Aspekt bietet die Erfindung die Milch eines nicht-menschlichen Säugetiers, die rekombinantes humanes Alpha-Fetoprotein (rHuAFP) umfasst. In einer bevorzugten Ausführungsform des dritten Aspektes der Erfindung ist das rHuAFP löslich und wird durch ein nicht-menschliches transgenes Säugetier erzeugt, dessen milchproduzierende Zellen ein Transgen exprimieren, das folgendes umfasst: (i) eine rHuAFP kodierende Nukleinsäuresequenz, (ii) einen milchspezifischen Promotor, wobei der Promotor funktionsfähig mit der rHuAFP-kodierenden Sequenz verknüpft ist, und (iii) eine Leadersequenz, die ein Proteinsekretionssignal kodiert, das die Sekretion des rHuAFP durch die milchproduzierenden Zellen in die Milch eines Säugetiers ermöglicht.

[0008] In einem vierten Aspekt bietet die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung von rekombinantem humanem Alpha-Fetoprotein (rHuAFP), das in die Milch eines Säugetiers sekretiert wird, umfassend die Schritte: (a) des Bereitstellens einer Zelle, die mit einem Transgen transfiziert ist, das folgendes umfasst: (i) eine Nukleinsäuresequenz, die rHuAFP kodiert, (ii) einen milchspezifischen Promotor, wobei der Promotor funktionsfähig mit der rHuAFP-kodierenden Sequenz verknüpft ist, und (iii) eine Leadersequenz, die ein Proteinsekretionssignal kodiert, das die Sekretion des rHuAFP durch eine milchproduzierende Zelle ermöglicht, wobei die milchproduzierende Zelle von der transfizierten Zelle abgeleitet ist; (b) des Anziehens der Zelle, um ein Säugetier zu erzeugen, das milchproduzierende Zellen umfasst, die rHuAFP exprimieren und in Milch sekretieren, und (c) des Gewinnens der das rHuAFP enthaltenden Milch von dem Säugetier.

[0009] In einer bevorzugten Ausführungsform wird das rHuAFP aus der Milch aufgereinigt.

[0010] In einem fünften Aspekt bietet die Erfindung die Milch eines nicht-menschlichen Säugetiers, die rekombinantes humanes Alpha-Fetoprotein (rHuAFP) umfasst, zur Verwendung in einem Verfahren zur Behandlung eines Patienten mit einem Bedarf an rHuAFP.

[0011] In einer bevorzugten Ausführungsform des fünften Aspektes der Erfindung wird das rHuAFP

durch ein nicht-menschliches transgenes Säugetier erzeugt, dessen milchproduzierende Zellen ein Transgen enthalten, das folgendes umfasst: (i) eine rHuAFP kodierende Nukleinsäuresequenz, (ii) einen milchspezifischen Promotor, wobei der Promotor funktionsfähig mit der rHuAFP-kodierenden Sequenz verknüpft ist, und (iii) eine Leadersequenz, die ein Proteinsekretionssignal kodiert, das die Sekretion des rHuAFP durch die milchproduzierenden Zellen in die Milch eines Säugetiers ermöglicht.

[0012] In verschiedenen bevorzugten Ausführungsformen des fünften Aspektes der Erfindung kann die rHuAFP umfassende Milch eines nicht-menschlichen Säugetiers zur Behandlung von Krebs, zur Suppression des Immunsystems oder zur Induktion der Proliferation von Knochenmarkszellen bei einem Patienten, der dessen bedarf, verwendet werden.

[0013] Unter "humanem Alpha-Fetoprotein" oder "HuAFP" oder "rHuAFP" wird ein Polypeptid verstanden, das im Wesentlichen dieselbe Aminosäuresequenz aufweist wie das reife Alpha-Fetoprotein (Aminosäuren 20-609), wiedergegeben unter der Genbank-Zugriffsnummer J00077 und kodiert durch die unter der Genbank-Zugriffsnummer J00077 wiedergegebene und in Morinaga et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:4604-4608, 1983) beschriebene cDNA-Sequenz.

[0014] Unter "humanem Alpha-Fetoprotein-Vorläufer" wird ein Polypeptid verstanden, das im Wesentlichen dieselbe Aminosäuresequenz aufweist wie die Aminosäuren 1-609, wiedergegeben unter der Genbank-Zugriffsnummer J00077.

[0015] Unter "im wesentlichen dieselbe Aminosäuresequenz aufweisend" wird ein Polypeptid verstanden, das mindestens 80% Identität mit einer natürlich vorkommenden HuAFP-Aminosäuresequenz, typischerweise mindestens etwa 85% Identität mit einer natürlich vorkommenden humanen HuAFP-Sequenz, noch typischerweise mindestens etwa 90% Identität, üblicherweise mindestens etwa 95% Identität und noch üblicher mindestens etwa 97% Identität mit einer natürlich vorkommenden HuAFP-Sequenz zeigt. Die Länge der Vergleichssequenzen wird im allgemeinen mindestens 16 Aminosäuren betragen, üblicherweise mindestens 20 Aminosäuren, noch üblicher mindestens 25 Aminosäuren, typischerweise mindestens 30 Aminosäuren und bevorzugt mehr als 35 Aminosäuren.

[0016] Die Sequenzidentität wird typischerweise unter Verwendung von Sequenzanalysesoftware mit den hier angegebenen Vorgabeparametern, beispielsweise der Einführung von Lücken, um eine optimale Alinierung zu erreichen, gemessen (zum Beispiel das Sequenzanalysesoftwarepaket der Genetics Computer Group, Universität Wisconsin, Biotech-

nology Center, 1710 University Avenue, Madison, WI 53705).

[0017] Unter einer "milchproduzierenden Zelle" wird eine Milch sekretierende Mammapithelzelle verstanden.

[0018] Unter "Promotor" wird eine minimale Sequenz verstanden, die ausreicht, um die Transkription zu steuern. Die Erfindung beinhaltet auch solche Promotorelemente, die ausreichen, eine promotorabhängige Genexpression kontrollierbar für zelltypspezifische, gewebespezifische, zeitspezifische oder durch externe Signale oder Mittel induzierbar zu machen; solche Elemente können in den 5'- oder 3'- oder Intronsequenzbereichen des nativen Gens angeordnet sein.

[0019] Unter einem "milchspezifischen Promotor" wird ein Promotor verstanden, der natürlicherweise die Expression eines Gens steuert, das in Mammapithelzellen exprimiert wird, zum Beispiel der native Promotor, der mit den Genen verbunden ist, die das saure Molkeprotein (whey acidic Protein, WAP), Alpha-S1-Casein, Alpha-S2-Casein, Beta-Casein, Kappa-Casein, Beta-Laktoglobulin und Alpha-Laktalbumin kodieren.

[0020] Unter "rekombinantem HuAFP" oder "rHuAFP" wird ein humanes Alpha-Fetoprotein verstanden, das durch eine künstlich konstruierte Nukleinsäure kodiert wird.

[0021] Unter dem hier unter Bezugnahme auf ein Gen oder ein Polypeptid verwendeten Ausdruck "exogen" wird ein Gen oder Polypeptid verstanden, das normalerweise in einem Lebewesen nicht vorhanden ist. Zum Beispiel ist rHuAFP für eine Ziege exogen.

[0022] Unter "aufgereinigt" wird verstanden, dass in Milch sekretiertes rHuAFP teilweise oder vollständig von anderen Bestandteilen (z.B. Proteinen, Lipiden und Wasser) getrennt wird, die natürlicherweise in Milch vorkommen, wodurch die wirksame Konzentration von rHuAFP im Vergleich zu ungereinigtem rHuAFP, wie man es in Milch findet, erhöht wird.

[0023] Unter einer "im Wesentlichen reinen Nukleinsäure" wird eine Nukleinsäure verstanden, die frei ist von den Genen, die das Gen in dem natürlicherweise auftretenden Genom des Organismus, von dem die erfindungsgemäße Nukleinsäure abgeleitet ist, flankieren. Der Begriff beinhaltet daher zum Beispiel eine rekombinante DNA, die in einen Vektor, in ein autonom replizierendes Plasmid oder Virus, oder in die genomische DNA eines Prokaryoten oder Eukaryoten aufgenommen wurde; oder die als separates von anderen Sequenzen unabhängiges Molekül vorliegt (z.B. eine cDNA oder ein genomisches oder cD-

NA-Fragment, hergestellt durch PCR oder Restriktionsendonukleaseverdau). Er beinhaltet auch eine rekombinante DNA, die Teil eines Hybridgens ist, das eine Nukleotidsequenz enthält, die für das Gen nicht nativ ist oder zusätzliche Polypeptidsequenzen kodiert, sowie die entsprechende mRNA.

[0024] Unter "Transformation" oder "Transfektion" oder "Transduktion" wird jedes Verfahren zur Einführung fremder Moleküle in eine Zelle verstanden. Lipofektion, DEAE-Dextran-vermittelte Transfektion, Mikroinjektion, Protoplastenfusion, Kalziumphosphatpräzipitation, Transduktion (z.B. Bakteriophagen-, adenovirale retrovirale oder andere virale Zufuhr), Elektroporation und biolistische Transformation sind lediglich einige wenige der dem Fachmann bekannten Verfahren, die verwendet werden können.

[0025] Unter einer "transformierten Zelle" oder "transfizierten Zelle" oder "transduzierten Zelle" wird eine Zelle (oder ein Abkömmling einer Zelle) verstanden, in die ein rHuAFP kodierendes DNA-Molekül mittels rekombinanter DNA-Techniken eingeführt wurde. Das DNA-Molekül kann stabil in das Wirtschromosom eingeführt sein oder kann episomal gehalten werden.

[0026] Unter "funktionsfähig verknüpft" wird verstanden, dass ein Gen und ein oder mehrere regulatorische Sequenzen in einer Weise verbunden sind, um eine Genexpression zu ermöglichen, wenn die entsprechenden Moleküle (z.B. transkriptionelle Aktivatorproteine) an die regulatorischen Sequenzen gebunden sind.

[0027] Unter "Expressionsvektor" wird ein gentechnisch erzeugtes Plasmid oder Virus, abgeleitet von z.B. einem Bakteriophagen, Adenovirus, Retrovirus, Poxvirus, Herpesvirus, oder ein artifizielles Chromosom verstanden, das verwendet wird, um eine funktionsfähig mit einem Promotor verknüpfte rHuAFP-kodierende Sequenz in eine Wirtszelle zu übertragen, so dass das kodierte rHuAFP innerhalb der Wirtszelle exprimiert wird.

[0028] Unter "embryonaler Zelle" wird eine Zelle verstanden, die dazu befähigt ist, ein Vorläufer für sämtliche somatischen und Keimbahnzellen eines Organismus zu sein. Beispielhafte embryonale Zellen sind embryonale Stammzellen (ES-Zellen) und fertilisierte Oozyten. Vorzugsweise sind die erfindungsgemäßen embryonalen Zellen embryonale Säugetierzellen.

[0029] Unter "Transgen" wird jedes Stück Nukleinsäure verstanden, das durch künstliche Mittel in eine Zelle oder einen Vorläufer davon eingeführt wird und Teil des Genoms des Lebewesens wird, das sich aus dieser Zelle entwickelt. Solch ein Transgen kann ein Gen beinhalten, das für das transgene Lebewesen

teilweise oder vollständig exogen (d.h. fremd) ist, oder kann ein Gen repräsentieren, das zu einem endogenen Gen des Lebewesens identisch ist.

[0030] Mit "transgen" ist jede Zelle gemeint, die eine Nukleinsäuresequenz beinhaltet, die künstlich in eine Zelle, oder einen Vorläufer davon, eingeführt wurde und Teil des Genoms des Lebewesens wird, das sich aus dieser Zelle entwickelt. Vorzugsweise sind die transgenen Lebewesen transgene Säugetiere (z.B. Ziegen, Schafe, Kühe und Schweine). Bevorzugt wird die Nukleinsäure (das Transgen) durch künstliche Mittel in das nukleäre Genom (d.h. ein Chromosom) eingeführt, obwohl das Transgen auch episomal gehalten werden kann (z.B. auf einem Vektor getragen werden kann, der einen Replikationsursprung enthält, wie beispielsweise den oriP des Epstein-Barr-Virus).

[0031] Unter einer "Leadersequenz" oder einer "Signalsequenz" wird eine Nukleinsäure verstanden, die ein Proteinsekretionssignal kodiert, und, wenn sie funktionsfähig mit einem stromabwärts liegenden rHuAFP kodierenden Nukleinsäuremolekül verknüpft ist, die rHuAFP-Sekretion steuert. Die Leadersequenz kann der native rHuAFP-Leader sein, ein künstlich abgeleiteter Leader oder kann von demselben Gen erhalten sein wie der Promotor, der zur Steuerung der Transkription der rHuAFP-kodierenden Sequenz verwendet wurde, oder von einem anderen Protein, das normalerweise von einer Zelle sekretiert wird.

[0032] Unter "Human-Alpha-Fetoprotein-Sekretionssignal" oder "Human-Alpha-Fetoprotein-Signalsequenz" oder "Human-Alpha-Fetoprotein-Signalsequenz" wird ein Polypeptid verstanden, das im wesentlichen dieselbe Aminosäuresequenz der Aminosäuren 1-19 aufweist, die unter der Genbank-Zugriffsnummer J00077 wiedergegeben ist. Das Proteinsekretionssignal wird bei der Reifung des Proteins und der extrazellulären Sekretion vom HuAFP abgespalten.

[0033] Unter "therapeutisch wirksamer Menge" wird eine Menge von rekombinantem humanem Alpha-Fetoprotein oder einem Fragment davon verstanden, die bei Verabreichung an einen Patienten eine durch humanes Alpha-Fetoprotein modulierte biologische Aktivität hemmt oder stimuliert. Solche biologische Aktivitäten beinhalten die Hemmung der Proliferation eines Neoplasmas oder einer autoreaktiven Immunzelle, oder die Stimulierung der Proliferation einer Zelle (zum Beispiel einer Knochenmarkszelle). Die therapeutisch wirksame Menge kann von einer Reihe von Faktoren abhängen, einschließlich der medizinischen Indikation, der Verabreichungsdauer und dem Verabreichungsweg. Zum Beispiel kann rHuAFP systemisch im Bereich von 0,1 ng-10 g/kg Körpergewicht, vorzugsweise im Bereich von 1

ng-1 g/kg Körpergewicht, weiter bevorzugt im Bereich von 10 ng-100 mg/kg Körpergewicht und am meisten bevorzugt im Bereich von 1 µg-10 mg/kg Körpergewicht verabreicht werden.

Kurze Beschreibung der Figuren

[0034] [Fig. 1](#) ist ein Diagramm, das die Struktur eines Ziegen-Beta-Casein/rHuAFP-Transgens zur Expression und Sekretion von rHuAFP in Milch zeigt.

[0035] [Fig. 2](#) ist ein Diagramm, das die genomische Organisation des menschlichen AFP-Gens und der zwei überlappenden Lambda (λ)-Fragmente zeigt.

[0036] [Fig. 3](#) ist ein Diagramm, das die Ausgestaltung eines Vektors zeigt, der den 5'-Subklon des menschlichen AFP-Gens und ein Expressionskonstrukt beinhaltet.

[0037] [Fig. 4](#) ist ein Diagramm, das die Ausgestaltung eines Vektors zeigt, der den 3'-Subklon des menschlichen AFP-Gens und ein Expressionskonstrukt beinhaltet.

[0038] [Fig. 5](#) ist ein Diagramm, das eine Strategie zur Verknüpfung der 5'- und 3'-AFP-Genfragmente und zur Einfügung des gesamten menschlichen AFP-Genomfragments in den GTC-Beta-Casein-Expressionsvektor zeigt.

Ausführliche Beschreibung der Erfindung

[0039] Die vorliegende Erfindung bietet ein Verfahren zur Expression sekretierten rekombinanten Human-Alpha-Fetoproteins (rHuAFP) bei transgenen Säugetieren, insbesondere Wiederkäuern (z.B. Rindern, Schafen und Ziegen). Das Transgen, welches die Expression von sekretiertem rHuAFP steuert, enthält die stromabwärts einer Transkriptionspromotor enthaltenden Nukleinsäure fusionierte kodierende Region von Human-AFP. Zwischen dem Promotor und der proteinkodierenden Region befindet sich eine Leadersequenz, die ein Proteinsekretionssignal kodiert. Abhängig von dem eingesetzten Promotor und Sekretionssignal wird das Transgen-kodierte rHuAFP in die Milch des transgenen Tieres sekretiert. Weitere Nukleinsäureelemente, wie beispielsweise Transkriptionsverstärker, Transkriptions- und Translationsterminatorsequenzen, 3'-untranslatierte Regionen, die die mRNA-Stabilität fördern, und Introns, die die Expression fördern, können ebenfalls in das transgene Konstrukt aufgenommen sein.

[0040] Die Herstellung von rHuAFP durch Sekretion in Milch erleichtert dessen Reinigung und macht die Entfernung von Blutprodukten und Kulturmediensätzen überflüssig, von denen einige toxisch, karzinogen oder infektiös sein können. Darüber hinaus

kann rHuAFP enthaltende Milch direkt von Menschen oder anderen Säugetieren konsumiert werden.

Transgen-Konstrukte

[0041] Geeignete Promotoren für die Expression eines rHuAFP-Transgens in Mammagewebe beinhalten Promotoren, die natürlicherweise die Expression von mammaspezifischen Proteinen, beispielsweise Milchproteinen, steuern, obwohl jeder Promotor verwendet werden kann, der die Sekretion des transgenen Produktes in Milch ermöglicht. Dies beinhaltet zum Beispiel die Promotoren, die natürlicherweise die Expression von saurem Molkeprotein (WAP), Alpha-S1-Casein, Alpha-S2-Casein, Beta-Casein, Kappa-Casein, Beta-Laktoglobulin und Alpha-Laktalbumin steuern (siehe z.B. Drohan et al., U.S.P.N. 5.589.604; Meade et al. U.S.-Patent Nr. 4.873.316; und Karatzas et al., U.S.-Patent Nr. 5.780.009).

[0042] Das Transgen-Konstrukt beinhaltet vorzugsweise eine Leadersequenz stromabwärts vom Promotor. Die Leadersequenz ist eine Nukleinsäuresequenz, die ein Proteinsekretionssignal kodiert und, wenn sie funktionsfähig mit einem stromabwärts gelegenen Nukleinsäuremolekül verknüpft ist, das rHuAFP kodiert, die rHuAFP-Sekretion steuert. Die Leadersequenz kann aus dem selben Gen erhalten werden wie der Promotor, der zur Steuerung der Transkription des rHuAFP kodierenden Nukleinsäuremoleküls verwendet wurde (zum Beispiel einem Gen, das ein milchspezifisches Protein kodiert). Alternativ kann eine Leadersequenz eingesetzt werden, die das native rHuAFP-Proteinsekretionssignal kodiert (Aminosäuren 1-19 der Genbank-Zugriffsnummer J00077): die Nukleotide 45-101 der Genbank-Zugriffsnummer J00077 kodieren das native HuAFP-Proteinsekretionssignal. Andere Optionen beinhalten die Verwendung einer Leadersequenz, die ein Proteinsekretionssignal von einem beliebigen anderen Protein kodiert, das normalerweise aus einer Zelle ausgeschieden wird, eine künstliche Leadersequenz, die ein künstliches Proteinsekretionssignal kodiert oder eine Hybrid-Leadersequenz (z.B. eine Fusion aus der Ziegen-Beta-Casein- und der rHuAFP-Leadersequenz).

[0043] Darüber hinaus beinhaltet das Transgen-Konstrukt bevorzugt eine Transkriptionsterminationsstelle, ein Signal für die Polyadenylierung der transkribierten mRNA und ein Translationsterminationssignal. Das Transgen kann auch eine beliebige 3'-untranslatierte Region (UTR) kodieren, die die Stabilität der rHuAFP-mRNA erhöht, zum Beispiel eine 3'-UTR des bovinen Wachstumshormogens, eines Milchproteingens oder eines Globingens.

[0044] Das Transgen-Konstrukt kann auch einen Transkriptionsverstärker stromaufwärts oder stromabwärts von der transkribierten Region des Trans-

gens beinhalten, beispielsweise einen Verstärker von einem viralen (z.B. SV40) oder Säugetier- (z.B. Casein-) Gen.

[0045] Das Transgen-Konstrukt kann ferner ein Intron beinhalten, das das Expressionsniveau des Transgens erhöht. Das Intron kann zwischen der Transkriptionsinitiationsstelle und dem Translationsstartkodon, 3' von dem Translationsstopkodon, oder innerhalb der kodierenden Region des Transgens angeordnet sein. Das Intron sollte eine 5'-Spleißstelle (d.h. eine Donorstelle), eine 3'-Spleißstelle (d.h. eine Akzeptorstelle) und vorzugsweise mindestens 100 Nukleotide zwischen den beiden Stellen beinhalten. Jedes Intron, das im Stand der Technik dahingehend bekannt ist, die Expression eines Transgens zu erhöhen (z.B. ein Intron eines Wiederkäuer-Casein-Gens) kann verwendet werden.

[0046] Das Transgen-Konstrukt kann genomische oder cDNA beinhalten, die HuAFP oder ein Fragment davon exprimiert. Beispielhafte Fragmente von HuAFP sind in Murgita, WO 96/2287, beschrieben. Darüber hinaus kann das Transgen dahingehend gentechnisch verändert sein, ein rHuAFP-Molekül zu exprimieren, das nicht glykosyliert ist. Dies wird durch Mutieren des Kodons, das die einzige N-verknüpfte Glykosylierungsstelle des AFP-Moleküls kodiert, unter Verwendung von im Stand der Technik bekannten Standardverfahren erreicht.

[0047] Das rHuAFP-Transgen kann in ein ringförmiges Plasmid, einen Cosmidvektor oder anderen Vektor, beispielsweise einen von einem Virus abgeleiteten Vektor, aufgenommen sein. Der Vektor kann zusätzliche Sequenzen enthalten, die seine Fortpflanzung in prokaryotischen und eukaryotischen Zellen erleichtern, zum Beispiel arzneimittelselektierbare Marker (z.B. für Ampicillin-Resistenz bei *E. coli*, oder G-418-Resistenz bei Säugetierzellen) und Replikationsursprünge (z.B. *coliE1* zur Replikation in prokaryotischen Zellen, und *oriP* zur Replikation in Säugetierzellen).

Erzeugung transgener Tiere

[0048] Transgene Konstrukte werden üblicherweise durch Mikroinjektion in Zellen eingeführt (Ogata et al., U.S.-Patent Nr. 4.873.292). Ein mikroinjizierter Embryo wird dann in ein geeignetes weibliches Individuum übertragen, was in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium des Embryos, in dem das Transgen eingeführt wird, zur Geburt eines transgenen oder chimären Tieres führt. Chimäre Tiere können herangezogen werden, um echte keimbahntransgene Tiere zu bilden.

[0049] Bei einigen Verfahren der Transgenese werden Transgene in die Pronuklei fertilisierter Oozyten eingeführt. Bei einigen Tieren, beispielsweise Mäu-

sen, wird die Fertilisierung in vivo durchgeführt und fertilisierte Ova werden chirurgisch entfernt. Bei anderen Tieren können die Ova von lebenden oder von frisch toten (z.B. Schlachthaus-)Tieren entnommen und in vitro fertilisiert werden.

[0050] Alternativ können die Transgene in embryonale Stammzellen (ES-Zellen) eingeführt werden. Transgene können durch Elektroporation, Mikroinjektion oder beliebige andere Techniken, die zur Transfektion von Zellen verwendet werden und die dem Fachmann bekannt sind, in solche Zellen eingeführt werden. Transformierte Zellen werden mit Blastozysten von dem Tier, von dem sie stammen, kombiniert. Die transformierten Zellen besiedeln den Embryo, und bei einigen Embryonen bilden diese Zellen die Keimbahn des resultierenden chimären Tieres (Jaenisch, R., *Science* 240: 1468-1474, 1988).

[0051] ES-Zellen, die ein rHuAFP-Transgen enthalten, können auch verwendet werden als Quelle für Nuklei zur Transplantation in eine entkernte fertilisierte Oozyte, was zu einem transgenen Tier führt. Allgemeiner gesagt, kann jede diploide Zelle, die aus embryonalem, fetalem oder adultem Gewebe erhalten wurde und ein rHuAFP-Transgen enthält, in ein entkerntes unbefruchtetes Ei eingeführt werden. Der klonierte Embryo wird in ein geeignetes weibliches Individuum implantiert und von diesem ausgetragen, was zu einem vollständig transgenen Tier führt (Wilmut et al., *Nature* 385: 810-813, 1997).

[0052] Im Allgemeinen hängt die Expression jedes Transgens von dessen Integrationsort und Kopienzahl ab. Nachdem ein transgenes Tier, das das geeignete Transgen-Expressionsniveau und gewebespezifische Transgen-Expressionsmuster aufweist, durch traditionelle Verfahren (z.B. pronukleäre Injektion oder Erzeugung von chimären Embryos) erhalten wurde, wird das Tier gezüchtet, um Nachkommen zu erhalten, die dasselbe Expressionsniveau und -muster des Transgens aufweisen. Es gibt zahlreiche Beschränkungen für diesen Ansatzpunkt. Erstens erfolgt bei transgenen Chimären, denen transgene Keimzellen fehlen, die Übertragung des Transgens auf die Nachkommenschaft nicht. Zweitens wird lediglich die Hälfte der Nachkommen transgen sein, weil ein heterozygoter transgener Gründer mit einem nicht-transgenen Tier gekreuzt wird. Drittens ist die Zahl der transgenen Nachkommenschaft darüber hinaus begrenzt durch die Länge der Tragzeit und die Zahl der Nachkommen pro Schwangerschaft. Schließlich kann die Zahl nützlicher transgener Nachkommen ferner durch das Geschlecht begrenzt sein: zum Beispiel sind zur Herstellung von in Milch exprimiertem rHuAFP nur weibliche Tiere nützlich. Im Hinblick auf diese Beschränkungen stellt die Kerntransfertechnologie den Vorteil bereit, innerhalb einer vergleichsweise kurzen Zeitdauer die Erzeugung vieler weiblicher transgener Tiere, die genetisch iden-

tisch sind, zu ermöglichen.

[0053] Tiere, die rHuAFP in ihrer Milch exprimieren, können auch durch direkten Transfer des Transgens in das Mammarygewebe von Tieren nach der Geburt erzeugt werden (Karatzas et al., U.S.-Patent Nr. 5.780.009). Solche Tiere enthalten das Transgen nicht in ihrer Keimbahn und haben daher keine transgene Nachkommenschaft.

Sichtung auf transgene Tiere

[0054] Nachdem die potenziell transgenen Tiere erzeugt wurden, müssen sie einer Sichtung unterzogen werden, um Tiere zu detektieren, deren Zellen das Transgen enthalten und exprimieren. Die Anwesenheit eines Transgens in tierischen Geweben wird typischerweise detektiert durch Southernblot-Analyse oder durch Einsatz einer PCR-Amplifikation von DNA aus potenziell transgenen Tieren (siehe z.B. Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, NY, 1998; siehe auch Lubon et al., U.S.P.N. 5.831.141). Die rHuAFP-Expression in Milch kann durch einen beliebigen Standard-Immunassay, z.B. ELISA oder Westernblot-Analyse, unter Verwendung eines Anti-AFP-Antikörpers festgestellt werden (siehe z.B. Murgita et al., U.S.P.N. 5.384.250 und Ausubel et al., oben). Für ein Arbeitsbeispiel einer ELISA-basierten Detektion von Transgen-kodiertem Protein in Milch siehe Drohan et al., U.S.P.N. 5.589.604.

Aufreinigung von AFP aus Milch

[0055] Rekombinantes Protein kann unter Verwendung von Standard-Proteinreinigungstechniken wie beispielsweise Affinitätschromatographie (siehe z.B. Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, NY, 1998; siehe auch Lubon et al., U.S.P.N. 5.831.141) oder anderen dem Fachmann für die Proteinreinigung bekannten Verfahren aus Milch aufgereinigt werden. Einmal isoliert, kann das rekombinante Protein, falls gewünscht, z.B. durch Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC; z.B. siehe Fisher, Laboratory Techniques In Biochemistry And Molecular Biology, Hrsg., Work and Burdon, Elsevier, 1980) weiter aufgereinigt werden. Vorzugsweise erfolgt die Aufreinigung um mindestens das 2-fache, besonders bevorzugt um mindestens das 10-fache, noch weiter bevorzugt um mindestens das 100-fache und am meisten bevorzugt um mindestens das 1000-fache.

Verwendung von aus Milch transgener Tiere aufgereinigtem rHuAFP

[0056] rHuAFP (Murgita et al., U.S.P.N. 5.384.250) in Milch, oder aus Milch aufgereinigt, kann als diagnostischer Standard (z.B. zur Feststellung erhöhter Spiegel von AFP im Serum erwachsener Menschen,

welche das Vorhandensein von Krebs oder einer Leberregeneration anzeigen können) oder als Therapeutikum verwendet werden. Zum Beispiel kann das durch die erfindungsgemäßen Verfahren hergestellte rHuAFP an Säugetiere verabreicht werden, um das Wachstum von Krebszellen zu hemmen, die Proliferation von Knochenmarkszellen zu induzieren (zum Beispiel nach einer Knochenmarktransplantation oder nach Verabreichung einer myelotoxischen Behandlung wie beispielsweise einer Chemotherapie) oder als immunsuppressives Mittel (zum Beispiel zur Behandlung von systemischem Lupus erythematosus, Myasthenia gravis, insulinabhängigem Diabetes mellitus oder zur Hemmung der Abstoßung eines transplantierten Organs).

[0057] rHuAFP in Milch, oder aus Milch aufgereinigt, kann entweder allein oder in Kombination mit einem pharmazeutisch annehmbaren Träger oder Diluens, entweder allein oder in Kombination mit anderen therapeutischen Mitteln durch jedes konventionelle Mittel, das dem Fachmann bekannt ist, z.B. intravenös, oral, intramuskulär oder intranasal, in einer wirksamen Menge verabreicht werden.

Beispiel I: Erzeugung von transgenen Ziegen, die rekombinantes Human-AFP (rHuAFP) exprimieren

Transgen-Konstruktion und Erzeugung von transgenen Ziegen

[0058] Transgene Ziegen, die rHuAFP unter der Kontrolle des Ziegen-Beta-Casein-Promotors in ihrer Milch exprimieren, werden wie folgt erzeugt. Ein DNA-Fragment, das die volle Länge der kodierenden Region von Human-AFP enthält und dem die Translationsstartsequenz fehlt, wird erhalten durch Vornahme einer Polymerasekettenreaktion(PCR)-Amplifikation unter Verwendung eines Plasmids, das die HuAFP-cDNA (Genbank-Zugriffsnummer J00077) enthält, beispielsweise pHuAFP (beschrieben in Murgita et al., U.S.P.N. 5.384.250), als Matrize und den folgenden Oligonukleotid-Primern: NH₂(5'-AAA CTC GAG AAG TGG GTG GAA-3') und COOH(5'-AAA CTC GAG TTA AAC TCC CAA AGC-3').

[0059] Jede PCR-Reaktion enthält 34 µl DNA-Matrize, 10 µl von 10 pmol/µl 5'-Primer, 10 µl 10x Reaktionspuffer, 20 µl 1 mM dNTPs, 2 µl DMSO und 1 µl DNA-Matrize, 10 µl von 10 pmol/µl von 10 pmol/µl 5'-Primer, 10 µl von 10 pmol/µl 3'-Primer, 1 µl Glycerin, 10 µl DMSO und 1 µl Pfu-DNA-Polymerase. Die Anlagerungs-, Verlängerungs- und Denaturierungstemperaturen betragen 50°C, 72°C beziehungsweise 94°C, für 30 Zyklen, unter Verwendung des Gene-Amp-PCR-Systems 9600. Die aus den PCR-Reaktionen erhaltene 1783-bp-DNA wird mit Xho I verdaut und dann durch Isolierung des Fragments aus einem 0,7% TAE-Agarosegel mit anschließender Gelextraktion unter Einsatz des GeneClean-Verfahrens

(Bio 101; Vista, CA) nach Anweisungen des Herstellers aufgereinigt.

[0060] Der Transgenvektor (siehe [Fig. 1](#); siehe Meade et al., U.S.P.N. 5.827.690) enthält ein verändertes Ziegen-Beta-Casein-Gen mit einer Xho-I-Stelle an Stelle des kodierenden Abschnitts des Gens. Der aus dem Ziegen-Beta-Casein-Gen entfernte Bereich erstreckt sich von der Taq-I-Stelle in Exon 2 bis zur Ppu-MI-Stelle in Exon 7. Exon 2 enthält zusätzlich zu einem Sekretionssignal von 15 Aminosäuren das Translationsstartkodon. Um das Ziegen-Beta-Casein/Human-AFP-Transgen zu erzeugen, wird die XhoI/XhoI-HuAFP-cDNA in den Exons 2 und 7 des Ziegen-Beta-Caseingens an der XhoI-Stelle ligiert. Das vollständige Transgen enthält 6,2 kb 5'-Ziegen-Beta-Casein-Sequenz, die 1,8-kb-rHuAFP-cDNA und die flankierende 7,1-kb 3'-Ziegen-Beta-Casein-Sequenz.

[0061] Transgene Ziegen werden erzeugt, indem das 15,1-kb-Fragment des Ziegen-Beta-Casein-HuAFP, befreit von prokaryotischer DNA, bei einer Konzentration von 1,0 µg/ml in 10 mM Tris, pH 7,5, 0,1 mM EDTA, in die Pronuklei gewonnener Embryonen injiziert wird. Die injizierten Embryonen werden dann auf Empfängerweibchen übertragen. Eine transgene Gründer(F_0)-Ziege wird durch Analyse der genomischen DNA aus Blut durch Polymerasekettenreaktion (PCR) und durch Southernblot-Analyse, um die Anwesenheit des Transgens festzustellen, identifiziert. Für die PCR-Analyse werden bei dieser Reaktion dieselben zwei Oligonukleotide verwendet, die zur Erzeugung der HuAFP-cDNA verwendet werden. Für die Southernblot-Analyse wird die DNA auf einem 1% TBE-Agarosegel fraktioniert, auf Nitrozellulose gebロットet und mit einer "random-primed" 32 P-markierten 1,8-kb-HuAFP-cDNA sondiert. Der identifizierte Gründer wird dann mit einem nicht transgenen Tier gekreuzt, um transgene Nachkommen zu erzeugen. Alternativ können transgene Nachkommen durch Kerntransfer, wie oben beschrieben, erhalten werden. Die Übertragung des Transgens wird durch Analyse genomischer DNA aus Blut festgestellt, wie oben beschrieben.

Induktion der Laktation

[0062] Weibliche Tiere in einem Alter von 12 Monaten oder älter werden durch Hormontherapie und Handstimulation über eine Dauer von 12 Tagen dazu angeregt, zu laktieren. Während der ersten vier Tage erhalten die Tiere subkutane Injektionen von 0,1 mg/kg Estradiol 17-β und 0,25 mg/kg Progesteron, gelöst in 100% Ethanol. Diese tägliche Menge wird zwischen morgendlichen und abendlichen Injektionen aufgeteilt. Das Euter wird einmal täglich befühlt und die Zitzen werden jeden Morgen für 5-10 Minuten mit der Hand stimuliert. Laktierende transgene Weibchen werden zweimal am Tag manuell gemolken und

die Milch wird bei -20°C gefroren gelagert.

Proteinreinigung

[0063] Transgene Ziegenmilch, enthaltend rHuAFP, wird aufgetaut und der pH mit Eisessig auf 4,4 eingestellt, um das Casein auszufällen. Das erhaltene Präzipitat wird durch Zentrifugation bei $8000 \times g$ für 20 Minuten bei 4°C entfernt. Der Überstand wird mit NaOH auf pH 5,5 eingestellt und durch ein 22-µm-Filter filtriert. Das rHuAFP wird aus der Molkenfraktion durch Aufbringen des Filtrats auf eine Butyl-Toyoppearl-Säule, die in 0,2 M Natriumphosphat, 0,1 M Arginin-HCl, 0,01% Tween 80, pH 6,0, äquilibriert ist, aufgereinigt. Das rHuAFP wird mit einer Lösung aus 0,2 M Natriumphosphat, 0,1 M Arginin-HCl, 70% Ethylenglykol, eluiert. Fraktionen, die rHuAFP enthalten, ermittelt durch Westernblot oder ELISA, werden zusammengefasst und gegen 30 mM Tris-HCl, pH 8,0, dialysiert. Die endgültige Aufreinigung von rHuAFP wird durch Aufbringen der dialysierten Probe auf eine Mono-Q-Säule, äquilibriert in 20 mM Tris-HCl, pH 8,0, erreicht. Gebundene Proteine werden bei einem Stufengradienten von 0-100% 91 M NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 8,0) eluiert.

Beispiel II: Ausgestaltung eines genomischen Alpha-Fetoprotein-Transgen-Expressionskonstrukts

Klonierung des Human-AFP-Gens

[0064] Das Gen für menschliches AFP erstreckt sich über annähernd 19 kb und enthält 15 Exons (14 kodierend), die durch 14 Introns getrennt sind. Die vollständige Sequenz des Human-AFP-Gens ist von Gibbs et al. (Biochemistry 26: 1332-1343, 1987) beschrieben worden und unter der GenBank-Zugriffsnummer M16610 wiedergegeben. Das Gen wurde anfangs in zwei Fragmenten von ungefähr 15 kb kloniert, die dann kombiniert wurden, um das exprimierte Protein zu erzeugen.

[0065] Eine menschliche plazentale genomische Bibliothek (Stratagene, La Jolla, CA) mit einer durchschnittlichen Insertionsgröße zwischen 9 und 23 kb wurde anfänglich mit einer Reihe von komplementären Oligonukleotidsonden, die Exons am Anfang, in der Mitte und am Ende des Human-AFP-Gens erkennen, gesichtet.

[0066] Die erste Sichtung ergab keine positiven Klone. Zwei größere DNA-Sonden wurden dann unter Verwendung der Polymerasekettenreaktion (PCR) hergestellt, um Bereiche des Anfangs und Endes des AFP-Gens von menschlicher genomischer DNA zu amplifizieren (Pfeile, [Fig. 2](#)). Die anschließende Sichtung der Bibliothek mit diesen Sonden brachte zwei überlappende Lambda(λ)-Phagen-Klone von ungefähr 15 kb hervor, die sich zusammen über die Länge des Human-AFP-Gens erstrecken ([Fig. 2](#)).

Konstrukt-Ausgestaltung

[0067] Die beiden Phageninsertionen wurden dann in einen superCOS-1-Vektor subkloniert (dieser Vektor wurde verwendet, weil er größere DNA-Insertionen bewältigen kann). Die beiden erhaltenen Subklone, gtc912 und gtc913, werden dann wie folgt manipuliert, um die endgültigen Expressionskonstrukte zu erzeugen. Erstens werden Sequenzen 5' und 3' von der kodierenden Region entfernt. Darüber hinaus wird am 5'-Ende eine Kozak-Sequenz hinzugefügt, um eine effiziente Initiation der Translation sicherzustellen. Dies wird bewerkstelligt durch Inserieren von Restriktionsenzym-"Linkern" in die Gensequenzen für die anschließende Exzision der entsprechenden Sequenzen, wobei die flankierenden Sequenzen intakt bleiben ([Fig. 3](#) & [Fig. 4](#)). Zweitens werden die 5'- und 3'-Stücke aus ihren jeweiligen Vektoren unter Verwendung eines Enzyms, das beiden Insertionen gemeinsam ist, ausgeschnitten, was es möglich macht, sie zu verbinden, um das vollständige Gen zu bilden. Das Enzym BglI wird verwendet, da es einmal am 3'-Ende des 5'-Stücks (IK179) und einmal, an derselben Stelle, am 5'-Ende des 3'-Stücks (IK175) schneidet. Schließlich werden diese beiden Stücke in einem superCos-Plasmidvektor in der Sall-Stelle miteinander verknüpft, und dann wird das gesamte genomische Fragment in die Sall-Stelle eines GTC-Beta-Casein-Expressionsvektors platziert ([Fig. 5](#)).

[0068] Das genomische AFP-Genkonstrukt kann, falls gewünscht, an seiner einzelnen N-verknüpften Glykosylierungsstelle mutiert werden. Unter Verwendung von Restriktionsstellen, die die Glykosylierungsstelle flankieren (z.B. DsaI und BlnI), kann ein Oligonukleotid, das die Mutation (N zu Q) enthält, unter Verwendung von molekularbiologischen Standardtechniken (z.B. Lückenmutagenese ("gapped mutagenesis")) ersetzt werden. Die nicht-glykosylierte Version des genomischen AFP wird dann wie oben beschrieben in den Beta-Casein-Vektor ligiert und verwendet, um ein transgenes Tier, z.B. eine Maus, eine Ziege, ein Schaf, ein Schwein oder eine Kuh zu erzeugen.

[0069] Die im folgenden aufgeführten Publikationen beschreiben die Erzeugung, Detektion und Analyse von transgenen Tieren, die rekombinante Proteine in Milch sekretieren, sowie die Aufreinigung der rekombinanten Proteine: Hurwitz et al., U.S.P.N. 5.648.243 (Ziegen); Meade, et al., U.S.P.N. 5.827.690 (Ziegen); DiTullio et al., U.S.P.N. 5.843.705 (Ziegen); Clark et al., U.S.P.N. 5.322.775 (Schafe); Garner et al., U.S.P.N. 5.639.940 (Schafe); Deboer et al., U.S.P.N. 5.633.076 (Kühe); und Drohan et al., U.S.P.N. 5.589.604 (Schweine und Mäuse).

Patentansprüche

1. Im Wesentlichen reines Nukleinsäuremolekül,

umfassend:

(i) eine Nukleinsäuresequenz, die rekombinantes humanes Alpha-Fetoprotein (rHuAFP) kodiert
(ii) einen milchspezifischen Promotor, wobei der Promotor funktionsfähig mit der rHuAFP-kodierenden Sequenz verknüpft ist, und
(iii) eine Leadersequenz, die ein Proteinsekretionssignal kodiert, das die Sekretion des rHuAFP durch milchproduzierende Zellen in die Milch eines Säugtiers ermöglicht.

2. Nicht-menschliches transgenes Säugetier, das rekombinantes humanes Alpha-Fetoprotein (rHuAFP) in seiner Milch exprimiert, wobei milchproduzierende Zellen des Säugetiers ein Transgen enthalten, das folgendes umfasst:

(i) eine Nukleinsäuresequenz, die rHuAFP kodiert
(ii) einen milchspezifischen Promotor, wobei der Promotor funktionsfähig mit der rHuAFP-kodierenden Sequenz verknüpft ist, und
(iii) eine Leadersequenz, die ein Proteinsekretionssignal kodiert, das die Sekretion des rHuAFP durch milchproduzierende Zellen in die Milch eines Säugtiers ermöglicht.

3. Nicht-menschliches transgenes Säugetier nach Anspruch 2, wobei das Säugetier eine Ziege, eine Kuh, ein Schaf oder ein Schwein ist.

4. Milch eines nicht-menschlichen Säugetiers, die rekombinantes humanes Alpha-Fetoprotein (rHuAFP) umfasst.

5. Milch eines nicht-menschlichen Säugetiers nach Anspruch 4, wobei das rHuAFP löslich ist.

6. Verfahren zur Herstellung von rekombinantem humanem Alpha-Fetoprotein (rHuAFP), das in die Milch eines nicht-menschlichen Säugetiers sekretiert wird, wobei das Verfahren die folgenden Schritte umfasst:

(a) das Bereitstellen einer Zelle, die mit einem Transgen transfiziert ist, das folgendes umfasst:
(i) eine Nukleinsäuresequenz, die rHuAFP kodiert
(ii) einen milchspezifischen Promotor, wobei der Promotor funktionsfähig mit der rHuAFP-kodierenden Sequenz verknüpft ist, und
(iii) eine Leadersequenz, die ein Proteinsekretionssignal kodiert, das die Sekretion des rHuAFP durch eine milchproduzierende Zelle ermöglicht, wobei die milchproduzierende Zelle von der transfizierten Zelle abgeleitet ist.
(b) das Anziehen der Zelle, um ein Säugetier zu erzeugen, das milchproduzierende Zellen umfasst, die das rHuAFP exprimieren und in die Milch sekretieren, und
(c) das Gewinnen der das rHuAFP enthaltenden Milch von dem Säugetier.

7. Verfahren nach Anspruch 6, wobei das

rHuAFP aus der Milch aufgereinigt wird.

8. Milch eines nicht-menschlichen Säugetiers, die rekombinantes humanes Alpha-Fetoprotein (rHuAFP) umfasst, zur Verwendung in einem Verfahren zur Behandlung eines Patienten mit einem Bedarf an rHuAFP.

9. Milch eines nicht-menschlichen Säugetiers nach Anspruch 8, wobei die Milch des nicht-menschlichen Säugetiers vorgesehen ist zur:

- (a) Behandlung von Krebs,
- (b) Suppression des Immunsystems eines Patienten, der dessen bedarf, oder
- (c) Induktion der Proliferation von Knochenmarkszellen bei einem Patienten, der dessen bedarf.

Es folgen 4 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

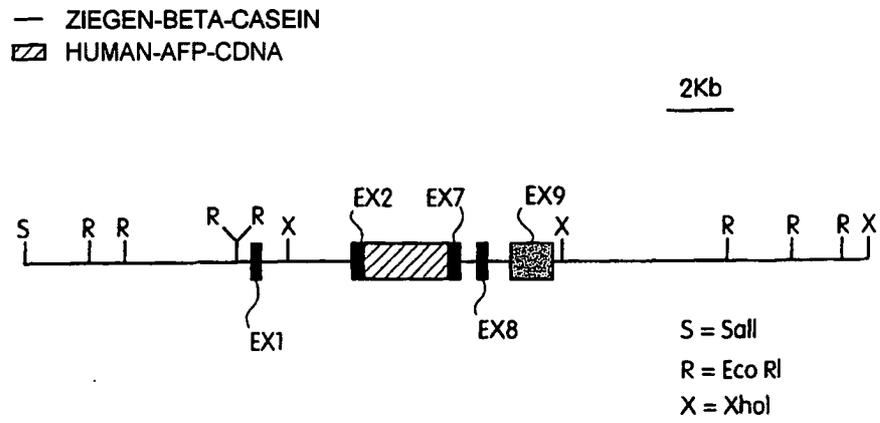


Fig. 1

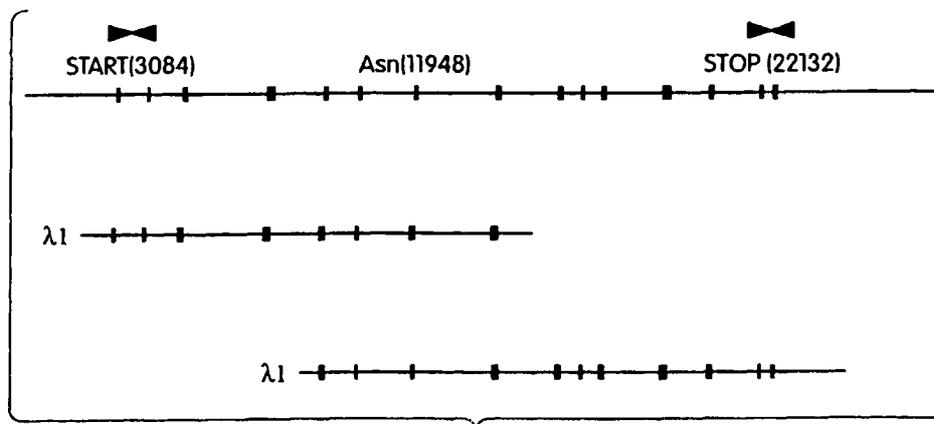


Fig. 2

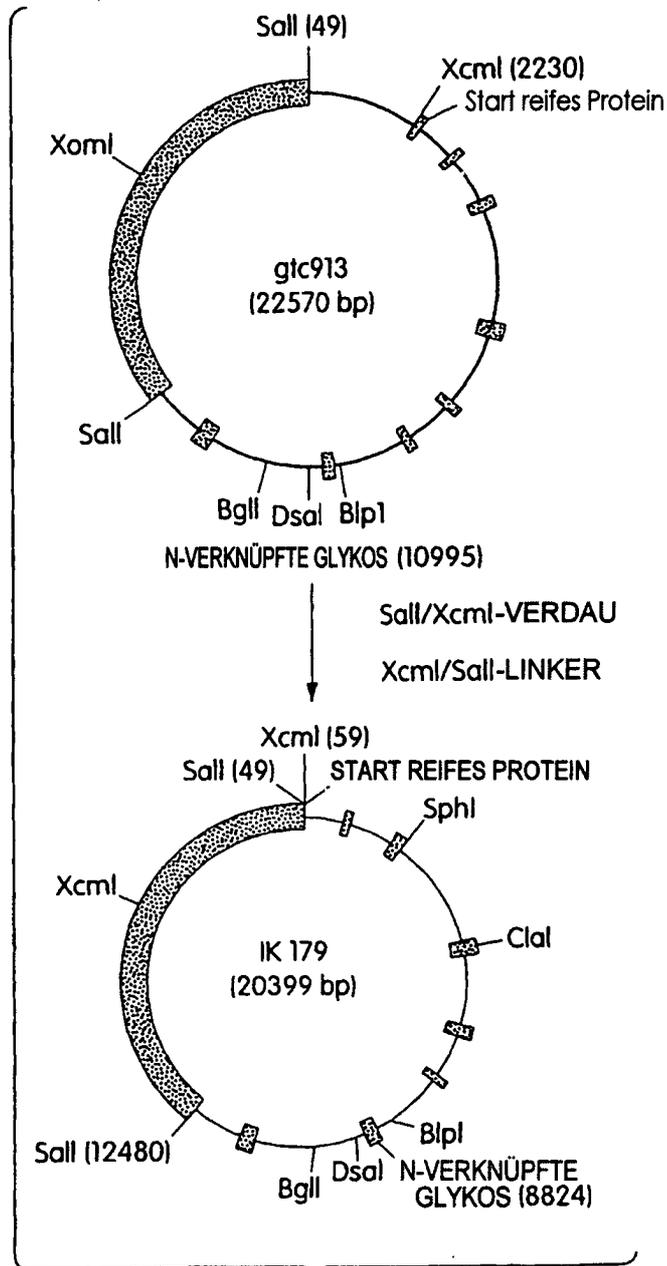


Fig. 3

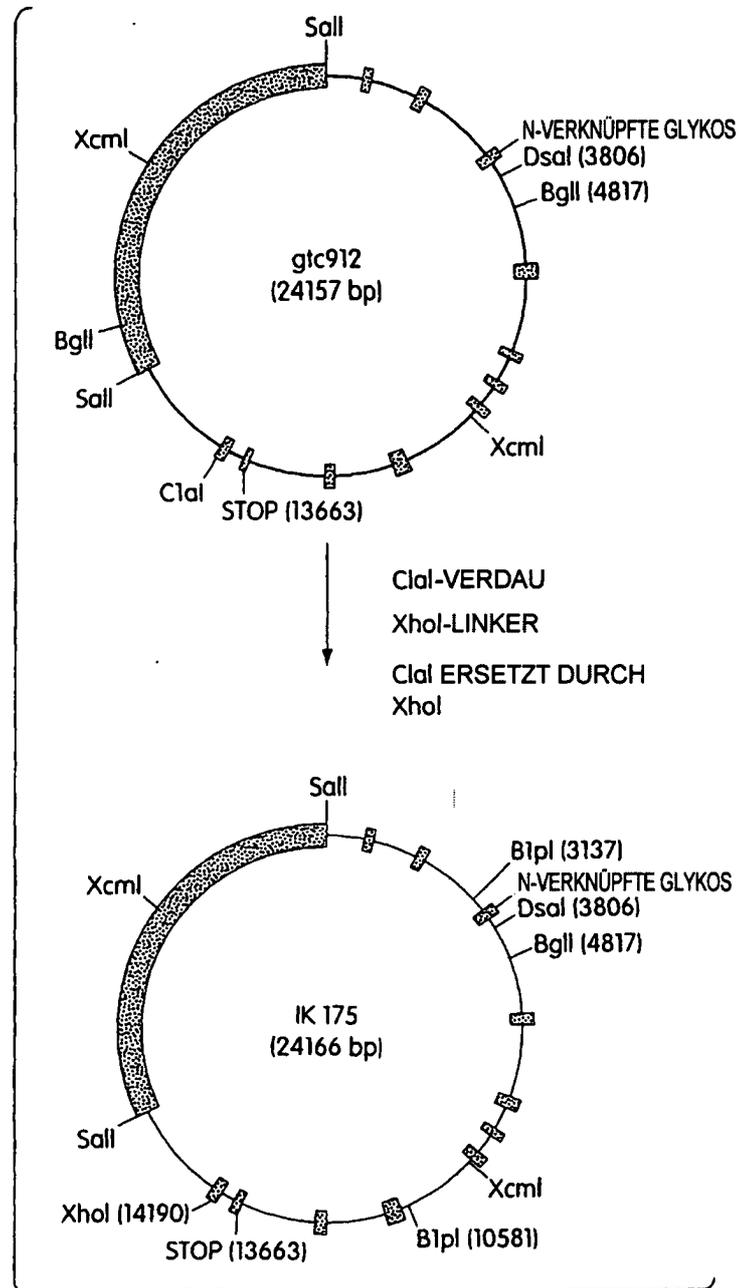


Fig. 4

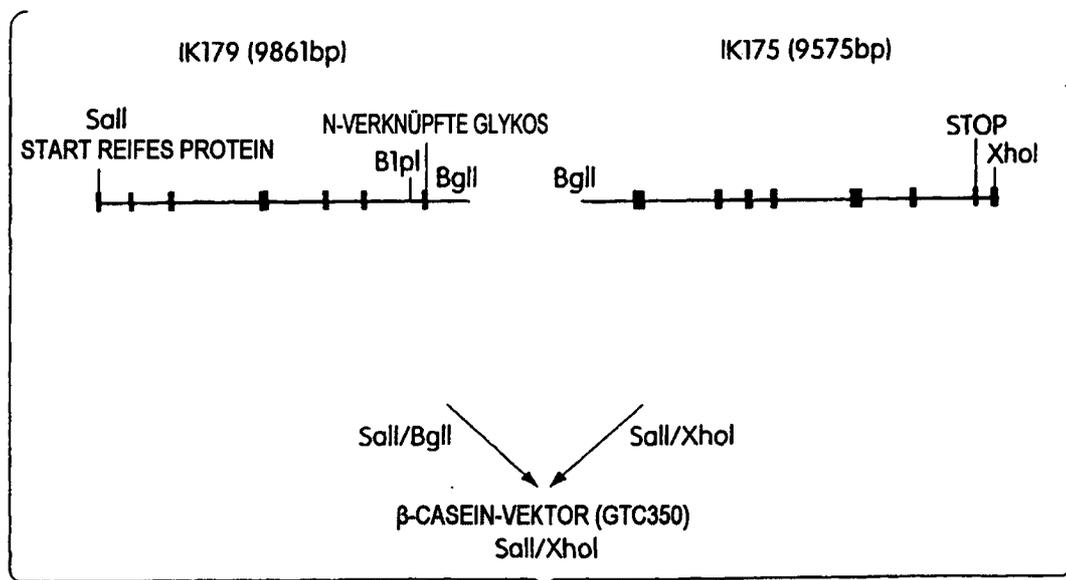


Fig. 5