



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0090770
(43) 공개일자 2020년07월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A01K 67/027 (2006.01) C12N 9/12 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A01K 67/0278 (2013.01)
C12N 9/12 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-7013978
(22) 출원일자(국제) 2018년11월30일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2020년05월15일
(86) 국제출원번호 PCT/US2018/063390
(87) 국제공개번호 WO 2019/108983
국제공개일자 2019년06월06일
(30) 우선권주장
62/592,905 2017년11월30일 미국(US)
62/661,373 2018년04월23일 미국(US)

(71) 출원인
리제너론 파마슈티칼스 인코포레이티드
미합중국 뉴욕주 10591 타리타운 올드 소우 밀 리버 로드 777
(72) 발명자
무지카 알렉산더 오.
미국 뉴욕 10591 태리타운 올드 소우 밀 리버 로드 777 리제너론 파마슈티칼스 인코포레이티드 내
탕 야준
미국 뉴욕 10591 태리타운 올드 소우 밀 리버 로드 777 리제너론 파마슈티칼스 인코포레이티드 내
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인와이에스장

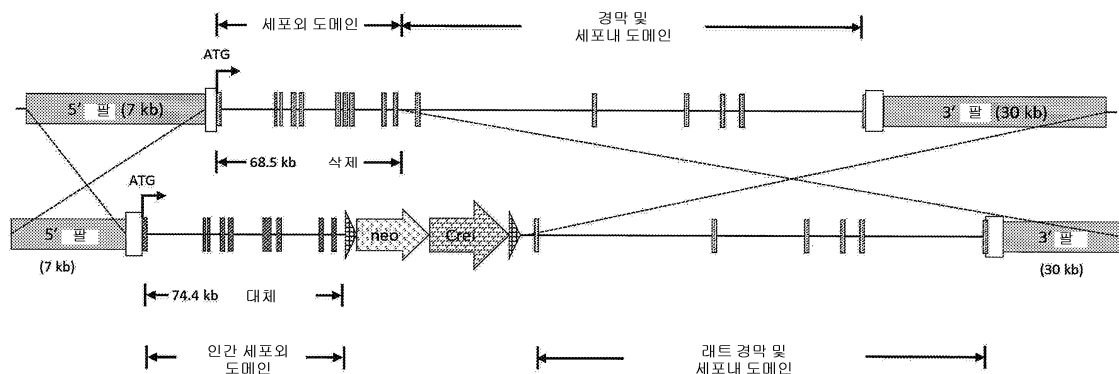
전체 청구항 수 : 총 57 항

(54) 발명의 명칭 인간화된 TRKB 유전자좌를 포함하는 비인간 동물

(57) 요약

인간화된 TRKB 유전자좌를 포함하는 비인간 동물 계놈, 비인간 동물 세포, 및 비인간 동물 및 이러한 비인간 동물 계놈, 비인간 동물 세포, 및 비인간 동물의 제조 및 사용 방법이 제공된다. 인간화된 TRKB 유전자좌를 포함하는 비인간 동물 세포 또는 비인간 동물은 인간 TRKB 단백질 또는 그것의 단편이 인간 TRKB로부터 유래되는 키메라 트랜스티레틴 단백질을 발현한다. 인간 TRKB를 표적화하도록 설계된 뉴클레아제 작용제와 같은 인간-TRKB-표적화 시약의 생체내 효능을 평가하기 위하여 인간화된 TRKB 유전자좌를 포함하는 그러한 비인간 동물의 사용 방법이 제공된다.

대표도



도 4

(52) CPC특허분류

C12Y 207/10001 (2013.01)

A01K 2217/072 (2013.01)

A01K 2227/105 (2013.01)

A01K 2267/03 (2013.01)

(72) 발명자

리 제프리 디.

미국 뉴욕 10591 태리타운 올드 소우 밀 리버 로드
777 리제너론 파마슈티칼스 인코포레이티드 내

가오 민

미국 뉴욕 10591 태리타운 올드 소우 밀 리버 로드
777 리제너론 파마슈티칼스 인코포레이티드 내

크롤 수잔

미국 뉴욕 10591 태리타운 올드 소우 밀 리버 로드
777 리제너론 파마슈티칼스 인코포레이티드 내

맥도날드 린

미국 뉴욕 10591 태리타운 올드 소우 밀 리버 로드
777 리제너론 파마슈티칼스 인코포레이티드 내

후 잉

미국 뉴욕 10591 태리타운 올드 소우 밀 리버 로드
777 리제너론 파마슈티칼스 인코포레이티드 내

로마노 카르멜로

미국 뉴욕 10591 태리타운 올드 소우 밀 리버 로드
777 리제너론 파마슈티칼스 인코포레이티드 내

명세서

청구범위

청구항 1

TRKB 단백질을 암호화하는 유전자 변형된 내인성 *TrkB* 유전자좌를 포함하는 비인간 동물로서, TRKB 단백질은 세포질 도메인, 경막 도메인, 및 세포외 도메인을 포함하며, 세포외 도메인의 전부 또는 일부는 삭제되고 병렬상동 인간 *TRKB* 서열로 대체된 내인성 *TrkB* 유전자좌의 분절에 의해 암호화되는, 비인간 동물.

청구항 2

제1항에 있어서, TRKB 단백질은 인간 TRKB 세포외 도메인을 포함하는 것을 특징으로 하는 비인간 동물.

청구항 3

제2항에 있어서, 세포외 도메인은 SEQ ID NO: 60에 제시된 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 비인간 동물.

청구항 4

제2항 또는 제3항에 있어서, 세포외 도메인의 전부는 삭제되고 병렬상동 인간 *TRKB* 서열로 대체된 내인성 *TrkB* 유전자좌의 분절에 의해 암호화되며, 선택적으로 세포외 도메인에 대한 코딩 서열은 SEQ ID NO: 72에 제시된 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 비인간 동물.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, TRKB 단백질은 내인성 신호 펩타이드를 포함하는 것을 특징으로 하는 비인간 동물.

청구항 6

제5항에 있어서, 신호 펩타이드는 SEQ ID NO: 51 또는 55에 제시된 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 비인간 동물.

청구항 7

제5항 또는 제6항에 있어서, 신호 펩타이드의 전부는 내인성 *TrkB* 서열에 의해 암호화되고, 선택적으로 신호 펩타이드에 대한 코딩 서열은 SEQ ID NO: 63 또는 67에 제시된 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 비인간 동물.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, TRKB 단백질은 내인성 TRKB 경막 도메인을 포함하는 것을 특징으로 하는 비인간 동물.

청구항 9

제8항에 있어서, 경막 도메인은 SEQ ID NO: 53 또는 57에 제시된 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 비인간 동물.

청구항 10

제8항 또는 제9항에 있어서, 경막 도메인의 전부는 내인성 *TrkB* 서열에 의해 암호화되고, 선택적으로 경막 도메인에 대한 코딩 서열은 SEQ ID NO: 65 또는 69에 제시된 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 비인간 동물.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, TRKB 단백질은 내인성 TRKB 세포질 도메인을 포함하는 것을 특징으로 하는 비인간 동물.

청구항 12

제11항에 있어서, 세포질 도메인은 SEQ ID NO: 54 또는 58에 제시된 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 비인간 동물.

청구항 13

제11항 또는 제12항에 있어서, 세포질 도메인의 전부는 내인성 *TrkB* 서열에 의해 암호화되고, 선택적으로 세포질 도메인에 대한 코딩 서열은 SEQ ID NO: 66 또는 70에 제시된 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 비인간 동물.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, TRKB 단백질은 내인성 TRKB 신호 펩타이드, 내인성 TRKB 경막 도메인, 및 내인성 TRKB 세포질 도메인을 포함하는 것을 특징으로 하는 비인간 동물.

청구항 15

제14항에 있어서,

신호 펩타이드는 SEQ ID NO: 51에 제시된 서열을 포함하고, 경막 도메인은 SEQ ID NO: 53에 제시된 서열을 포함하며, 세포질 도메인은 SEQ ID NO: 54에 제시된 서열을 포함하거나, 또는

신호 펩타이드는 SEQ ID NO: 55에 제시된 서열을 포함하고, 경막 도메인은 SEQ ID NO: 57에 제시된 서열을 포함하며, 세포질 도메인은 SEQ ID NO: 58에 제시된 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 비인간 동물.

청구항 16

제14항 또는 제15항에 있어서, 신호 펩타이드의 전부, 경막 도메인의 전부, 및 세포질 도메인의 전부는 내인성 *TrkB* 서열에 의해 암호화되고,

선택적으로 신호 펩타이드에 대한 코딩 서열은 SEQ ID NO: 63에 제시된 서열을 포함하며, 경막 도메인에 대한 코딩 서열은 SEQ ID NO: 65에 제시된 서열을 포함하며, 세포질 도메인에 대한 코딩 서열은 SEQ ID NO: 66에 제시된 서열을 포함하거나, 또는

선택적으로 신호 펩타이드에 대한 코딩 서열은 SEQ ID NO: 67에 제시된 서열을 포함하고, 경막 도메인에 대한 코딩 서열은 SEQ ID NO: 69에 제시된 서열을 포함하며, 세포질 도메인에 대한 코딩 서열은 SEQ ID NO: 70에 제시된 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 비인간 동물.

청구항 17

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, TRKB 단백질은 키메라 비인간 동물/인간 TRKB 단백질인 것을 특징으로 하는 비인간 동물.

청구항 18

제17항에 있어서, 세포의 도메인은 인간 TRKB 세포의 도메인이고, 경막 도메인은 내인성 TRKB 단백질 경막 도메인이며, 세포질 도메인은 내인성 TRKB 단백질 세포질 도메인인 것을 특징으로 하는 비인간 동물.

청구항 19

제17항 또는 제18항에 있어서, TRKB 단백질은 SEQ ID NO: 4 또는 5에 제시된 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 비인간 동물.

청구항 20

제19항에 있어서, TRKB 단백질을 암호화하는 유전자 변형된 *TrkB* 유전자좌의 코딩 서열은 SEQ ID NO: 12 또는 13에 제시된 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 비인간 동물.

청구항 21

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 비인간 동물은 유전자 변형된 내인성 *TrkB* 유전자좌에 대해 이형접합성인 것을 특징으로 하는 비인간 동물.

청구항 22

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 비인간 동물은 유전자 변형된 내인성 *TrkB* 유전자좌에 대해 동형접합성인 것을 특징으로 하는 비인간 동물.

청구항 23

제1항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 비인간 동물은 포유류인 것을 특징으로 하는 비인간 동물.

청구항 24

제23항에 있어서, 비인간 동물은 설치류인 것을 특징으로 하는 비인간 동물.

청구항 25

제24항에 있어서, 비인간 동물은 래트 또는 마우스인 것을 특징으로 하는 비인간 동물.

청구항 26

제25항에 있어서, 비인간 동물은 래트인 것을 특징으로 하는 비인간 동물.

청구항 27

제26항에 있어서, TRKB 단백질은 SEQ ID NO: 5에 제시된 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 비인간 동물.

청구항 28

제27항에 있어서, TRKB 단백질을 암호화하는 유전자 변형된 *TrkB* 유전자좌의 코딩 서열은 SEQ ID NO: 13에 제시된 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 비인간 동물.

청구항 29

제25항에 있어서, 비인간 동물은 마우스인 것을 특징으로 하는 비인간 동물.

청구항 30

제29항에 있어서, TRKB 단백질은 SEQ ID NO: 4에 제시된 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 비인간 동물.

청구항 31

제30항에 있어서, TRKB 단백질을 암호화하는 유전자 변형된 *TrkB* 유전자좌의 코딩 서열은 SEQ ID NO: 12에 제시된 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 비인간 동물.

청구항 32

생체내에서 인간-TRKB-표적화 시약의 활성을 평가하는 방법으로서,

(a) 제1항 내지 제31항 중 어느 한 항의 비인간 동물에게 인간-TRKB-표적화 시약을 투여하는 단계; 및

(b) 비인간 동물에서 인간-TRKB-표적화 시약의 활성을 평가하는 단계

를 포함하는 방법.

청구항 33

제32항에 있어서, 단계 (a)는 비인간 동물에게 인간-TRKB-표적화 시약을 주사하는 것을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 34

제32항 또는 제33항에 있어서, 단계 (b)는 대조군-비인간 동물과 관련하여 체중, 체성분, 대사, 및 운동 중 하

나 이상에서의 변화를 평가하는 것을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 35

제34항에 있어서, 체성분의 변화를 평가하는 것은 대조군 비인간 동물과 관련하여 제지방 및/또는 지방량을 평가하는 것을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 36

제34항 또는 제35항에 있어서, 대사의 변화를 평가하는 것은 식량 소비 및/또는 물 소비의 변화를 평가하는 것을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 37

제32항 내지 제36항 중 어느 한 항에 있어서, 단계 (b)는 대조군 비인간 동물과 관련하여 MAPK/ERK 및 PI3K/Akt 경로의 TRKB 인산화 및/또는 활성화를 평가하는 것을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 38

제32항 내지 제37항 중 어느 한 항에 있어서, 단계 (b)는 신경보호 활성을 평가하는 것을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 39

제38항에 있어서, 단계 (b)는 신경보호 활성을 평가하는 것을 포함하고, 비인간 동물은 래트인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 40

제32항 내지 제39항 중 어느 한 항에 있어서, 단계 (b)는 망막 신경절 세포 생존 능력을 평가하는 것을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 41

제40항에 있어서, 망막 신경절 세포 생존 능력은 시신경 손상 후에 완전한 시신경 절단 모델에서 평가되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 42

제40항에 있어서, 망막 신경절 세포 생존 능력은 시신경 크러시 모델에서 평가되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 43

제32항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서, 인간-TRKB-표적화 시약은 항원 결합 단백질인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 44

제43항에 있어서, 항원 결합 단백질은 인간 TRKB 작용물질 항체인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 45

제32항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서, 인간-TRKB-표적화 시약은 소분자인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 46

제45항에 있어서, 소분자는 인간 TRKB 작용물질인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 47

제1항 내지 제31항 중 어느 한 항의 비인간 동물의 제조 방법으로서,

(a) 1세포기 배아가 아닌 비인간 동물 만능 세포에:

(i) 내인성 *TrkB* 유전자좌에서 5' 표적 서열에 혼성화하는 5' 상동성 팔 및 내인성 *TrkB* 유전자좌에서 3' 표적 서열에 혼성화하는 3' 상동성 팔이 옆에 있는 삽입물 핵산을 포함하는 외인성 수복 주형, 여기서 삽입물 핵산은 병렬상동 인간 *TRKB* 서열을 포함하는 것인 외인성 수복 주형; 및

(ii) 내인성 *TrkB* 유전자좌 내에서 표적 서열을 표적화하는 뉴클레아제 작용제를 도입하는 단계,

여기서 계놈은 유전자 변형된 내인성 *TrkB* 유전자좌를 포함하도록 변형되는 것인 단계;

(b) 변형된 비인간 동물 만능 세포를 숙주 배아에 도입하는 단계; 및

(c) 숙주 배아를 대리 모체에 이식하여 유전자 변형된 내인성 *TrkB* 유전자좌를 포함하는 유전자 변형된 F0 세대 비인간 동물을 생성하는 단계

를 포함하는 방법.

청구항 48

제47항에 있어서, 만능 세포는 배아 줄기 (ES) 세포인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 49

제47항 또는 제48항에 있어서, 뉴클레아제 작용제는 Cas9 단백질 및 내인성 *TrkB* 유전자좌 내에서 가이드 RNA 표적 서열을 표적으로 하는 가이드 RNA인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 50

제49항에 있어서, 단계 (a)는 내인성 *TrkB* 유전자좌 내에서 제2 가이드 RNA 표적 서열을 표적으로 하는 제2 가이드 RNA를 비인간 동물 만능 세포에 도입하는 단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 51

제47항 내지 제50항 중 어느 한 항에 있어서, 외인성 수복 주형은 길이가 적어도 10 kb인 큰 표적화 벡터이거나, 또는 외인성 수복 주형은 5' 상동성 팔 및 3' 상동성 팔의 총 합의 길이가 적어도 10 kb인 큰 표적화 벡터인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 52

제1항 내지 제31항 중 어느 한 항의 비인간 동물의 제조 방법으로서,

(a) 비인간 동물 1세포기 배아에:

(i) 내인성 *TrkB* 유전자좌에서 5' 표적 서열에 혼성화하는 5' 상동성 팔 및 내인성 *TrkB* 유전자좌에서 3' 표적 서열에 혼성화하는 3' 상동성 팔이 옆에 있는 삽입물 핵산을 포함하는 외인성 수복 주형, 여기서 삽입물 핵산은 병렬상동 인간 *TRKB* 서열을 포함하는 것인 외인성 수복 주형; 및

(ii) 내인성 *TrkB* 유전자좌 내에서 표적 서열을 표적화하는 뉴클레아제 작용제를 도입하는 단계,

여기서 계놈은 유전자 변형된 내인성 *TrkB* 유전자좌를 포함하도록 변형되는 것인 단계; 및

(b) 변형된 비인간 동물 1세포기 배아를 대리 모체에 이식하여 유전자 변형된 내인성 *TrkB* 유전자좌를 포함하는 유전자 변형된 F0 세대 비인간 동물을 생성하는 단계

를 포함하는 방법.

청구항 53

제52항에 있어서, 뉴클레아제 작용제는 Cas9 단백질 및 내인성 *TrkB* 유전자좌 내에서 가이드 RNA 표적 서열을 표적으로 하는 가이드 RNA인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 54

제53항에 있어서, 단계 (a)는 내인성 *TrkB* 유전자좌 내에서 제2 가이드 RNA 표적 서열을 표적으로 하는 제2 가이드 RNA를 비인간 1세포 배아에 도입하는 단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 55

TRKB 단백질을 암호화하는 유전자 변형된 내인성 *TrkB* 유전자좌를 포함하는 비인간 동물 세포로서, TRKB 단백질은 세포질 도메인, 경막 도메인, 및 세포외 도메인을 포함하고, 세포외 도메인의 전부 또는 일부는 삭제되고 병렬상동 인간 *TRKB* 서열로 대체된 내인성 *TrkB* 유전자좌의 분절에 의해 암호화되는, 비인간 동물 세포.

청구항 56

TRKB 단백질을 암호화하는 유전자 변형된 내인성 *TrkB* 유전자좌를 포함하는 비인간 동물 계놈으로서, TRKB 단백질은 세포질 도메인, 경막 도메인, 및 세포외 도메인을 포함하고, 세포외 도메인의 전부 또는 일부는 삭제되고 병렬상동 인간 *TRKB* 서열로 대체된 내인성 *TrkB* 유전자좌의 분절에 의해 암호화되는, 비인간 동물 계놈.

청구항 57

TRKB 단백질을 암호화하는 유전자 변형된 내인성 *TrkB* 유전자좌를 생성하기 위한 표적화 벡터로서,

TRKB 단백질은 세포질 도메인, 경막 도메인, 및 세포외 도메인을 포함하고, 세포외 도메인의 전부 또는 일부는 삭제되고 병렬상동 인간 *TRKB* 서열로 대체된 내인성 *TrkB* 유전자좌의 분절에 의해 암호화되며,

표적화 벡터는 내인성 *TrkB* 유전자좌에서 5' 표적 서열을 표적화하는 5' 상동성 팔 및 내인성 *TrkB* 유전자좌에서 3' 표적 서열을 표적화하는 3' 상동성 팔이 옆에 있는 병렬상동 인간 *TRKB* 서열을 포함하는 삽입물 핵산을 포함하는,

표적화 벡터.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원에 대한 상호 참조

[0002] 본 출원은 2017년 11월 30일에 출원된 미국 출원 번호 62/592,905호, 및 2018년 4월 23일에 출원된 미국 출원 번호 62/661,373호의 이익을 주장하며, 상기 출원은 각각 모든 목적에 대해 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0003] EFS 웹을 통해 텍스트파일로서 제출된 서열 목록에 대한 참조

[0004] 523380SEQLIST.txt 파일로 쓰여진 서열 목록은 154 킬로바이트이고, 2018년 11월 30일에 생성되었으며, 본원에 참조로 포함된다.

배경 기술

[0005] 트로포미오신(tropomyosin) 수용체 키나제 B (TRKB)는 녹내장과 같은 신경퇴행성 질환에서 신경보호를 위한 유망한 표적이다. TRKB는 뇌에서 가장 광범위하게 분포된 신경영양 수용체 (NTR) 중 하나로, 신경교, 해마, 선조체, 및 뇌간에서 가장 풍부화된다. 뇌-유래 신경영양 인자 (BDNF)의 TRKB 수용체에 대한 결합은 세포내 도메인에서 티로신 잔기의 형태 변화 및 자가인산화를 통해 그것의 다이머화를 촉발하여, 미토젠-활성화 단백질 키나제 (MARK), 포스포티로실로신 3-키나제 (PI3K), 및 포스포리파제 C- γ (PLC- γ)를 포함한 신호전달 경로의 활성화를 초래한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] TRKB는 뉴런 생존, 분화, 및 기능에 중요하고, TRKB 작용물질은 수많은 신경학적, 정신적, 및 대사 장애에서 치료적 잠재력을 가질 수 있다. 그러나, 인간-TRKB-표적화 시약의 진정한 인간 표적 또는 진정한 인간 표적에 아주 가까운 비슷한 것을 제공하고, 그로써 약동학 및 약력학 연구뿐만 아니라 살아있는 동물에서 이러한 작용제

의 효능 및 작용 방식의 테스트를 가능하게 하는 적합한 비인간 동물에 대한 필요성이 남아 있다.

과제의 해결 수단

요약

[0008] 인간화된 *TRKB* 유전자좌를 포함하는 비인간 동물, 뿐만 아니라 이러한 비인간 동물을 사용하는 방법이 제공된다. 인간화된 *TRKB* 유전자좌를 포함하는 비인간 동물 게놈 또는 세포가 또한 제공된다.

[0009] 한 측면으로, 인간화된 *TRKB* 유전자좌를 포함하는 비인간 동물 게놈, 비인간 동물 세포, 또는 비인간 동물이 제공된다. 이러한 비인간 동물 게놈, 비인간 동물 세포, 또는 비인간 동물은 *TRKB* 단백질을 암호화하는 유전자 변형된 내인성 *TrkB* 유전자좌를 포함할 수 있고, 여기서 *TRKB* 단백질은 세포질 도메인, 경막 도메인, 및 세포외 도메인을 포함하며, 세포외 도메인의 전부 또는 일부는 삭제되고 병렬상동(orthologous) 인간 *TRKB* 서열로 대체된 내인성 *TrkB* 유전자좌의 분절에 의해 암호화된다.

[0010] 한 측면으로, 인간화된 *TrkB* 유전자좌를 포함하는 비인간 동물이 제공된다. 이러한 비인간 동물은 *TRKB* 단백질을 암호화하는 유전자 변형된 내인성 *TrkB* 유전자좌를 포함할 수 있고, 여기서 *TRKB* 단백질은 세포질 도메인, 경막 도메인, 및 세포외 도메인을 포함하며, 세포외 도메인의 전부 또는 일부는 삭제되고 병렬상동 인간 *TRKB* 서열로 대체된 내인성 *TrkB* 유전자좌의 분절에 의해 암호화된다.

[0011] 다른 측면으로, 그것의 게놈에 *TRKB* 단백질을 암호화하는 유전자 변형된 내인성 *TrkB* 유전자좌를 포함하는 비인간 동물 세포가 제공되며, 여기서 *TRKB* 단백질은 세포질 도메인, 경막 도메인, 및 세포외 도메인을 포함하고, 세포외 도메인의 전부 또는 일부는 삭제되고 병렬상동 인간 *TRKB* 서열로 대체된 내인성 *TrkB* 유전자좌의 분절에 의해 암호화된다.

[0012] 또 다른 측면으로, *TRKB* 단백질을 암호화하는 유전자 변형된 내인성 *TrkB* 유전자좌를 포함하는 비인간 동물 게놈이 제공되며, 여기서 *TRKB* 단백질은 세포질 도메인, 경막 도메인, 및 세포외 도메인을 포함하고, 세포외 도메인의 전부 또는 일부는 삭제되고 병렬상동 인간 *TRKB* 서열로 대체된 내인성 *TrkB* 유전자좌의 분절에 의해 암호화된다.

[0013] 일부 이러한 비인간 동물 게놈, 비인간 동물 세포, 또는 비인간 동물에서, *TRKB* 단백질은 인간 *TRKB* 세포외 도메인을 포함한다. 선택적으로, 세포외 도메인은 SEQ ID NO: 60에 제시된 서열을 포함한다. 선택적으로, 세포외 도메인은 전부 삭제되고 병렬상동 인간 *TRKB* 서열로 대체된 내인성 *TrkB* 유전자좌의 분절에 의해 암호화되며, 선택적으로 여기서 세포외 도메인에 대한 코딩 서열은 SEQ ID NO: 72에 제시된 서열을 포함한다.

[0014] 일부 이러한 비인간 동물 게놈, 비인간 동물 세포, 또는 비인간 동물에서, *TRKB* 단백질은 내인성 신호 펩타이드를 포함한다. 선택적으로, 신호 펩타이드는 SEQ ID NO: 51 또는 55에 제시된 서열을 포함한다. 선택적으로, 신호 펩타이드는 전부 내인성 *TrkB* 서열에 의해 암호화되며, 선택적으로 여기서 신호 펩타이드에 대한 코딩 서열은 SEQ ID NO: 63 또는 67에 제시된 서열을 포함한다.

[0015] 일부 이러한 비인간 동물 게놈, 비인간 동물 세포, 또는 비인간 동물에서, *TRKB* 단백질은 내인성 *TRKB* 경막 도메인을 포함한다. 선택적으로, 경막 도메인은 SEQ ID NO: 53 또는 57에 제시된 서열을 포함한다. 선택적으로, 경막 도메인은 전부 내인성 *TrkB* 서열에 의해 암호화되며, 선택적으로 여기서 경막 도메인에 대한 코딩 서열은 SEQ ID NO: 65 또는 69에 제시된 서열을 포함한다.

[0016] 일부 이러한 비인간 동물 게놈, 비인간 동물 세포, 또는 비인간 동물에서, *TRKB* 단백질은 내인성 *TRKB* 세포질 도메인을 포함한다. 선택적으로, 세포질 도메인은 SEQ ID NO: 54 또는 58에 제시된 서열을 포함한다. 선택적으로, 세포질 도메인은 내인성 *TrkB* 서열에 의해 암호화되고, 선택적으로 여기서 세포질 도메인에 대한 코딩 서열은 SEQ ID NO: 66 또는 70에 제시된 서열을 포함한다.

[0017] 일부 이러한 비인간 동물 게놈, 비인간 동물 세포, 또는 비인간 동물에서, *TRKB* 단백질은 내인성 *TRKB* 신호 펩타이드, 내인성 *TRKB* 경막 도메인, 및 내인성 *TRKB* 세포질 도메인을 포함한다. 선택적으로, 신호 펩타이드는 SEQ ID NO: 51에 제시된 서열을 포함하고, 경막 도메인은 SEQ ID NO: 53에 제시된 서열을 포함하며, 세포질 도메인은 SEQ ID NO: 54에 제시된 서열을 포함한다. 선택적으로, 신호 펩타이드는 SEQ ID NO: 55에 제시된 서열을 포함하고, 경막 도메인은 SEQ ID NO: 57에 제시된 서열을 포함하며, 세포질 도메인은 SEQ ID NO: 58에 제시된 서열을 포함한다. 선택적으로, 신호 펩타이드의 전부, 경막 도메인의 전부, 및 세포질 도메인의 전부는 내인성 *TrkB* 서열에 의해 암호화된다. 선택적으로, 신호 펩타이드에 대한 코딩 서열은 SEQ ID NO: 63에 제시된 서열을

포함하고, 경막 도메인에 대한 코딩 서열은 SEQ ID NO: 65에 제시된 서열을 포함하며, 세포질 도메인에 대한 코딩 서열은 SEQ ID NO: 66에 제시된 서열을 포함한다. 선택적으로, 신호 펩타이드에 대한 코딩 서열은 SEQ ID NO: 67에 제시된 서열을 포함하고, 경막 도메인에 대한 코딩 서열은 SEQ ID NO: 69에 제시된 서열을 포함하며, 세포질 도메인에 대한 코딩 서열은 SEQ ID NO: 70에 제시된 서열을 포함한다.

[0018] 일부 이러한 비인간 동물 계통, 비인간 동물 세포, 또는 비인간 동물에서, TRKB 단백질은 키메라 비인간 동물/인간 TRKB 단백질이다. 선택적으로, 세포의 도메인은 인간 TRKB 세포의 도메인이고, 경막 도메인은 내인성 TRKB 단백질 경막 도메인이며, 세포질 도메인은 내인성 TRKB 단백질 세포질 도메인이다. 선택적으로, TRKB 단백질은 SEQ ID NO: 4 또는 5에 제시된 서열을 포함한다. 선택적으로, TRKB 단백질을 암호화하는 유전자 변형된 *TrkB* 유전자좌의 코딩 서열은 SEQ ID NO: 12 또는 13에 제시된 서열을 포함한다.

[0019] 일부 이러한 비인간 동물 계통, 비인간 동물 세포, 또는 비인간 동물은 유전자 변형된 내인성 *TrkB* 유전자좌에 대해 이형접합성이다. 일부 이러한 비인간 동물 계통, 비인간 동물 세포, 또는 비인간 동물은 유전자 변형된 내인성 *TrkB* 유전자좌에 대해 동형접합성이다.

[0020] 일부 이러한 비인간 동물은 포유류이다. 선택적으로, 비인간 동물은 설치류이다. 선택적으로, 설치류는 래트 또는 마우스이다.

[0021] 일부 이러한 비인간 동물은 래트이다. 선택적으로, TRKB 단백질은 SEQ ID NO: 5에 제시된 서열을 포함한다. 선택적으로, TRKB 단백질을 암호화하는 유전자 변형된 *TrkB* 유전자좌의 코딩 서열은 SEQ ID NO: 13에 제시된 서열을 포함한다.

[0022] 일부 이러한 비인간 동물은 마우스이다. 선택적으로, TRKB 단백질은 SEQ ID NO: 4에 제시된 서열을 포함한다. 선택적으로, TRKB 단백질을 암호화하는 유전자 변형된 *TrkB* 유전자좌의 코딩 서열은 SEQ ID NO: 12에 제시된 서열을 포함한다.

[0023] 또 다른 측면으로, 상기 비인간 동물을 사용하여 생체내에서 인간-TRKB-표적화 시약의 활성을 평가하는 방법이 제공된다. 일부 이러한 방법은: (a) 인간-TRKB-표적화 시약을 비인간 동물에 투여하는 단계; 및 (b) 비인간 동물에서 인간-TRKB -표적화 시약의 활성을 평가하는 단계를 포함한다.

[0024] 일부 이러한 방법에서, 평가된 활성은 신경보호 활성이다.

[0025] 일부 이러한 방법에서, 단계 (a)는 인간-TRKB-표적화 시약을 비인간 동물에 주입하는 단계를 포함한다.

[0026] 일부 이러한 방법에서, 단계 (b)는 대조군 비인간 동물과 비교하여 체중, 체성분, 대사, 및 운동 중 하나 이상 또는 전부에서의 변화를 평가하는 것을 포함한다. 선택적으로, 체성분의 변화를 평가하는 것은 대조군 비인간 동물과 관련하여 저지방(lean mass) 및/또는 지방량(fat mass)을 평가하는 것을 포함한다. 선택적으로, 대사의 변화를 평가하는 것은 식량 소비 및/또는 물 소비의 변화를 평가하는 것을 포함한다.

[0027] 일부 이러한 방법에서, 단계 (b)는 대조군 비인간 동물과 관련하여 TRKB 인산화 및/또는 MAPK/ERK 및 PI3K/Akt 경로의 활성화를 평가하는 것을 포함한다.

[0028] 일부 이러한 방법에서, 단계 (b)는 신경보호 활성을 평가하는 것을 포함한다. 일부 이러한 방법에서, 단계 (b)는 신경보호 활성을 평가하는 것을 포함하고, 비인간 동물은 래트이다. 일부 이러한 방법에서, 단계 (b)는 망막 신경절 세포 생존 능력을 평가하는 것을 포함한다. 선택적으로, 망막 신경절 세포 생존 능력을 평가하는 것은 망막 신경절 세포 밀도를 평가하는 것을 포함한다. 선택적으로, 망막 신경절 세포 밀도는 망막 신경절 세포에 대해 염색된 절개된 망막에서 측정된다. 선택적으로, 망막 신경절 세포 생존 능력은 시신경 손상 후에 완전한 시신경 절단 모델에서 평가된다. 선택적으로, 망막 신경절 세포 생존 능력은 시신경 크러쉬 모델에서 평가된다.

[0029] 일부 이러한 방법에서, 인간-TRKB-표적화 시약은 항원 결합 단백질이다. 선택적으로, 항원 결합 단백질은 인간 TRKB 작용물질 항체이다. 일부 이러한 방법에서, 인간-TRKB-표적화 시약은 소분자이다. 선택적으로, 소분자는 인간 TRKB 작용물질이다.

[0030] 또 다른 측면으로, TRKB 단백질을 암호화하는 유전자 변형된 내인성 *TrkB* 유전자좌를 생성하기 위한 표적화 벡터가 제공되며, 여기서 TRKB 단백질은 세포질 도메인, 경막 도메인, 및 세포의 도메인을 포함하고, 세포의 도메인의 전부 또는 일부는 삭제되고 병렬상동 인간 *TRKB* 서열로 대체된 내인성 *TrkB* 유전자좌의 분절에 의해 암호화되며, 표적화 벡터는 내인성 *TrkB* 유전자좌에서 5' 표적 서열을 표적화하는 5' 상동성 팔 및 내인성 *TrkB* 유전자좌에서 3' 표적 서열을 표적화하는 3' 상동성 팔이 옆에 있는 병렬상동 인간 *TRKB* 서열을 포함하는 삽입물

핵산을 포함한다.

[0031] 또 다른 측면으로, 상기 기술된 비인간 동물 중 임의의 것을 제조하는 방법이 제공된다. 일부 이러한 방법은 (a) 1세포기 배아가 아닌 비인간 동물 만능 세포에: (i) 내인성 *TrkB* 유전자좌에서 5' 표적 서열에 혼성화하는 5' 상동성 팔 및 내인성 *TrkB* 유전자좌에서 3' 표적 서열에 혼성화하는 3' 상동성 팔이 옆에 있는 삽입물 핵산을 포함하는 외인성 수복 주형, 여기서 삽입물 핵산은 병렬상동 인간 *TRKB* 서열을 포함하는 것인 외인성 수복 주형; 및 (ii) 내인성 *TrkB* 유전자좌 내에서 표적 서열을 표적화하는 뉴클레아제 작용제를 도입하는 단계, 여기서 게놈은 유전자 변형된 내인성 *TrkB* 유전자좌를 포함하도록 변형되는 것인 단계; (b) 변형된 비인간 동물 만능 세포를 숙주 배아에 도입하는 단계; 및 (c) 숙주 배아를 대리 모체(surrogate mother)에 이식하여 유전자 변형된 내인성 *TrkB* 유전자좌를 포함하는 유전자 변형된 F0 세대 비인간 동물을 생성하는 단계를 포함한다. 선택적으로, 만능 세포는 배아 줄기(ES) 세포이다. 선택적으로, 뉴클레아제 작용제는 Cas9 단백질 및 내인성 *TrkB* 유전자좌 내에서 가이드 RNA 표적 서열을 표적으로 하는 가이드 RNA이다. 선택적으로, 단계 (a)는 내인성 *TrkB* 유전자좌 내에서 제2 가이드 RNA 표적 서열을 표적으로 하는 제2 가이드 RNA를 비인간 동물 만능 세포에 도입하는 단계를 추가로 포함한다. 선택적으로, 외인성 수복 주형은 길이가 적어도 10 kb인 큰 표적화 벡터이거나, 또는 외인성 수복 주형은 5' 상동성 팔과 3' 상동성 팔의 총 합이 적어도 10 kb의 길이인 큰 표적화 벡터이다.

[0032] 일부 이러한 방법은: (a) 비인간 동물 1세포기 배아에: (i) 내인성 *TrkB* 유전자좌에서 5' 표적 서열에 혼성화하는 5' 상동성 팔 및 내인성 *TrkB* 유전자좌에서 3' 표적 서열에 혼성화하는 3' 상동성 팔이 옆에 있는 삽입물 핵산을 포함하는 외인성 수복 주형, 여기서 삽입물 핵산은 병렬상동 인간 *TRKB* 서열을 포함하는 것인 외인성 수복 주형; 및 (ii) 내인성 *TrkB* 유전자좌 내에서 표적 서열을 표적화하는 뉴클레아제 작용제를 도입하는 단계, 여기서 게놈은 유전자 변형된 내인성 *TrkB* 유전자좌를 포함하도록 변형되는 것인 단계; 및 (b) 변형된 비인간 동물 1세포기 배아를 대리 모체에 이식하여 유전자 변형된 내인성 *TrkB* 유전자좌를 포함하는 유전자 변형된 F0 세대 비인간 동물을 생성하는 단계를 포함한다. 선택적으로, 뉴클레아제 작용제는 Cas9 단백질 및 내인성 *TrkB* 유전자좌 내에서 가이드 RNA 표적 서열을 표적으로 하는 가이드 RNA이다. 선택적으로, 단계 (a)는 내인성 *TrkB* 유전자좌 내에서 제2 가이드 RNA 표적 서열을 표적으로 하는 제2 가이드 RNA를 비인간 1세포기 배아에 도입하는 단계를 추가로 포함한다.

도면의 간단한 설명

[0033] **도 1** (비례대호가 아님)은 TRKB의 세포의 도메인을 암호화하는 마우스 *TrkB* (마우스 *Ntrk2*) 유전자좌 영역의 인간화에 대한 표적화 도식의 개략도를 도시한다. 도면의 상부 부분은 내인성 마우스 *TrkB* (마우스 *Ntrk2*) 유전자좌를 도시하고, 도면의 하부 부분은 큰 표적화 벡터를 도시한다.

도 2 (비례대호가 아님)는 마우스 *TrkB* (마우스 *Ntrk2*) 유전자좌의 인간화를 스크리닝하기 위한 TAQMAN[®] 검정의 개략도를 도시한다. 대립유전자 획득 (GOA) 검정은 7138hU 및 7138hD를 포함한다. 대립유전자 상실 (LOA) 검정은 7138U 및 7138D를 포함한다.

도 3은 TRKB 작용물질 항체 H4H9816P2 또는 아이소타입 대조군 항체의 직접 해마 주사 후 1시간, 4시간, 및 18시간째에 동형접합성 인간화된 TRKB 마우스에서의 총 TRKB 수준 및 포스포-TRKB 수준을 평가하는 웨스턴 블롯을 도시한다.

도 4 (비례대호가 아님)는 TRKB의 세포의 도메인을 암호화하는 래트 *TrkB* (래트 *Ntrk2*) 유전자좌 영역의 인간화를 위한 표적화 도식의 개략도를 도시한다. 도면의 상부 부분은 내인성 래트 *TrkB* (래트 *Ntrk2*) 유전자좌를 도시하고, 도면의 하부 부분은 큰 표적화 벡터를 도시한다.

도 5 (비례대호가 아님)는 래트 *TrkB* (래트 *Ntrk2*) 유전자좌의 인간화 및 래트 *TrkB* (래트 *Ntrk2*) 유전자좌를 표적화하기 위한 가이드 RNA 위치 (SEQ ID NO: 41-44에 제시된 가이드 표적 서열)를 스크리닝하기 위한 TAQMAN[®] 검정의 개략도를 도시한다. 대립유전자 획득 (GOA) 검정은 7138hU 및 7138hD를 포함한다. 대립유전자 상실 (LOA) 검정은 rnoTU, rnoTM, 및 rnoTD를 포함한다. CRISPR/Cas9 표적화에 의해 파괴되는 영역을 커버하도록 설계된 CRISPR 검정은 rnoTGU 및 rnoTGD를 포함한다. 보유 검정은 rnoTAU2 및 rnoTAD2를 포함한다.

도 6은 마우스, 래트, 및 인간 TRKB (NTRK2) 단백질의 정렬을 도시한다.

도 7은 출산 후 1일의 동형접합성 인간화된 TRKB 마우스 새끼로부터 분리된 일차 대뇌피질 뉴런의 다양한 TrkB 작용물질 항체 또는 BDNF로의 처리 후 15분 및 2시간째에 포스포-TrkB, 총 TrkB, 포스포-Akt, 총 AKT, 포스포-

ERK, 및 총 ERK의 웨스턴 블롯을 도시한다.

도 8은 동형접합성 TrkB^{hu/hu} 및 야생형 마우스에서 H4H9816P2의 항-TrkB 항체의 약동학 프로파일을 도시한다.

도 9는 상이한 용량의 TrkB 작용물질 항체 또는 BDNF로 처리된 분화된 인간 신경모세포종 SH-SY5Y 세포에서의 세포 생존율을 도시한다. TrkB mAb1은 H4H9816P2이고; TrkB mAb2는 대조군 TrkB 작용물질 항체이며, 모두 인간 TrkB, 래트 TrkB, 및 마우스 TrkB에 대한 친화성을 가진다. 인간 아이소타입 대조군 항체가 음성 대조군으로서 사용되었다. 데이터는 항체 없는 혈청 유리 배지에 대해 표준화되었다.

도 10은 상이한 용량의 TrkB 작용물질 항체 또는 BDNF로 처리된 일차 마우스 망막 신경절 세포에서의 세포 생존율을 도시한다. TrkB mAb2는 인간 TrkB, 래트 TrkB, 및 마우스 TrkB에 대한 친화성을 가진 대조군 TrkB 작용물질 항체이다. 데이터는 항체 없는 혈청 유리 배지에 대해 표준화되었다.

도 11A 및 11B는 시신경 절단 및 BDNF, TrkB 작용물질 항체, 아이소타입 대조군 항체, 또는 비히클 대조군으로의 처리 후의 야생형 래트 및 마우스 각각에서 절개되고 망막 신경절 세포에 대해 염색된 망막에서의 망막 신경절 세포 밀도를 도시한다. 래트에게는 시신경 절단 후 3일 및 10일에 BDNF (5 µg), TrkB 작용물질 항체 (18 µg), 아이소타입 대조군 항체 (18 µg), 또는 비히클 대조군이 유리체내로 주어져다. 마우스에게는 시신경 절단 후 3일 및 10일에 BDNF (2.5 µg), TrkB 작용물질 항체 (10 µg), 아이소타입 대조군 항체 (10 µg), 또는 비히클 대조군이 유리체내로 주어져다. TrkB mAb2는 인간 TrkB, 래트 TrkB, 및 마우스 TrkB에 대한 친화성을 가진 대조군 TrkB 작용물질 항체이다.

도 12A 및 12B는 시신경 절단 또는 시신경 크러쉬 및 다양한 용량의 BDNF로의 처리 후의 야생형 래트 및 마우스 각각에서 절개되고 망막 신경절 세포에 대해 염색된 망막에서의 망막 신경절 세포 밀도를 도시한다. **도 12A**는 WT 마우스의 시신경 크러쉬 (ONC) 모델에서의 BDNF 용량 반응을 도시한다. **도 12B**는 WT 래트의 시신경 절단 모델에서의 0.13 µg 내지 30 µg의 BDNF 용량 반응을 도시한다.

도 13A는 시신경 절단 후 3일 및 10일에 유리체내로 TrkB 작용물질 항체 또는 아이소타입 대조군 항체 중 어느 하나가 제공된 동형접합성, 이형접합성, 또는 야생형 TrkB 래트에서 절개되고 망막 신경절 세포에 대해 염색된 망막에서의 망막 신경절 세포 밀도를 도시한다 (**** = $p < 0.0001$; *** $p < 0.001$; 이원 변량 분석). 망막은 절단 후 14일 후에 절개되었다. TrkB mAb1은 H4H9816P2이다.

도 13B는 동형접합성, 이형접합성, 또는 야생형 TrkB 래트로부터 절개된 비손상 눈에서의 망막 신경절 세포 밀도를 도시한다.

도 13C는 TrkB 작용물질 항체 (H4H9816P2; TrkB) 또는 아이소타입 대조군 항체 (REGN1945; 대조군)가 제공된 인간 TRKB 동형접합성 마우스의 체중을 도시한다.

도 14는 시신경 절단 후 3일 및 10일에 유리체내로 TrkB 작용물질 항체 (hTrkB; H4H9816P2) 또는 아이소타입 대조군 항체 (REGN1945)가 제공된 인간 TRKB 동형접합성 래트에서 절개되고 망막 신경절 세포에 대해 염색된 망막에서의 망막 신경절 세포 밀도를 도시한다. 망막은 절단 후 14일 후에 절개되었다.

도 15A 및 15B는 시신경 절단 후 3일 및 10일에 유리체내로 상이한 TrkB 작용물질 항체 (H4H9816P2-L9, H4H9814P-L9, H4H9780P-L5, 또는 3가지 전부의 조합) 또는 아이소타입 대조군 항체 (REGN1945)가 제공된 인간 TRKB 동형접합성 래트에서 절개되고 망막 신경절 세포에 대해 염색된 망막에서의 망막 신경절 세포 밀도를 도시한다 (** $p < 0.01$; 아이소타입 대조군 항체와 비교한 크루스칼-왈리스 테스트). 망막은 절단 후 14일 후에 절개되었다. **도 15A**는 나이브 대조군 (비손상 반대쪽 눈)을 포함하고, **도 15B**는 그렇지 않다.

도 16은 시신경 절단 후 3일 및 10일에 유리체내로 상이한 TrkB 작용물질 항체 (H4H9780P 및 H4H9814P) 또는 아이소타입 대조군 항체 (REGN1945)가 제공된 야생형 래트에서 절개되고 망막 신경절 세포에 대해 염색된 망막에서의 망막 신경절 세포 밀도를 도시한다. 망막은 절단 후 14일 후에 절개되었다.

도 17A 및 17B는 시신경 절단 후 3일 및 10일에 유리체내로 TrkB 작용물질 항체 (H4H9780P) 또는 아이소타입 대조군 항체 (REGN1945)가 제공된 인간 TRKB 동형접합성 마우스에서 절개되고 망막 신경절 세포에 대해 염색된 망막에서의 망막 신경절 세포 밀도를 도시한다. 망막은 절단 후 14일 후에 절개되었다. **도 17A**는 정상 대조군 (비손상 반대쪽 눈)을 포함하고, **도 17B**는 그렇지 않다.

도 17C는 TrkB 작용물질 항체 (H4H9780P) 또는 아이소타입 대조군 항체 (REGN1945)가 제공된 인간 TRKB 동형접합성 마우스의 체중을 도시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0034] 정의
- [0035] 본원에서 상호교환적으로 사용된 용어 "단백질", "폴리펩타이드", 및 "펩타이드"는 코딩된 및 코딩되지 않은 아미노산 및 화학적으로 또는 생화학적으로 변형된 또는 유도체화된 아미노산을 포함하여, 임의의 길이의 아미노산의 중합체 형태를 포함한다. 용어는 또한 변형된 중합체, 예컨대 변형된 펩타이드 골격을 가지는 폴리펩타이드를 포함한다. 용어 "도메인"은 특정 기능 또는 구조를 가지는 단백질 또는 폴리펩타이드의 임의의 부분을 나타낸다.
- [0036] 단백질은 "N-말단" 및 "C-말단"을 가진다고 말한다. 용어 "N-말단"은 단백질 또는 폴리펩타이드의 시작과 관련되고, 유리 아민기 ($-NH_2$)를 가진 아미노산에 의해 종결된다. 용어 "C-말단"은 아미노산 사슬 (단백질 또는 폴리펩타이드)의 단부와 관련되고, 유리 카르복실기 ($-COOH$)에 의해 종결된다.
- [0037] 본원에서 상호교환적으로 사용된 용어 "핵산" 및 "폴리뉴클레오타이드"는 리보뉴클레오타이드, 데옥시리보뉴클레오타이드, 또는 이것들의 유사체 또는 변형된 버전을 포함한, 임의의 길이의 뉴클레오타이드의 중합체 형태를 포함한다. 이것은 단일-, 이중-, 및 다중-가닥 DNA 또는 RNA, 게놈 DNA, cDNA, DNA-RNA 하이브리드, 및 퓨린 염기, 피리미딘 염기, 또는 기타 천연의, 화학적으로 변형된, 생화학적으로 변형된, 비천연의, 또는 유도체화된 뉴클레오타이드 염기를 포함하는 중합체를 포함한다.
- [0038] 핵산은 모노뉴클레오타이드가 한 모노뉴클레오타이드 펜토오스 고리의 5' 포스페이트가 그것의 인접한 것의 3' 산소에 포스포다이에스테르 결합을 통해 한 방향으로 부착되도록 하는 방식으로 올리고뉴클레오타이드를 만들기 위하여 반응하기 때문에 "5' 단부" 및 "3' 단부"를 가진다고 말한다. 올리고뉴클레오타이드의 단부는 만약 그것의 5' 포스페이트가 모노뉴클레오타이드 펜토오스 고리의 3' 산소에 연결되지 않으면 "5' 단부"로서 언급된다. 올리고뉴클레오타이드의 단부는 만약 그것의 3' 산소가 다른 모노뉴클레오타이드 펜토오스 고리의 5' 포스페이트에 연결되지 않으면 "3' 단부"로서 언급된다. 핵산 서열은 더 큰 올리고뉴클레오타이드의 내부에 있을지라도, 5' 및 3' 단부를 가지는 것으로 또한 말할 수 있다. 선형 또는 원형 DNA 분자에서, 별개의 요소는 "하류" 또는 3' 요소의 "상류" 또는 5'인 것으로 언급된다.
- [0039] 용어 "게놈상으로 통합된"은 뉴클레오타이드 서열이 세포의 게놈에 통합되어 그것의 자손에 의해 유지될 수 있도록 세포에 도입된 핵산을 나타낸다. 임의의 프로토콜이 세포의 게놈에 핵산의 안정적인 통합을 위해 사용될 수 있다.
- [0040] 용어 "표적화 벡터"는 상동성 재조합, 비상동성 단부 연결-매개 결합, 또는 세포의 게놈의 표적 위치에 대한 임의의 다른 재조합 수단에 의해 도입될 수 있는 재조합 핵산을 나타낸다.
- [0041] 용어 "바이러스 벡터"는 바이러스 기원의 적어도 한 요소를 포함하고 바이러스 벡터 입자로의 포장에 충분한 또는 포장을 허용하는 요소를 포함하는 재조합 핵산을 나타낸다. 벡터 및/또는 입자는 생체외에서 또는 생체내에서 DNA, RNA, 또는 다른 핵산을 세포에 전달할 목적으로 활용될 수 있다. 많은 형태의 바이러스 벡터가 알려져 있다.
- [0042] 용어 "야생형"은 정상 (돌연변이, 질환, 변형, 등과 대조됨) 상태 또는 맥락에서 발견되는 구조 및/또는 활성을 가지는 실체를 포함한다. 야생형 유전자 및 폴리펩타이드는 자주 다수의 상이한 형태 (예컨대, 대립유전자)로 존재할 수 있다.
- [0043] 용어 "내인성"은 세포 또는 비인간 동물 내에서 자연적으로 발생하는 핵산 서열을 나타낸다. 예를 들어, 비인간 동물의 내인성 *TrkB* 서열은 비인간 동물의 *TrkB* 유전자좌에서 자연적으로 발생하는 천연 *TrkB* 서열을 나타낸다.
- [0044] "외인성" 분자 또는 서열은 그 형태로 세포에 정상적으로 존재하지 않는 분자 또는 서열을 포함한다. 정상적인 존재는 세포의 특정 발달 단계 및 환경 조건과 관련된 존재를 포함한다. 외인성 분자 또는 서열은, 예를 들어, 세포 내의 상응하는 내인성 서열의 돌연변이된 버전, 예컨대 내인성 서열의 인간화된 버전을 포함하거나, 또는 세포 내의 내인성 서열에 상응하지만 상이한 형태로 존재하는 (즉, 염색체 내에 없는) 서열을 포함할 수 있다. 대조적으로, 내인성 분자 또는 서열은 특정 환경 조건 하에서 특정 발달 단계에서 특정 세포에서 그 형태로 자연적으로 존재하는 분자 또는 서열을 포함한다.
- [0045] 용어 "이중성"은 핵산 또는 단백질의 맥락에서 사용될 때 핵산 또는 단백질이 동일한 분자에서 함께 자연적으로 발생하지 않는 적어도 2개의 부분을 포함하는 것을 나타낸다. 예를 들어, 용어 "이중성"은, 핵산의 부분 또는

단백질의 부분과 관련하여 사용될 때, 핵산 또는 단백질이 자연적으로는 서로와 동일한 (예컨대, 함께 결합된) 관계로 발견되지 않는 둘 이상의 하위 서열을 포함하는 것을 나타낸다. 한 실례로서, 핵산 벡터의 "이중성" 영역은 자연적으로는 다른 분자와 함께 발견되지 않는 또 다른 핵산 분자 내의 또는 그것에 부착된 핵산의 분절이다. 예를 들어, 핵산 벡터의 이중성 영역은 자연적으로는 코딩 서열과 함께 발견되지 않는 서열에 의해 플랜킹된 코딩 서열을 포함할 수 있다. 마찬가지로, 단백질의 "이중성" 영역은 자연적으로는 다른 펩타이드 분자와 함께 발견되지 않는 또 다른 펩타이드 분자 내의 또는 그것에 부착된 아미노산의 분절이다 (예컨대, 융합 단백질, 또는 태그 달린 단백질). 유사하게, 핵산 또는 단백질은 이중성 라벨 또는 이중성 분비 또는 국지화 서열을 포함할 수 있다.

[0046] "코돈 최적화"는 아미노산을 명시하는 3-염기쌍 코돈 조합의 다중성에 의해 나타나는 바와 같이, 코돈의 축퇴성이란 장점을 가지며, 일반적으로 천연 아미노산 서열을 유지하는 한편 천연 서열의 적어도 한 코돈을 숙주 세포의 유전자에서 보다 빈번하게 또는 가장 빈번하게 사용되는 코돈으로 대체함으로써 특히 숙주 세포에서의 증강된 발현을 위해 핵산 서열을 변형시키는 과정을 포함한다. 예를 들어, Cas9 단백질을 암호화하는 핵산은 자연적으로 발생하는 핵산 서열과 비교하여, 박테리아 세포, 효모 세포, 인간 세포, 비인간 세포, 포유류 세포, 설치류 세포, 마우스 세포, 래트 세포, 햄스터 세포, 또는 임의의 다른 숙주 세포를 포함한, 주어진 원핵 또는 진핵 세포에서 더 높은 빈도로 사용되는 코돈을 치환하기 위해 변형될 수 있다. 코돈 용법 표는, 예를 들어, "코돈 용법 데이터베이스"에서 쉽게 활용 가능하다. 이들 표는 다양한 방법으로 적용될 수 있다. Nakamura *et al.* (2000) 핵산 *Research* 28:292 (모든 목적에 대해 그 전문이 본원에 참조로 포함됨) 참조. 특정 숙주에서의 발현을 위한 특정 서열의 코돈 최적화에 대한 컴퓨터 알고리즘 또한 활용 가능하다 (예컨대, Gene Forge).

[0047] 용어 "유전자좌"는 유전자 (또는 유의미한 서열), DNA 서열, 폴리펩타이드-암호화 서열의 특정 위치, 또는 유기체의 게놈의 염색체상의 위치를 나타낸다. 예를 들어, "*TrkB* 유전자좌"는 *TrkB* 유전자, *TrkB* DNA 서열, *TrkB*-암호화 서열의 특정 위치, 또는 이러한 서열이 있는 것으로서 확인된 유기체의 게놈의 염색체 상에서의 *TrkB* 위치를 나타낼 수 있다. "*TrkB* 유전자좌"는 예를 들어, 인핸서, 프로모터, 5' 및/또는 3' 미번역 영역 (UTR), 또는 이것들의 조합을 포함한, *TrkB* 유전자의 조절 요소를 포함할 수 있다.

[0048] 용어 "유전자"는 생성물 (예컨대, RNA 생성물 및/또는 폴리펩타이드 생성물)을 암호화하고 유전자가 전장(전장) mRNA (5' 및 3' 미번역 서열을 포함함)에 상응하도록 비코딩 인트론으로 방해된 코딩 영역 및 5' 및 3' 단 부들 다에서 코딩 영역에 인접하여 위치한 서열을 포함하는 염색체에서의 DNA 서열을 나타낸다. 용어 "유전자"는 또한 조절 서열 (예컨대, 프로모터, 인핸서, 및 전사 인자 결합 부위), 폴리아데닐화 신호, 내부 리보솜 유입 부위, 사일런서, 격리 서열(insulating 서열), 및 기질 부착 영역을 포함하는 다른 비코딩 서열을 포함한다. 이들 서열은 유전자의 코딩 영역에 가깝게 (예컨대, 10 kb 내에) 또는 먼 곳에 있을 수 있고, 유전자의 전사 및 발현의 수준 또는 속도에 영향을 준다.

[0049] 용어 "대립유전자"는 유전자의 변이 형태를 나타낸다. 일부 유전자는 염색체 상에서 동일한 위치, 유전자 유전자좌에서 보이는 다양한 상이한 형태를 가진다. 이배체 유기체는 각각의 유전자 유전자좌에서 2개의 대립유전자를 가진다. 대립유전자의 각 쌍은 특정 유전자 유전자좌의 유전자형을 나타낸다. 유전자형은 만약 그것이 특정 유전자좌에서 2개의 동일한 대립유전자라면 동형접합성인 것으로 기술되고 두 대립유전자가 상이하다면 이형접합성인 것으로 기술된다.

[0050] "프로모터"는 보통 특정 폴리뉴클레오타이드 서열에 대한 적절한 전사 개시 부위에서 RNA 합성을 개시하도록 RNA 중합효소 II를 지시할 수 있는 TATA 박스를 포함하는 DNA의 조절 영역이다. 프로모터는 추가적으로 전사 개시 속도에 영향을 주는 다른 영역을 포함할 수 있다. 본원에 개시된 프로모터 서열은 작동 가능하게 연결된 폴리뉴클레오타이드의 전사를 조절한다. 프로모터는 본원에 개시된 하나 이상의 세포 유형 (예컨대, 진핵 세포, 비인간 포유류 세포, 인간 세포, 설치류 세포, 만능 세포, 1세포기 배아, 분화 세포, 또는 이것들의 조합)에서 활성일 수 있다. 프로모터는, 예를 들어, 구성적으로 활성인 프로모터, 조건부 프로모터, 유도성 프로모터, 일시적으로 제한된 프로모터 (예컨대, 발달상 조절된 프로모터), 또는 공간적으로 제한된 프로모터 (예컨대, 세포-특이적 또는 조직-특이적 프로모터)일 수 있다. 프로모터의 실례는, 예를 들어, W0 2013/176772 (모든 목적에 대해 그 전문이 본원에 참조로 포함됨)에서 찾아볼 수 있다.

[0051] "작동 가능한 연결" 또는 "작동 가능하게 연결된"은 구성요소들이 정상적으로 기능하고 구성요소 중 적어도 하나가 다른 구성요소 중 적어도 하나에 대해 발휘되는 기능을 매개할 수 있도록 둘 이상의 구성요소 (예컨대, 프로모터와 다른 서열 요소)의 병렬 배치를 포함한다. 예를 들어, 프로모터는 만약 프로모터가 하나 이상의 전사 조절 인자의 존재 또는 부재에 대한 반응으로 코딩 서열의 전사 수준을 제어한다면 코딩 서열에 작동 가능하게

연결된 것일 수 있다. 작동 가능한 연결은 서로 연속적으로 존재하거나 트랜스로 작용하는 그러한 서열을 포함할 수 있다 (예컨대, 조절 서열은 코딩 서열의 전사를 제어하기 위해 일정 거리에서 작용할 수 있다).

[0052] 용어 "변이체"는 집단에서 가장 만연된 서열과 (예컨대, 한 뉴클레오타이드만큼) 상이한 뉴클레오타이드 서열 또는 집단에서 가장 만연된 서열과 (예컨대, 한 아미노산만큼) 상이한 단백질 서열을 나타낸다.

[0053] 용어 "단편"은 단백질을 언급할 때 전장 단백질보다 짧거나 더 적은 아미노산을 가지는 단백질을 의미한다. 용어 "단편"은 핵산을 의미할 때 전장 핵산보다 짧거나 더 적은 뉴클레오타이드를 가지는 핵산을 의미한다. 단편은, 예를 들어, N-말단 단편 (즉, 단백질의 C-말단부 부분의 제거), C-말단 단편 (즉, 단백질의 N-말단부의 제거), 또는 내부 단편일 수 있다.

[0054] 두 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드 서열의 맥락에서 "서열 동일성" 또는 "동일성"은 명시된 비교 창에 걸쳐 최대의 상응성을 위해 정렬될 때 동일한 두 서열의 잔기를 언급한다. 서열 동일성의 백분율이 단백질을 언급하는데 사용될 때, 동일하지 않은 잔기 위치는 자주 보존성 아미노산 치환에 의해 상이하며, 이때 아미노산 잔기는 유사한 화학적 특성 (예컨대, 전하 또는 소수성)을 가진 다른 아미노산 잔기에 대해 치환되며 따라서 분자의 기능적 특성을 변화하지 않는다. 서열이 보존성 치환에서 상이할 때, 퍼센트 서열 동일성은 치환의 보존성 성질을 교정하기 위해 상향 조정될 수 있다. 이러한 보존성 치환에 의해 상이한 서열은 "서열 유사성" 또는 "유사성"을 가진 것으로 말할 수 있다. 이런 조정을 만들기 위한 수단은 잘 알려져 있다. 전형적으로, 이것은 전체 미스매치보다는 오히려 부분으로서 보존성 치환을 채점하는 것을 포함하며, 그로써 백분율 서열 동일성을 증가시킨다. 그러므로, 예를 들어, 동일한 아미노산이 1의 점수로 제공되고 비보존성 치환이 0의 점수로 제공되면, 보존성 치환은 0과 1 사이의 점수로 제공된다. 보존성 치환의 채점은, 예컨대 프로그램 PC/유전자 (IntelliGenetics, Mountain View, California)에서 실행된 것과 같이 계산된다.

[0055] "서열 동일성의 백분율"은 비교 창에 걸친 2개의 최적으로 정렬된 서열을 비교함으로써 측정된 값 (완벽하게 매치된 잔기의 최대 수)을 포함하고, 여기서 비교 창의 폴리뉴클레오타이드 서열의 부분은 두 서열의 최적 정렬에 대한 참조 서열 (첨가 또는 삭제 포함하지 않음)과 비교하여 첨가 또는 삭제 (즉, 갭)를 포함할 수 있다. 백분율은 동일한 핵산 염기 또는 아미노산 잔기가 두 서열에서 발생하여 매치된 위치의 수를 만들어내는 위치의 수를 측정하고, 매치된 위치의 수를 비교 창의 위치의 총 수로 나누고, 그 결과를 100으로 곱하여 서열 동일성의 백분율을 산출함으로써 계산된다. 다르게 명시되지 않는 한 (예컨대, 더 짧은 서열이 연결된 이중성 서열을 포함함), 비교 창은 비교되는 두 서열의 더 짧은 서열의 전체 길이이다.

[0056] 다르게 진술되지 않는 한, 서열 동일성/유사성 값은 다음의 파라미터를 사용하여 GAP 버전 10을 사용하여 얻어진 값을 포함한다: 50의 GAP 웨이트 및 3의 길이 웨이트, 및 nwsgapdna.cmp 채점 매트릭스를 사용하는 뉴클레오타이드 서열에 대한 % 동일성 및 % 유사성; 8의 GAP 웨이트 및 2의 길이 웨이트, 및 BLOSUM62 채점 매트릭스를 사용하는 아미노산 서열에 대한 % 동일성 및 % 유사성; 또는 이것들의 임의의 동등한 프로그램. "동등한 프로그램"은, 문제의 임의의 2개 서열에 대해, GAP 버전 10에 의해 생성된 상응하는 정렬과 비교할 때 동일한 뉴클레오타이드 또는 아미노산 잔기 매치 및 동일한 퍼센트 서열 동일성을 가지는 정렬을 생성하는 임의의 서열 비교 프로그램을 포함한다.

[0057] 용어 "보존성 아미노산 치환"은 서열에 정상적으로 존재하는 아미노산의 유사한 크기, 전하, 또는 극성의 상이한 아미노산으로의 치환을 나타낸다. 보존성 치환의 실례로는 이소류신, 발린, 또는 류신과 같은 비극성 (소수성) 잔기의 또 다른 비극성 잔기에 대한 치환을 들 수 있다. 마찬가지로, 보존성 치환의 실례로 아르기닌과 리신 사이, 글루타민과 아스파라긴 사이, 또는 글리신과 세린 사이와 같은 한 극성 (친수성) 잔기의 다른 것에 대한 치환을 들 수 있다. 추가적으로, 리신, 아르기닌, 또는 히스티딘과 같은 염기성 잔기의 다른 것에 대한 치환, 또는 아스파르트산 또는 글루탐산과 같은 한 산성 잔기의 다른 산성 잔기에 대한 치환이 보존성 치환의 추가적인 실례이다. 비보존성 치환의 실례로는 이소류신, 발린, 류신, 알라닌, 또는 메티오닌과 같은 비극성 (소수성) 아미노산 잔기의 시스테인, 글루타민, 글루탐산 또는 리신과 같은 극성 (친수성) 잔기에 대한 및/또는 극성 잔기의 비극성 잔기에 대한 치환을 들 수 있다. 전형적인 아미노산 분류가 하기에 요약된다.

알라닌	Ala	A	비극성	중성	1.8
아르기닌	Arg	R	극성	양성	-4.5
아스파라긴	Asn	N	극성	중성	-3.5
아스파르트산	Asp	D	극성	음성	-3.5
시스테인	Cys	C	비극성	중성	2.5
글루탐산	Glu	E	극성	음성	-3.5
글루타민	Gln	Q	극성	중성	-3.5
글리신	Gly	G	비극성	중성	-0.4
히스티딘	His	H	극성	양성	-3.2
이소류신	Ile	I	비극성	중성	4.5
류신	Leu	L	비극성	중성	3.8
리신	Lys	K	극성	양성	-3.9
메티오닌	Met	M	비극성	중성	1.9
페닐알라닌	Phe	F	비극성	중성	2.8
프롤린	Pro	P	비극성	중성	-1.6
세린	Ser	S	극성	중성	-0.8
트레오닌	Thr	T	극성	중성	-0.7
트립토판	Trp	W	비극성	중성	-0.9
티로신	Tyr	Y	극성	중성	-1.3
발린	Val	V	비극성	중성	4.2

[0058]

[0059]

"상동성" 서열 (예컨대, 핵산 서열)은 공지의 참조 서열에 동일하거나 실질적으로 유사한 서열을 포함하여서, 그것은 예를 들어, 공지의 참조 서열에 대해 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 동일하다. 상동성 서열은, 예를 들어, 병렬상동 서열 및 직렬상동(paralogous) 서열을 포함할 수 있다. 상동성 유전자는, 예를 들어, 전형적으로 종분화 사건 (병렬상동 유전자) 또는 유전자 복제 사건 (직렬상동 유전자) 중 어느 하나를 통해 공통 조상 DNA 서열로부터 내려온다. "병렬상동" 유전자는 공통 조상 유전자로부터 종분화에 의해 진화된 상이한 종의 유전자를 포함한다. 오르톨로그(Ortholog)는 전형적으로 진화 과정에서 동일한 기능을 보유한다. "직렬상동" 유전자는 게놈 내에서의 복제에 의해 관련된 유전자를 포함한다. 파랄로그(Paralog)는 진화 과정에서 새로운 기능으로 진화할 수 있다.

[0060]

용어 "시험관내"는 인공적인 환경을 포함하며 인공적인 환경 (예컨대, 테스트 튜브) 내에서 일어나는 과정 또는 반응을 나타낸다. 용어 "생체내"는 천연 환경 (예컨대, 세포 또는 유기체 또는 신체)을 포함하며 천연 환경 내에서 일어나는 과정 또는 반응을 나타낸다. 용어 "생체외"는 개체의 신체로부터 제거된 세포를 포함하며 그러한 세포 내에서 일어나는 과정 또는 반응을 나타낸다.

[0061]

용어 "리포터 유전자"는 이중성 프로모터 및/또는 인핸서 요소에 작동 가능하게 연결된 리포터 유전자 서열을 포함하는 구성물이 프로모터 및/또는 인핸서 요소의 활성화에 필요한 인자를 함유한 (또는 함유하도록 만들어진) 세포에 도입될 때 쉽게 그리고 정량화하여 검정되는 유전자 생성물 (전형적으로 효소)을 암호화하는 서열을 가지는 핵산을 나타낸다. 리포터 유전자의 실례로, 한정하는 것은 아니지만, 베타-갈락토시다제 (lacZ)를 암호화하는 유전자, 박테리아 클로람페니콜 아세틸트랜스퍼라제 (cat) 유전자, 반딧불이 루시페라제 유전자, 베타-글루쿠로니다제 (GUS)를 암호화하는 유전자, 및 형광 단백질을 암호화하는 유전자를 들 수 있다. "리포터 단백질"은 리포터 유전자에 의해 암호화된 단백질을 나타낸다.

[0062]

본원에서 사용되는 바 용어 "형광 리포터 단백질"은 형광이 리포터 단백질로부터 직접적으로, 형광성 기질 상의 리포터 단백질의 활성화로부터, 또는 형광 태그가 달린 화합물에 대한 결합 친화성을 가진 단백질로부터 유래할 수 있는 형광을 기반으로 검출 가능한 리포터 단백질을 의미한다. 형광 단백질의 실례로 녹색 형광 단백질 (예컨대, GFP, GFP-2, tagGFP, turboGFP, eGFP, 에메랄드, 아자미 그린(Azami Green), 단량체 아자미 그린, CopGFP, AceGFP, 및 ZsGreen1), 황색 형광 단백질 (예컨대, YFP, eYFP, 시트린(Citrine), 비너스(Venus), YPet, PhiYFP, 및 ZsYellow1), 청색 형광 단백질 (예컨대, BFP, eBFP, eBFP2, 아즈라이트(Azurite), mKalamal, GFPuv, 사파이어, 및 T-사파이어), 청록색 형광 단백질 (예컨대, CFP, eCFP, 진청색(Cerulean), CyPet, AmCyan1, 및 Midoriishi-Cyan), 적색 형광 단백질 (예컨대, RFP, mKate, mKate2, mPlum, DsRed 단량체, mCherry, mRFP1, DsRed-Express, DsRed2, DsRed-단량체, HcRed-Tandem, HcRed1, AsRed2, eqFP611, mRaspberry, mStrawberry, 및 Jred), 오렌지색 형광 단백질 (예컨대, mOrange, mKO, Kusabira-Orange, 단량체 Kusabira-Orange, mTangerine, 및 tdTomato), 및 세포에서의 존재가 유동 세포분석법에 의해 검출될 수 있는

임의의 다른 적합한 형광 단백질을 들 수 있다.

- [0063] 용어 "재조합"은 2개의 폴리뉴클레오타이드 사이에서 유전자 정보 교환의 임의의 과정을 포함하고 임의의 메커니즘에 의해 일어날 수 있다. 이중 가닥 절단 (DSR)에 대한 반응으로의 재조합은 원칙적으로 2개의 보존된 DNA 수복 경로: 비상동성 단부 결합 (NHEJ) 및 상동성 재조합 (HR)을 통해 일어난다. Kasparek & Humphrey (2011) *Seminars in Cell & Dev. Biol.* 22:886-897 (모든 목적에 대해 그 전문이 본원에 참조로 포함됨)을 참조한다. 마찬가지로, 외인성 도너 핵산에 의해 매개된 표적 핵산은 2개의 폴리뉴클레오타이드 사이의 유전자 정보 교환의 임의의 과정을 포함할 수 있다.
- [0064] NHEJ는 상동성 주형을 필요로 하지 않으면서 절단 단부의 또 다른 절단 단부에 또는 외인성 서열에의 직접적인 결합에 의한 핵산의 이중 가닥 절단의 수복을 포함한다. NHEJ에 의한 비연속 서열의 결합은 자주 이중 가닥 절단 부위 가까이에서 삭제, 삽입, 또는 전위를 초래할 수 있다. 예를 들어, NHEJ는 또한 절단 단부의 외인성 도너 핵산 단부와 직접 결합을 통해 외인성 도너 핵산의 표적화된 통합 (즉, NHEJ-기반 포획)을 초래한다. 이러한 NHEJ-매개된 표적화된 통합은 상동성 인도 수복 (HDR) 경로가 쉽게 사용 가능하지 않을 때 (예컨대, 비분할 세포, 일차 세포, 및 상동성-기반 DNA 수복이 빈약하게 수행되는 세포에서) 외인성 도너 핵산의 삽입에 바람직할 수 있다. 이에 더불어, 상동성 인도 수복과 대조적으로, 절단 부위의 측면의 서열 동일성의 큰 영역과 관련된 지식은 필요하지 않으며, 이것은 그것에 대한 게놈 서열의 지식이 한정된 게놈을 가진 유기체 안에 표적화된 삽입을 시도할 때에 유익할 수 있다. 통합은 외인성 도너 핵산과 절단된 게놈 서열 사이의 불린트 단부의 결합을 통해, 또는 절단된 게놈 서열에서 뉴클레아제 작용제에 의해 생성된 오버행과 부합하는 오버행이 옆에 있는 외인성 도너 핵산을 사용하여 스틱키 단부 (즉, 5' 또는 3' 오버행을 가지는 단부)의 결합을 통해 진행될 수 있다. 예컨대, US 2011/020722, WO 2014/033644, WO 2014/089290, 및 Maresca *et al.* (2013) *게놈 Res.* 23(3):539-546 (이들의 각각은 모든 목적에 대해 그 전문이 본원에 참조로 포함됨)을 참조한다. 만약 불린트 단부가 결합되면, 단편 연결을 위해 필요한 미세상동성 영역을 생성하기 위해 표적 및/또는 도너 절제가 필요할 수 있고, 이것은 표적 서열에서 원치 않는 변경을 생성할 수 있다.
- [0065] 재조합은 또한 상동성 인도 수복 (HDR) 또는 상동성 재조합 (HR)을 통해 일어날 수 있다. HDR 또는 HR은 뉴클레오타이드 서열 상동성을 필요로 할 수 있고, "표적" 분자 (즉, 이중 가닥 절단을 겪은 분자)의 수복을 위한 주형으로서 "도너" 분자를 사용하며, 도너로부터 표적으로의 유전자 정보 전달로 이어지는 핵산 수복의 형태를 포함한다. 임의의 특정 이론에 얽매이기를 바라지 않지만, 이러한 전달은 절단된 표적과 도너 사이에서 형성되는 이중듀플렉스 DNA의 미스매치 보정, 및/또는 도너가 표적의 일부가 될 유전자 정보를 재합성하기 위해 사용되는 합성-의존성 가닥 어닐링, 및/또는 관련된 과정들을 포함할 수 있다. 일부 경우에, 도너 폴리뉴클레오타이드, 도너 폴리뉴클레오타이드의 일부분, 도너 폴리뉴클레오타이드의 복사물, 또는 도너 폴리뉴클레오타이드의 복사물의 일부분은 표적 DNA에 통합된다. Wang *et al.* (2013) *Cell* 153:910-918; Mandalos *et al.* (2012) *PLOS ONE* 7:e45768:1-9; 및 Wang *et al.* (2013) *Nat Biotechnol.* 31:530-532 (이들은 각각 모든 목적에 대해 그 전문이 본원에 참조로 포함됨)를 참조한다.
- [0066] 용어 "항원 결합 단백질"은 항원에 결합하는 임의의 단백질을 포함한다. 항원 결합 단백질의 실례는 항체, 항체의 항원 결합 단편, 다중특이적 항체 (예컨대, 이중특이적 항체), scFV, 비스-scFV, 디아바디, 트라이아바디, 테트라바디, V-NAR, VHH, VL, F(ab), F(ab)₂, DVD (이중 가변 도메인 항원 결합 단백질), SVD (단일 가변 도메인 항원 결합 단백질), 이중특이적 T-세포 인게이지(engager) (BiTE), 또는 데이비스바디(Davisbody)를 들 수 있다 (미국 특허 제 8,586,713호, 모든 목적에 대해 그 전문이 본원에 참조로 포함됨).
- [0067] 본원에서 사용되는 것과 같이, "항-TRKB 항체"라는 표현은 단일 특이성을 가진 일가 항체뿐만 아니라, TRKB에 결합하는 제1 팔 및 제2 (표적) 항원에 결합하는 제2 팔을 포함하는 이중특이적 항체 둘 다를 포함하며, 여기서 항-TRKB 팔은, 예를 들어, 본원의 표 22에서 제시하는 HCVR/LCVR 또는 CDR 서열 중 임의의 것을 포함한다. "항-TrkB 항체"라는 표현은 또한 약물 또는 독소 (즉, 세포독성제)에 콘주게이트된 항-TRKB 항체 또는 그것의 항원 결합 부분을 포함하는 항체-약물 콘주게이트 (ADC)를 포함한다. "항-TrkB 항체"라는 표현은 또한 방사성핵종에 콘주게이트된 항-TRKB 항체 또는 그것의 항원 결합 부분을 포함하는 항체-방사성핵종 콘주게이트 (ARC)를 포함한다.
- [0068] 본원에서 사용되는 바 용어 "항-TRKB 항체"는 TRKB 또는 TRKB의 일부분에 특이적으로 결합하는 또는 상호작용하는 적어도 하나의 상보성 결정 영역 (CDR)을 포함하는 임의의 항원 결합 분자 또는 분자 복합체를 의미한다. 용어 "항체"는 4개의 폴리펩타이드 사슬, 즉 이황화 결합에 의해 상호 연결된 2개의 중쇄 (H) 및 2개의 경쇄 (L)를 포함하는 면역글로불린 분자, 뿐만 아니라 그것들의 멀티머 (예컨대, IgM)를 포함한다. 각각의 중쇄는 중쇄

가변 영역 (본원에서 HCVR 또는 V_H 로 약칭됨) 및 중쇄 불변 영역을 포함한다. 중쇄 불변 영역은 3개의 도메인, 즉 C_H1 , C_H2 및 C_H3 을 포함한다. 각각의 경쇄는 경쇄 가변 영역 (본원에서 LCVR 또는 V_L 로 약칭됨) 및 경쇄 불변 영역을 포함한다. 경쇄 불변 영역은 한 도메인을 포함한다 (C_L1). V_H 및 V_L 영역은 추가로, 프레임워크 영역 (FR)으로 불리는, 보다 보존된 영역이 사이에 끼어 있는, 상보성 결정 영역 (CDR)으로 불리는 초가변성 영역으로 세분화될 수 있다. 각각의 V_H 및 V_L 은 3개의 CDR 및 4개의 FR로 구성되며, 아미노 말단으로부터 카르복시 말단으로 다음 순서로 배열된다: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. 발명의 상이한 구체예에서, 항-TRKB 항체 (또는 그것의 항원 결합 부분)의 FR은 인간 생식선 서열에 동일하거나, 또는 자연적으로 또는 인공적으로 변형될 수 있다. 아미노산 공통 서열은 2개 이상의 CDR의 나란한 분석을 토대로 정의될 수 있다.

[0069] 본원에서 사용되는 바 용어 "항체"는 또한 전장 항체 분자의 항원 결합 단편을 포함한다. 본원에서 사용되는 것과 같이, 항체의 "항원 결합 부분", 항체의 "항원 결합 단편", 등의 용어는 항원에 특이적으로 결합하여 복합체를 형성하는, 임의의 효소적으로 얻을 수 있는, 합성의, 또는 유전자 조작된 폴리펩타이드 또는 당단백질을 포함한다. 항체의 항원 결합 단편은, 예를 들어, 전체 항체 분자로부터 단백질 가수분해 소화 또는 항체 가변 및 선택적으로 불변 도메인을 암호화하는 DNA의 조작 및 발현을 포함하는 재조합 유전자 조작 기법과 같은 임의의 적합한 표준 기법을 사용하여 유도될 수 있다. 이러한 DNA는 알려져 있거나 및/또는 예컨대, 상업적 공급처, DNA 라이브러리 (예컨대, 파지-항체 라이브러리 포함)로부터 쉽게 이용할 수 있거나, 또는 합성될 수 있다. DNA는 예를 들어, 하나 이상의 가변 및/또는 불변 도메인을 적합한 구성으로 배열하거나, 또는 코돈을 도입하고, 시스테인 잔기를 생성하고, 아미노산을 변형시키고, 첨가하고 또는 삭제하기 위하여 화학적으로 또는 분자 생물학 기법을 사용함으로써 서열이 분석되고 조작될 수 있다.

[0070] 항원 결합 단편의 비제한적 실례는: (i) Fab 단편; (ii) F(ab')₂ 단편; (iii) Fd 단편; (iv) Fv 단편; (v) 단일 사슬 Fv (scFv) 분자; (vi) dAb 단편; 및 (vii) 항체의 초가변 영역 (예컨대, CDR3 펩타이드와 같은 분리된 상보성 결정 영역 (CDR))을 모방하는 아미노산 잔기들로 이루어지는 최소 인식 유닛, 또는 제한된 FR3-CDR3-FR4 펩타이드를 포함한다. 다른 조작된 분자, 예컨대 도메인-특이적 항체, 단일 도메인 항체, 도메인-삭제된 항체, 키메라 항체, CDR-그래프팅된 항체, 디아바디, 트라이아바디, 테트라바디, 미니바디, 나노바디 (예컨대, 일가 나노바디, 이가 나노바디, 등), 소형 모듈식 면역약제 (SMIP), 및 상어 가변 IgNAR 도메인이 또한 본원에서 사용되는 "항원 결합 단편"이란 표현 내에 포함된다.

[0071] 항체의 항원 결합 단편은 전형적으로 적어도 하나의 가변 도메인을 포함할 것이다. 가변 도메인은 임의의 크기 또는 아미노산 조성의 것일 수 있고 일반적으로 적어도 하나의 CDR을 포함할 것이며, 하나 이상의 프레임워크 서열을 가진 프레임과 인접하거나 그 프레임에 있다. V_L 도메인과 회합된 V_H 도메인을 가진 항원 결합 단편에서, V_H 및 V_L 도메인은 서로에 대해 임의의 적합한 배열로 위치할 수 있다. 예를 들어, 가변 영역은 다이머일 수 있고 V_H - V_H , V_H - V_L 또는 V_L - V_L 다이머를 함유한다. 대안적으로, 항체의 항원 결합 단편은 모노머 V_H 또는 V_L 도메인을 함유할 수 있다.

[0072] 특정 구체예에서, 항체의 항원 결합 단편은 적어도 하나의 불변 도메인에 공유 결합된 적어도 하나의 가변 도메인을 함유할 수 있다. 본 발명의 항체의 항원 결합 단편 내에서 발견될 수 있는 가변 및 불변 도메인의 비제한적인, 예시의 구성은 다음을 포함한다: (i) V_H - C_H1 ; (ii) V_H - C_H2 ; (iii) V_H - C_H3 ; (iv) V_H - C_H1 - C_H2 ; (v) V_H - C_H1 - C_H2 - C_H3 ; (vi) V_H - C_H2 - C_H3 ; (vii) V_H - C_L ; (viii) V_L - C_H1 ; (ix) V_L - C_H2 ; (x) V_L - C_H3 ; (xi) V_L - C_H1 - C_H2 ; (xii) V_L - C_H1 - C_H2 - C_H3 ; (xiii) V_L - C_H2 - C_H3 ; 및 (xiv) V_L - C_L . 상기 열거한 예시의 구성을 포함한, 가변 및 불변 도메인의 임의의 구성에서, 가변 및 불변 도메인은 서로에 직접 연결되거나 또는 전체 또는 부분 힌지 또는 링커 영역에 의해 연결될 수 있다. 힌지 영역은 적어도 2개 (예컨대, 5, 10, 15, 20, 40, 60개 또는 그 이상)의 아미노산으로 이루어질 수 있고, 단일 폴리펩타이드 분자에서 인접한 가변 및/또는 불변 도메인 사이에서 유연성 또는 반유연성 결합을 초래한다. 게다가, 본 발명의 항체의 항원 결합 단편은 서로와의 및/또는 하나 이상의 모노머 V_H 또는 V_L 도메인과의 비공유 회합 (예컨대, by 이황화 결합(들)에 의함)으로 상기 열거된 임의의 가변 및 불변 도메인 구성의 동종다이머 또는 이종다이머 (또는 다른 멀티머)를 포함할 수 있다.

[0073] 전체 항체 분자와 같이, 항원 결합 단편은 단일특이적 또는 다중특이적 (예컨대, 이중특이적)일 수 있다. 항체의 다중특이적 항원 결합 단편은 전형적으로 적어도 2개의 상이한 가변 도메인을 포함할 것이고, 이때 각각의 가변 도메인은 별도의 항원에 또는 동일 항원 상의 상이한 에피토프에 특이적으로 결합할 수 있다. 본원에서 개시된 예시의 이중특이적 항체 포맷을 포함한, 임의의 다중특이적 항체 포맷은 본 발명의 항체의 항원 결합 단편

의 맥락에서 사용하기 위해 기본적인 기법을 사용하여 조정될 수 있다.

- [0074] 영어 "에피토프"는 파라토프(paratope)로서 알려져 있는 항체 분자의 가변 영역의 특이적인 항원 결합 부위와 상호작용하는 항원 결정기를 나타낸다. 단일 항원은 하나 이상의 에피토프를 가질 수 있다. 그러므로, 상이한 항체는 항원 상의 상이한 구역에 결합할 수 있고 상이한 생물학적 효과를 가질 수 있다. 에피토프는 형태적이거나 선형적일 수 있다. 형태적 에피토프는 선형 폴리펩타이드 사슬의 상이한 분절로부터 공간적으로 병치된 아미노산에 의해 생성된다. 선형 에피토프는 폴리펩타이드 사슬에서 인접한 아미노산 잔기에 의해 생성되는 것이다. 특정 상황에서, 에피토프는 항원 상의 당류, 포스포릴 기, 또는 설포닐 기의 모이어티를 포함할 수 있다.
- [0075] 용어 "특이적으로 결합한다", 또는 "특이적으로 ~에 결합한다" 등은, 항체 또는 그것의 항원 결합 단편이 생리 조건 하에서 상대적으로 안정한 항원과의 복합체를 형성하는 것을 의미한다. 특이적 결합은 적어도 약 1×10^{-6} M 이하의 평형 해리 상수를 특징으로 할 수 있다 (예컨대, 더 작은 K_D 는 더 단단한 결합을 나타냄). 2개의 분자가 특이적으로 결합하는지를 측정하는 방법은 잘 알려져 있고, 예를 들어, 평형 투석, 표면 플라스몬 공명, 등을 포함한다. 본원에서 기술된 것과 같이, 항체는 표면 플라스몬 공명에 의해, 예컨대, TRKB에 특이적으로 결합하는 BIACORE™에 의해 확인되었다. 게다가, TRKB 단백질 및 하나 이상의 추가적인 항원에 결합하는 다중 특이적 항체 또는 TRKB의 2개의 상이한 영역에 결합하는 이중특이적 항체가 그럼에도 불구하고 본원에서 사용되는 바와 같이, "특이적으로 결합한다" 항체로 고려된다.
- [0076] 본원에 개시된 항-TRKB 항체는 중쇄 및 경쇄 가변 도메인의 프레임워크 및/또는 CDR 영역에 하나 이상의 아미노산 치환, 삽입 및/또는 삭제를 포함할 수 있다. 이러한 돌연변이는 본원에 개시된 아미노산 서열을, 예를 들어, 공공의 항체 서열 데이터베이스로부터 이용 가능한 서열에 비교함으로써 쉽게 확인될 수 있다. 얻어진 후에, 하나 이상의 돌연변이를 함유한 항체 및 항원 결합 단편은 개선된 결합 특이성, 증가된 결합 친화도, 개선된 또는 증강된 길항성 또는 작용성 생물학적 특성 (경우에 따라), 감소된 면역원성, 등과 같은 하나 이상의 원하는 특성에 대해 쉽게 테스트될 수 있다. 이런 일반적 방식으로 얻어진 항체 및 항원 결합 단편이 포함된다.
- [0077] 또한 하나 이상의 보존성 치환을 가진 본원에 개시된 HCVR, LCVR, 및/또는 CDR 아미노산 서열 중 임의의 것의 변이체를 포함하는 항-TRKB 항체가 포함된다. 예를 들어, 본 발명은 표 22에 제시된 HCVR, LCVR, 및/또는 CDR 아미노산 서열 중 임의의 것과 관련하여, 예컨대, 10개 이하, 8개 이하, 6개 이하, 4개 이하, 등의 보존성 아미노산 치환을 가진 HCVR, LCVR, 및/또는 CDR 아미노산 서열을 가지는 항-TRKB 항체를 포함한다.
- [0078] 항-TRKB 항체의 맥락에서 핵산 또는 그것의 단편을 언급할 때, 용어 "실질적인 동일성" 또는 "실질적으로 동일한"은, 적절한 뉴클레오타이드 삽입 또는 삭제로 또 다른 핵산 (또는 그것의 상보성 가닥)과 최적으로 정렬될 때, 하기에서 논의되는 것과 같이 서열 동일성의 임의의 잘 알려져 있는 알고리즘, 예컨대 FASTA, BLAST 또는 Gap에 의해 측정되는 바 뉴클레오타이드 염기의 적어도 약 95%, 보다 바람직하게는 적어도 약 96%, 97%, 98% 또는 99%에서 뉴클레오타이드 서열 동일성이 있음을 나타낸다. 참조 핵산 분자에 대해 실질적인 동일성을 가진 핵산 분자는, 특정 경우에, 참조 핵산 분자에 의해 암호화된 폴리펩타이드와 동일한 또는 실질적으로 유사한 아미노산 서열을 가지는 폴리펩타이드를 암호화할 수 있다.
- [0079] 항-TRKB 항체의 맥락에서 폴리펩타이드에 대해 적용되는 것과 같이, 용어 "실질적인 유사성" 또는 "실질적으로 유사한"은 두 펩타이드 서열이, 예컨대 디폴트 갭 무게를 사용하는 프로그램 GAP 또는 BESTFIT에 의해 최적으로 정렬될 때, 적어도 95% 서열 동일성, 보다 더 바람직하게는 적어도 98% 또는 99% 서열 동일성을 공유하는 것을 의미한다. 바람직하게, 동일하지 않는 잔기 위치는 보존성 아미노산 치환에 의해 상이하다. 항-TRKB 항체의 맥락에서 폴리펩타이드에 대해 적용되는 것과 같이 "보존성 아미노산 치환"은 아미노산 잔기가 유사한 화학적 특성 (예컨대, 전하 또는 소수성)을 가진 측쇄 (R 기)를 가진 또 하나의 아미노산 잔기에 의해 치환되는 것이다. 일반적으로, 보존성 아미노산 치환은 단백질의 기능적 특성을 실질적으로 변화시키지 않을 것이다. 둘 이상의 아미노산 서열이 보존성 치환에 의해 서로 상이한 경우에, 퍼센트 서열 동일성 또는 유사성 정도는 치환의 보존성 성질을 교정하기 위하여 상향 조정될 수 있다. 이런 조정을 만들기 위한 수단은 당업자들에게 잘 알려져 있다. 예컨대, Pearson (1994) Methods Mol. Biol. 24: 307-331 (모든 목적에 대해 그 전문이 본원에 참조로 포함됨)을 참조한다. 유사한 화학적 특성을 가진 측쇄를 가지는 아미노산의 그룹의 실례는 다음을 들 수 있다: (1) 지방족 측쇄: 글리신, 알라닌, 발린, 류신 및 아이소류신; (2) 지방족-하이드록실 측쇄: 세린 및 트레오닌; (3) 아미드-함유 측쇄: 아스파라긴 및 글루타민; (4) 방향족 측쇄: 페닐알라닌, 티로신, 및 트립토판; (5) 염기성 측쇄: 리신, 아르기닌, 및 히스티딘; (6) 산성 측쇄: 아스파테이트 및 글루타메이트; 및 (7) 황-함유 측쇄는 시스테인 및 메티오닌이다. 바람직한 보존성 아미노산 치환기는 다음과 같다: 발린-류신-아이소류신, 페닐알라

닌-티로신, 리신-아르기닌, 알라닌-발린, 글루타메이트-아스파테이트, 및 아스파라긴-글루타민. 대안적으로, 보존성 대체는 Gonnet et al. (1992) *Science* 256:1443-1445 (모든 목적에 대해 그 전문이 본원에 참조로 포함됨)에서 개시된 PAM250 로그-가능도 매트릭스에서 양의 값을 가지는 임의의 변화이다. "적당한 보존성" 대체는 PAM250 로그-가능도 매트릭스에서 음이 아닌 값을 가지는 임의의 변화이다.

[0080] 하나 이상의 인용된 요소를 "포함하는" 조성물 또는 방법은 구체적으로 인용되지 않은 다른 요소를 포함할 수 있다. 예를 들어, 단백질을 "포함하는" 조성물은 단백질을 단독으로 또는 다른 성분과 함께 함유할 수 있다. 전환 문구인 "본질적으로 ~으로 이루어지는"은 청구항의 범주가 그 청구항에서 인용된 명시된 요소 및 청구된 발명의 기본적인 특성에 실질적으로 영향을 미치지 않는 것들을 포함하는 것으로 해석되어야 하는 것을 의미한다. 그러므로, 용어 "본질적으로 ~으로 이루어지는"은 본 발명의 청구범위에서 사용될 때 "포함하는"과 동등하게 해석되는 것으로 의도된 것은 아니다.

[0081] "선택적인" 또는 "선택적으로"는 후속적으로 기술된 사건 또는 상황이 일어날 수도 있고 일어나지 않을 수도 있음을 의미하며 그런 기술이 사건 또는 상황이 일어나는 경우 및 일어나지 않는 경우를 포함하는 것을 의미한다.

[0082] 값의 범위의 표시는 그 범위 내의 또는 그 범위를 규정하는 모든 정수, 및 그 범위 내의 정수에 의해 규정된 모든 하위범위를 포함한다.

[0083] 맥락으로부터 분명히 다르지 않는 한, 용어 "약"은 진술된 값의 표준 측정 오차 (예컨대, SEM) 내의 값을 포함한다.

[0084] 용어 "및/또는"은 하나 이상의 관련된 열거된 항목의 임의의 및 모든 가능한 조합, 뿐만 아니라 대안으로 해석될 때 ("또는") 조합의 부족을 나타내고 포함한다.

[0085] 용어 "또는"은 특정 목록의 임의의 한 구성원을 나타내고 또한 그 목록의 구성원의 임의의 조합을 포함한다.

[0086] 단수 형태를 나타내는 용어들은 맥락이 분명하게 다른 것을 표시하지 않는 한 복수의 대상을 포함한다. 예를 들어, 용어 "단백질" 또는 "적어도 한 단백질"은 복수의 단백질, 및 그것들의 혼합물을 포함할 수 있다.

[0087] 실질적으로 유의한 것은 $p \leq 0.05$ 를 의미한다.

[0088] 상세한 설명

[0089] I. 개요

[0090] 본원에는 인간화된 *TRKB* 유전자좌를 포함하는 비인간 동물 계능, 비인간 동물 세포, 및 비인간 동물 및 이러한 비인간 동물 세포 및 비인간 동물을 사용하는 방법이 개시된다. 인간화된 *TRKB* 유전자좌를 포함하는 비인간 동물 세포 또는 비인간 동물은 인간 *TRKB* 단백질 또는 인간 *TRKB* 단백질의 하나 이상의 단편 (예컨대, 인간 *TRKB* 세포의 도메인의 전부 또는 일부)을 포함하는 키메라 *TRKB* 단백질을 발현한다.

[0091] 인간화된 *TRKB* 대립유전자 (예컨대, 비인간 동물 계능 DNA의 전부 또는 일부를 병렬상동 인간 계능 DNA로 일대일로 대체한 결과임)는 인간-*TRKB*-표적화 시약 (예컨대, 인간 *TRKB*를 표적으로 하기 위해 설계된 작용물질 항체 또는 작용물질 소분자)의 진정한 인간 표적 또는 진정한 인간 표적에 매우 근사한 것을 제공하고, 그로써 약동학적 및 약력학적 연구뿐만 아니라 살아있는 동물에서 이러한 작용제의 효능 및 작용 방식의 테스트를 가능하게 할 것이다. 예를 들어, 본원에 개시된 작업 실시예에서 나타내는 것과 같이, 인간-*TRKB*-작용물질 항체의 유리체 내 투여는 인간화된 TrkB 래트에서 시신경 손상 후 상당한 신경보호 효과를 가진다.

[0092] II. 인간화된 *TRKB* 유전자좌를 포함하는 비인간 동물

[0093] 본원에서 개시된 비인간 동물 계능, 비인간 동물 세포, 및 비인간 동물은 인간화된 *TRKB* 유전자좌를 포함한다. 인간화된 *TRKB* 유전자좌를 포함하는 세포 또는 비인간 동물은 인간 *TRKB* 단백질 또는 천연 *TRKB* 단백질의 하나 이상의 단편이 인간 *TRKB*로부터의 상응하는 단편 (예컨대, 세포의 도메인의 전부 또는 일부)으로 대체되어 있는 부분적으로 인간화된, 키메라 *TRKB* 단백질을 발현한다.

[0094] A. *TRKB*

[0095] 본원에서 기술된 세포 및 비인간 동물은 인간화된 *TRKB* 유전자좌를 포함한다. *TRKB* (또한 BDNF-NT-3 성장 인자 수용체, GP145-TrkB, Trk-B, TrkB, 신경영양 티로신 키나제 수용체 type 2, TrkB 티로신 키나제, 트로포미오신-관련 키나제 B, 트로포미오신 수용체 키나제 B, 신경영양 수용체 티로신 키나제 2, 및 NTRK2로도 알려져 있음)는 *TRKB* 유전자 (또한 *NTRK2*, *OBHD*, *TRK-B*, 및 *GP145-TRKB*로도 알려져 있음)에 의해 암호화된다. *TRKB*는 뉴

런 생존, 증식, 이동, 분화, 및 시냅스 형성 및 가소성의 조절을 통해 중추 및 말초 신경계의 발달 및 성숙에 관여된 수용체 티로신 키나제이다. TRKB는 BDNF/뇌-유래 신경영양 인자 및 NTF4/뉴로트로핀-4에 대한 수용체이다. 대안적으로, TRKB는 또한 NTF3/뉴로트로핀-3에 결합할 수 있고, 이것은 수용체를 활성화하는 데에는 덜 효과적이지만 TRKB를 통해 뉴런 생존을 조절한다. 리간드 결합시, TRKB는 동종다imer화, 자가인산화, 및 활성화를 진행한다. TRKB의 정식 이소형은 중추 및 말초 신경계에서 발현된다. 중추 신경계 (CNS)에서, 발현은 대뇌 피질, 해마, 시상, 맥락막, 소뇌의 과립층, 뇌 줄기, 및 척수에서 관찰된다. 말초 신경계에서, 그것은 많은 두 개골 신경절, 안과 신경, 전정 시스템, 여러 안면 구조, 상악 삼 및 등근 신경절에서 발현된다.

[0096] 인간 TRKB는 염색체 9 상의 인간 9q21.33에 대해 지도화된다 (NCBI RefSeq Gene ID 4915; 어셈블리 GRCh38.p7; 위치 NC_000009.12 (84668368..85027070)). 유전자는 23개의 엑손을 가지는 것으로 보고되었다. 야생형 인간 TRKB 단백질은 UniProt 등록 번호 Q16620을 배정받았다. 적어도 7개의 이소형이 알려져 있다 (Q16620-1부터 Q16620-7까지임). 한 이소형 Q16620-4 (NCBI 등록 번호 NP_006171.2와 동일함)에 대한 서열이 SEQ ID NO: 3에 제시된다. 정식 이소형을 암호화하는 mRNA (cDNA)는 NCBI 등록 번호 AF410899.1로 배정되고 SEQ ID NO: 8에 제시된다. 인간 TRKB 이소형을 암호화하는 mRNA (cDNA)의 또 다른 실례는 RefSeq mRNA ID NM_006180.4로 배정된다. 예시적인 코딩 서열 (CDS)은 SEQ ID NO: 11에 제시된다. SEQ ID NO: 3에 제시된 전장 인간 TRKB 단백질은 신호 펩타이드 (아미노산 1-31), 세포외 도메인 (아미노산 32-430), 경막 도메인 (아미노산 431-454), 및 세포질 도메인 (아미노산 455-838)을 포함하여 838개의 아미노산을 가진다. 이들 도메인 사이의 묘사는 UniProt에서 지정된 것과 같다. 인간 TRKB에 대한 언급은 모든 대립유전자 형태 및 이소형뿐만 아니라 정식 (야생형) 형태를 포함한다. 인간 TRKB의 임의의 다른 형태는 야생형 형태와의 최대 정렬에 대해 넘버링된 아미노산을 가지며, 정렬된 아미노산은 동일한 번호로 지정된다. 인간 TRKB의 또 다른 이소형의 실례는 Q16620-1 (NCBI 등록 번호 NP_001018074.1과 동일함)이고, SEQ ID NO: 75에 제시된다. 이 이소형을 암호화하는 mRNA (cDNA)는 NCBI 등록 번호 NM_001018064.2로 배정되고 SEQ ID NO: 76에 제시된다. 이 이소형 (CCDS ID CCDS35050.1)에 대한 예시적인 코딩 서열 (CDS)은 SEQ ID NO: 77에 제시된다.

[0097] 래트 *TrkB*는 염색체 17 상에 래트 17p14로 지도화된다 (NCBI RefSeq Gene ID 25054; 어셈블리 Rnor_6.0; 위치 NC_005116.4 (5934651..6245778, 보체)). 유전자는 23개의 엑손을 가지는 것으로 보고되었다. 야생형 래트 TRKB 단백질은 UniProt 등록 번호 Q63604를 배정받았다. 적어도 3개의 이소형이 알려져 있다 (Q63604-1부터 Q63604-3까지임). 정식 이소형 Q63604-1 (NCBI 등록 번호 NP_036863.1과 동일함)에 대한 서열이 SEQ ID NO: 2에 제시된다. 정식 이소형을 암호화하는 mRNA (cDNA)는 NCBI 등록 번호 NM_012731.2로 배정되고 SEQ ID NO: 7에 제시된다. 래트 TRKB 이소형을 암호화하는 mRNA (cDNA)의 또 다른 실례는 RefSeq mRNA ID M55291로 배정된다. 예시적인 코딩 서열 (CDS)은 SEQ ID NO: 10에 제시된다. SEQ ID NO: 2에 제시된 정식 전장 래트 TRKB 단백질은 신호 펩타이드 (아미노산 1-31), 세포외 도메인 (아미노산 32-429), 경막 도메인 (아미노산 430-453), 및 세포질 도메인 (아미노산 454-821)을 포함하여 821개의 아미노산을 가진다. 이들 도메인 사이의 묘사는 UniProt에서 지정된 것과 같다. 래트 TRKB에 대한 언급은 모든 대립유전자 형태 및 이소형뿐만 아니라 정식 (야생형) 형태를 포함한다. 래트 TRKB의 임의의 다른 형태는 야생형 형태와의 최대 정렬에 대해 넘버링된 아미노산을 가지며, 정렬된 아미노산은 동일한 번호로 지정된다.

[0098] 마우스 *TrkB*는 염색체 12 상에 마우스 13 B1; 13 31.2 cM으로 지도화된다 (NCBI RefSeq Gene ID 18212; 어셈블리 GRCm38.p4 (GCF_000001635.24); 위치 NC_000079.6 (58806569..59133970)). 유전자는 23개의 엑손을 가지는 것으로 보고되었다. 야생형 마우스 TRKB 단백질은 UniProt 등록 번호 P15209를 배정받았다. 적어도 4개의 이소형이 알려져 있다 (P15209-1부터 P15209-4까지임). 정식 이소형, P15209-1 (NCBI 등록 번호 NP_001020245.1 및 NP_001269890.1과 동일함)에 대한 서열이 SEQ ID NO: 1에 제시된다. 정식 이소형을 암호화하는 예시적인 mRNA (cDNA) 이소형은 NCBI 등록 번호 NM_001025074.2로 배정되고 SEQ ID NO: 6에 제시된다. 예시적인 코딩 서열 (CDS)(CCDS ID CCDS26573.1)은 SEQ ID NO: 9에 제시된다. SEQ ID NO: 1에 제시된 정식 전장 마우스 TRKB 단백질은 신호 펩타이드 (아미노산 1-31), 세포외 도메인 (아미노산 32-429), 경막 도메인 (아미노산 430-453), 및 세포질 도메인 (아미노산 454-821)을 포함하여 821개의 아미노산을 가진다. 이들 도메인 사이의 묘사는 UniProt에서 지정된 것과 같다. 마우스 TRKB에 대한 언급은 모든 대립유전자 형태 및 이소형뿐만 아니라 정식 (야생형) 형태를 포함한다. 마우스 TRKB의 임의의 다른 형태는 야생형 형태와의 최대 정렬에 대해 넘버링된 아미노산을 가지며, 정렬된 아미노산은 동일한 번호로 지정된다.

[0099] B. 인간화된 *TRKB* 유전자좌

[0100] 인간화된 *TRKB* 유전자좌는 전체 *TrkB* 유전자가 상응하는 병렬상동 인간 *TRKB* 서열로 대체된 *TrkB* 유전자좌이거나, 또는 그것은 단지 일부의 *TrkB* 유전자만이 상응하는 병렬상동 인간 *TRKB* 서열로 대체된 (즉, 인간화된)

TrkB 유전자좌일 수 있다. 선택적으로, 상응하는 병렬상동 인간 *TRKB* 서열은 비인간 동물에서의 코돈 용법을 기반으로 코돈-최적화되도록 변형된다. 대체된 (즉, 인간화된) 영역은 엑손과 같은 코딩 영역, 인트론과 같은 비코딩 영역, 미번역 영역, 또는 조절 영역 (예컨대, 프로모터, 인핸서, 또는 전사 리프레서-결합 요소), 또는 이것들의 임의의 조합을 포함할 수 있다. 한 실례로서, 인간 *TRKB* 유전자의 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22개, 또는 23개 전부의 엑손에 상응하는 엑손이 인간화될 수 있다. 예를 들어, 신호 펩타이드 바로 다음부터 시작하여 아미노산 33을 암호화하는 코돈으로부터 엑손 2의 분절 (코딩 엑손 1)을 포함하는, 인간 *TRKB* 유전자의 엑손 3-10에 상응하는 엑손이 인간화될 수 있다. 대안적으로, 항-인간-*TRKB* 항원 결합 단백질에 의해 인식된 에피토프를 암호화하는 *TrkB*의 영역 또는 인간-*TRKB*-표적화 시약 (예컨대, 소분자)에 의해 인식된 영역이 인간화될 수 있다. 마찬가지로, 인간 *TRKB* 유전자의 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21개, 또는 22개 전부의 인트론에 상응하는 인트론이 인간화되거나 또는 내인성으로 남아 있을 수 있다. 예를 들어, 선택적으로 엑손 10 다음의 인트론 (즉, 인트론 10) 부분을 포함하는, 인간 *TRKB* 유전자의 엑손 2와 10 사이의 인트론 (즉, 인트론 2-9, 코딩 엑손 1과 엑손 10 사이)에 상응하는 인트론이 인간화될 수 있다. 조절 서열을 포함하는 측면의 미번역 영역이 또한 인간화되거나 또는 내인성으로 남아 있을 수 있다. 예를 들어, 5' 미번역 영역 (UTR), 3'UTR, 또는 5' UTR과 3' UTR 둘 다가 인간화되거나, 또는 5' UTR, 3'UTR, 또는 5' UTR 및 3' UTR 둘 다가 내인성으로 남아 있을 수 있다. 특정 실례에서, 5' UTR 및 3' UTR 둘 다가 내인성으로 남아 있을 수 있다. 병렬상동 서열에 의한 대체 정도에 따라, 프로모터와 같은 조절 서열은 내인성이거나 인간 병렬상동 서열을 대체함으로써 공급될 수 있다. 예를 들어, 인간화된 *TRKB* 유전자좌는 내인성 비인간 동물 *TrkB* 프로모터를 포함할 수 있다.

[0101] 신호 펩타이드, 세포질 도메인, 경막 도메인, 또는 세포외 도메인을 암호화하는 영역은 하나 이상 또는 전부 인간화되거나, 또는 이러한 영역 중 하나 이상이 내인성으로 남아 있을 수 있다. 마우스 *TRKB* 신호 펩타이드, 세포외 도메인, 경막 도메인, 및 세포질 도메인에 대한 예시적인 코딩 서열은 각각 SEQ ID NO: 63-66에 제시된다. 래트 *TRKB* 신호 펩타이드, 세포외 도메인, 경막 도메인, 및 세포질 도메인에 대한 예시적인 코딩 서열은 각각 SEQ ID NO: 67-70에 제시된다. 인간 *TRKB* 신호 펩타이드, 세포외 도메인, 경막 도메인, 및 세포질 도메인에 대한 예시적인 코딩 서열은 각각 SEQ ID NO: 71-74에 제시된다.

[0102] 예를 들어, 신호 펩타이드를 암호화하는 *TrkB* 유전자좌 영역의 전부 또는 일부가 인간화되거나, 및/또는 세포외 도메인을 암호화하는 *TrkB* 유전자좌 영역의 전부 또는 일부가 인간화되거나, 및/또는 경막 도메인을 암호화하는 *TrkB* 유전자좌 영역의 전부 또는 일부가 인간화되거나, 및/또는 세포질 도메인을 암호화하는 *TrkB* 유전자좌 영역의 전부 또는 일부가 인간화될 수 있다. 한 실례에서, 세포외 도메인을 암호화하는 *TrkB* 유전자좌 영역의 전부 또는 일부가 인간화된다. 선택적으로, 인간 *TRKB* 세포외 도메인의 CDS는 SEQ ID NO: 72 (또는 이것의 축퇴물)에 대해 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 서열을 포함하거나, 본질적으로 그것으로 이루어지거나, 또는 그것으로 이루어진다. *TRKB* 단백질은 천연 *TRKB*의 활성을 보유할 수 있다 (예컨대, 인산화되는 능력을 보유하거나, PI3K/AKT 및 MAPK/ERK 경로와 같은 하류 신호전달 경로를 활성화하는 능력을 보유하거나, 또는 뉴런 생존, 증식, 이동, 분화, 또는 시냅스 형성 및 가소성을 조절하거나 또는 본원의 다른 곳에서 개시된 임의의 표현형을 생성하는 능력을 보유한다). 예를 들어, 내인성 신호 펩타이드, 내인성 세포질 도메인, 내인성 경막 도메인, 및 인간화된 세포외 도메인을 가지는 키메라 *TRKB* 단백질이 생성되도록 세포외 도메인을 암호화하는 *TrkB* 유전자좌 영역은 인간화될 수 있다.

[0103] 신호 펩타이드, 세포질 도메인, 경막 도메인, 또는 세포외 도메인을 암호화하는 영역 중 하나 이상이 내인성으로 남아 있을 수 있다. 예를 들어, 신호 펩타이드 및/또는 세포질 도메인 및/또는 경막 도메인을 암호화하는 영역이 내인성으로 남아 있을 수 있다. 선택적으로, 내인성 *TRKB* 신호 펩타이드의 CDS는 SEQ ID NO: 63 또는 67 (또는 이것의 축퇴물)에 대해 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 서열을 포함하거나, 본질적으로 그것으로 이루어지거나, 또는 그것으로 이루어진다. 선택적으로, 내인성 *TRKB* 경막 도메인의 CDS는 SEQ ID NO: 65 또는 69 (또는 이것의 축퇴물)에 대해 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 서열을 포함하거나, 본질적으로 그것으로 이루어지거나, 또는 그것으로 이루어진다. 선택적으로, 내인성 *TRKB* 세포질 도메인의 CDS는 SEQ ID NO: 66 또는 70 (또는 이것의 축퇴물)에 대해 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 서열을 포함하거나, 본질적으로 그것으로 이루어지거나, 또는 그것으로 이루어진다. 각 경우에, *TRKB* 단백질은 천연 *TRKB*의 활성을 보유할 수 있다.

[0104] 인간화된 *TRKB* 유전자좌에 의해 암호화된 *TRKB* 단백질은 인간 *TRKB* 단백질로부터 유래된 하나 이상의 도메인 및/또는 내인성 (즉, 천연) *TRKB* 단백질로부터 유래된 하나 이상의 도메인을 포함할 수 있다. 마우스 *TRKB* 신호 펩타이드, 세포외 도메인, 경막 도메인, 및 세포질 도메인에 대한 예시적인 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO:

51-54에 제시된다. 래트 TRKB 신호 펩타이드, 세포외 도메인, 경막 도메인, 및 세포질 도메인에 대한 예시적인 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 55-58에 제시된다. 인간 TRKB 신호 펩타이드, 세포외 도메인, 경막 도메인, 및 세포질 도메인에 대한 예시적인 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 59-62에 제시된다.

[0105] TRKB 단백질은 인간 TRKB 신호 펩타이드, 인간 TRKB 세포외 도메인, 인간 TRKB 경막 도메인, 및 인간 TRKB 세포질 도메인 중 하나 이상 또는 전부를 포함할 수 있다. 한 실례로서, TRKB 단백질은 인간 TRKB 세포외 도메인을 포함할 수 있다.

[0106] 인간화된 *TRKB* 유전자좌에 의해 암호화된 TRKB 단백질은 또한 내인성 (즉, 천연) 비인간 동물 TRKB 단백질로부터 유래된 하나 이상의 도메인을 포함할 수 있다. 한 실례로서, 인간화된 *TRKB* 유전자좌에 의해 암호화된 TRKB 단백질은 내인성 (즉, 천연) 비인간 동물 TRKB 단백질로부터 유래된 신호 펩타이드 및/또는 내인성 (즉, 천연) 비인간 동물 TRKB 단백질로부터 유래된 세포질 도메인 및/또는 내인성 (즉, 천연) 비인간 동물 TRKB 단백질로부터 유래된 경막 도메인을 포함할 수 있다.

[0107] 인간 TRKB 단백질로부터 유래된 키메라 TRKB 단백질의 도메인은 전체적으로 인간화된 서열에 의해 암호화되거나 (즉, 그 도메인을 암호화하는 전체 서열이 병렬상동 인간 *TRKB* 서열로 대체됨) 또는 부분적으로 인간화된 서열에 의해 암호화될 수 있다 (즉, 그 도메인을 암호화하는 서열의 일부가 병렬상동 인간 *TRKB* 서열로 대체되고, 그 도메인을 암호화하는 나머지 내인성 (즉, 천연) 서열은 암호화된 도메인이 인간 TRKB 단백질에서의 그 도메인과 동일하도록 병렬상동 인간 *TRKB* 서열과 동일한 아미노산을 암호화한다). 마찬가지로, 내인성 TRKB 단백질로부터 유래된 키메라 단백질의 도메인은 전체 내인성 서열에 의해 암호화되거나 (즉, 그 도메인을 암호화하는 전체 서열이 내인성 *TrkB* 서열임) 또는 부분적으로 인간화된 서열에 의해 암호화될 수 있다 (즉, 그 도메인을 암호화하는 서열의 일부는 병렬상동 인간 *TRKB* 서열로 대체되지만, 병렬상동 인간 *TRKB* 서열은 암호화된 도메인이 내인성 TRKB 단백질에서의 그 도메인과 동일하도록 대체된 내인성 *TrkB* 서열과 동일한 아미노산을 암호화한다). 예를 들어 경막 도메인을 암호화하는 (예컨대, 경막 도메인의 N-말단 영역을 암호화하는) *TrkB* 유전자좌의 영역의 일부는 병렬상동 인간 *TRKB* 서열로 대체될 수 있고, 여기서 병렬상동 인간 *TRKB* 서열에 의해 암호화된 경막 도메인의 영역의 아미노산 서열은 상응하는 내인성 아미노산 서열과 동일하다.

[0108] 한 실례로서, 인간화된 *TRKB* 유전자좌에 의해 암호화된 TRKB 단백질은 인간 TRKB 세포외 도메인을 포함할 수 있다. 선택적으로, 인간 TRKB 세포외 도메인은 SEQ ID NO: 60에 대해 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 서열을 포함하거나, 본질적으로 그것으로 이루어지거나, 또는 그것으로 이루어진다. TRKB 단백질은 천연 TRKB의 활성을 보유한다 (예컨대, 인산화되는 능력을 보유하거나, PI3K/AKT 및 MAPK/ERK 경로와 같은 하류 신호전달 경로를 활성화하는 능력을 보유하거나, 또는 뉴런 생존, 증식, 이동, 분화, 또는 시냅스 형성 및 가소성을 조절하거나 또는 본원의 다른 곳에서 개시된 임의의 표현형을 생성하는 능력을 보유한다). 다른 실례로서, 인간화된 *TRKB* 유전자좌에 의해 암호화된 TRKB 단백질은 내인성 비인간 동물 TRKB 세포질 도메인 (예컨대, 마우스 TRKB 세포질 도메인 또는 래트 TRKB 세포질 도메인)을 포함할 수 있다. 선택적으로, 비인간 동물 TRKB 세포질 도메인은 SEQ ID NO: 54 또는 58에 대해 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 서열을 포함하거나, 본질적으로 그것으로 이루어지거나, 또는 그것으로 이루어진다. 또 다른 실례로서, 인간화된 *TRKB* 유전자좌에 의해 암호화된 TRKB 단백질은 내인성 비인간 동물 TRKB 경막 도메인 (예컨대, 마우스 TRKB 경막 도메인 또는 래트 TRKB 경막 도메인)을 포함할 수 있다. 선택적으로, 비인간 동물 TRKB 경막 도메인은 SEQ ID NO: 53 또는 57에 대해 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 서열을 포함하거나, 본질적으로 그것으로 이루어지거나, 또는 그것으로 이루어진다. 또 다른 실례로서, 인간화된 *TRKB* 유전자좌에 의해 암호화된 TRKB 단백질은 내인성 비인간 동물 TRKB 신호 펩타이드 (예컨대, 마우스 TRKB 신호 펩타이드 또는 래트 TRKB 신호 펩타이드)를 포함할 수 있다. 선택적으로, 비인간 동물 TRKB 신호 펩타이드는 SEQ ID NO: 51 또는 55에 대해 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 서열을 포함하거나, 본질적으로 그것으로 이루어지거나, 또는 그것으로 이루어진다. 각각의 경우에, TRKB 단백질은 천연 TRKB의 활성을 보유할 수 있다. 예를 들어, 인간화된 *TRKB* 유전자좌에 의해 암호화된 TRKB 단백질은 SEQ ID NO: 4 또는 5에 대해 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 서열을 포함하거나, 본질적으로 그것으로 이루어지거나, 또는 그것으로 이루어진다. 선택적으로, 인간화된 *TRKB* 유전자좌에 의해 암호화된 *TRKB* CDS는 SEQ ID NO: 12 또는 13 (또는 이것의 축퇴물)에 대해 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 서열을 포함하거나, 본질적으로 그것으로 이루어지거나, 또는 그것으로 이루어질 수 있다. 각각의 경우에, TRKB 단백질은 천연 TRKB의 활성을 보유할 수 있다.

[0109] 선택적으로, 인간화된 *TRKB* 유전자좌는 다른 요소를 포함할 수 있다. 그러한 요소의 실례로는 선택 카세트, 리포터 유전자, 재조합효소 인식 부위, 또는 다른 요소를 들 수 있다. 대안적으로, 인간화된 *TRKB* 유전자좌는 다

른 요소가 없을 수 있다 (예컨대, 선택 마커 또는 선택 카세트가 없을 수 있다). 적합한 리포터 유전자 및 리포터 단백질의 실례는 본원의 다른 곳에서 개시된다. 적합한 선택 마커의 실례로는 네오마이신 포스포트랜스퍼라제 (neo_r), 하이드로마이신 B 포스포트랜스퍼라제 (hyg_r), 퓨로마이신-N-아세틸트랜스퍼라제 ($puro_r$), 블라스티시딘 S 탈아민효소 (bsr_r), 크산틴/구아닌 포스포리보실 트랜스퍼라제 (gpt), 및 단순 포진 바이러스 티미딘 키나아제 (HSV-k)를 들 수 있다. 재조합효소의 실례로는 Cre, Flp, 및 Dre 재조합효소를 들 수 있다. Cre 재조합효소 유전자의 한 실례는 Crei이며, 여기에서 Cre 재조합효소를 암호화하는 2개의 엑손이 원핵 세포에서의 그것의 발현을 방지하기 위해 인트론에 의해 분리된다. 이러한 재조합효소는 핵에의 국지화를 용이하게 하기 위한 핵 국지화 신호 (예컨대, NLS-Crei)를 추가로 포함할 수 있다. 재조합효소 인식 부위는 부위-특이적 재조합효소에 의해 인식되고 재조합 사건에 대한 기질로서 작용할 수 있는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 재조합효소 인식 부위의 실례로는 FRT, FRT11, FRT71, attp, att, rox, 및 loxP, lox511, lox2272, lox66, lox71, loxM2, 및 lox5171과 같은 lox 부위를 들 수 있다.

[0110] 리포터 유전자 또는 선택 카세트와 같은 다른 요소는 재조합효소 인식 부위가 옆에 있는 자기 삭제 카세트일 수 있다. 예컨대, US 8,697,851 및 US 2013/0312129 (이들은 각각 모든 목적에 대해 그 전문이 본원에 참조로 포함됨)를 참조한다. 실례로서, 자기 삭제 카세트는 마우스 *Prm1* 프로모터에 작동 가능하게 연결된 Crei 유전자 (인트론에 의해 분리된, Cre 재조합효소를 암호화하는 2개의 엑손을 포함함) 및 인간 유비퀴틴 프로모터에 작동 가능하게 연결된 네오마이신 내성 유전자를 포함한다. *Prm1* 프로모터를 사용함으로써, 자기 삭제 카세트는 FO 동물의 수컷 생식 세포에서 특이적으로 삭제될 수 있다. 선택 마커를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 표적화되는 세포에서 활성인 프로모터에 작동 가능하게 연결될 수 있다. 프로모터의 실례는 본원의 다른 곳에서 기술된다. 또 다른 특정 실례로서, 자기 삭제 선택 카세트는 하나 이상의 프로모터 (예컨대, 인간 유비퀴틴 및 EM7 프로모터 둘 다)에 작동 가능하게 연결된 하이드로마이신 내성 유전자 코딩 서열, 이어서 폴리아데닐화 신호, 이어서 하나 이상의 프로모터 (예컨대, mPrm1 프로모터)에 작동 가능하게 연결된 Crei 코딩 서열, 이어서 또 다른 폴리아데닐화 신호를 포함할 수 있고, 여기서 전체 카세트는 loxP 부위가 옆에 있다.

[0111] 인간화된 *TRKB* 유전자좌는 또한 조건부 대립유전자일 수 있다. 예를 들어, 조건부 대립유전자는, US 2011/0104799 (모든 목적에 대해 그 전문이 본원에 참조로 포함됨)에 기술된 것과 같은 다중기능성 대립유전자이다. 예를 들어, 조건부 대립유전자는: (a) 표적 유전자의 전사와 관련하여 센스 방향의 작동 서열; (b) 센스 또는 안티센스 방향의 약물 선택 카세트 (DSC); (c) 안티센스 방향의 관심의 뉴클레오타이드 서열 (NSI); 및 (d) 역 방향의 반전 모듈에 의한 조건부 (COIN, 엑손-스플리팅 인트론 및 반전 가능한 유전자-트랩-유사 모듈을 활용함)를 포함할 수 있다. 예컨대, US 2011/0104799를 참조한다. 조건부 대립유전자는 제1 재조합효소에 노출될 때 재조합하여 (i) 작동 서열 및 DSC가 없고; 그리고 (ii) 센스 방향으로 NSI 및 안티센스 방향으로 COIN을 함유하는 조건부 대립유전자를 형성하는 재조합 가능한 유닛을 추가로 포함할 수 있다. 예컨대, US 2011/0104799를 참조한다.

[0112] 한 예시적인 인간화된 *TRKB* 유전자좌 (예컨대, 인간화된 마우스 *TrkB* 유전자좌 또는 인간화된 래트 *TrkB* 유전자좌)는, 선택적으로 인트론 10의 일부를 포함하는, 신호 펩타이드 바로 다음에서 시작하는, 아미노산 33을 암호화하는 코돈 (또는 각각 마우스 *TrkB*, 래트 *TrkB*, 또는 인간 *TRKB* CDS와 최적으로 정렬될 때 마우스 *TrkB*, 래트 *TrkB*, 또는 인간 *TRKB*에서 아미노산 33을 암호화하는 코돈에 상응하는 코돈)부터 엑손 10 (또는 각각 마우스 *TrkB*, 래트 *TrkB*, 또는 인간 *TRKB* CDS와 최적으로 정렬될 때 마우스 *TrkB*, 래트 *TrkB*, 또는 인간 *TRKB* 엑손 10에 상응하는 엑손)까지의 엑손 2/코딩 엑손 1에서의 영역이 상응하는 인간 서열로 대체되는 것이다. 대체된 영역은 *TRKB*의 세포외 도메인을 암호화한다. 도 1 및 4 및 SEQ ID NO: 4 및 5를 참조한다.

[0113] C. 인간화된 *TRKB* 유전자좌를 포함하는 비인간 동물 계능, 비인간 동물 세포, 및 비인간 동물

[0114] 본원의 다른 곳에서 기술되는 것과 같은 인간화된 *TRKB* 유전자좌를 포함하는 비인간 동물 계능, 비인간 동물 세포, 및 비인간 동물이 제공된다. 계능, 세포, 또는 비인간 동물은 수컷이거나 암컷일 수 있다. 계능, 세포, 또는 비인간 동물은 인간화된 *TRKB* 유전자좌에 대해 이형접합성이거나 동형접합성일 수 있다. 이배체 유기체는 또한 각 유전자 유전자좌에서 2개의 대립유전자를 가진다. 대립유전자의 각 쌍은 특정 유전자 유전자좌의 유전자형을 나타낸다. 유전자형은 만약 특정 유전자좌에 2개의 동일한 대립유전자가 있다면 동형접합성으로 기술되고 두 대립유전자가 상이하다면 이형접합성으로 기술된다.

[0115] 본원에 제공된 비인간 동물 계능 또는 세포는, 예를 들어, *TrkB* 유전자좌 또는 인간 *TRKB* 유전자좌에 대해 상동하는 또는 병렬상동하는 계능 유전자좌를 포함하는 임의의 비인간 세포일 수 있다. 계능은 세포로부터 유래되거나 또는 세포는, 예를 들어, 진균 세포 (예컨대, 효모), 식물 세포, 동물 세포, 포유류 세포, 비인간 포유류 세

포, 및 인간 세포를 포함하는 진핵세포일 수 있다. 용어 "동물"은, 예를 들어, 포유류, 어류, 파충류, 양서류, 조류, 및 벌레를 포함한 동물계의 임의의 구성원을 포함한다. 포유류 세포는, 예를 들어, 비인간 포유류 세포, 설치류 세포, 래트 세포, 마우스 세포, 또는 햄스터 세포를 포함한다. 다른 비인간 포유류로는, 예를 들어, 비인간 영장류, 원숭이, 유인원, 오랑우탄, 고양이, 개, 토끼, 말, 황소, 사슴, 들소, 가축 (예컨대, 암소, 숫소 등과 같은 소 중; 양, 염소 등과 같은 양 중; 및 돼지 및 야생돼지와 같은 돼지 중)을 들 수 있다. 조류는, 예를 들어, 닭, 칠면조, 타조, 거위, 오리, 등을 들 수 있다. 가축화된 동물 및 경작용 동물 또한 포함된다. 용어 "비인간"은 인간을 배제한다.

[0116] 세포는 또한 미분화 또는 분화된 상태의 임의의 유형일 수 있다. 예를 들어, 세포는 전능성(totipotent) 세포, 만능 세포 (예컨대, 인간 만능 세포 또는 마우스 배아 줄기 (ES) 세포 또는 래트 ES 세포와 같은 비인간 만능 세포), 또는 비만능 세포일 수 있다. 전능성 세포는 임의의 세포 유형에 대해 발생할 수 있는 미분화 세포를 포함하며, 만능 세포는 하나 이상의 분화 세포 유형으로 발달하는 능력을 가진 미분화 세포를 포함한다. 이러한 만능 및/또는 전능성 세포는, 예를 들어, ES 세포 또는 ES-유사 세포, 예컨대 유도된 만능 줄기 (iPS) 세포일 수 있다. ES 세포는 배아에 도입될 때 배아로 발달하는 임의의 조직에 기여할 수 있는 배아-유래 전능성 또는 만능 세포를 포함한다. ES 세포는 배반포의 내세포 집단으로부터 유래될 수 있고 3개의 척추동물 배엽층 (내배엽, 외배엽 및 중배엽) 중 임의의 것의 세포로 분화될 수 있다.

[0117] 본원에서 제공된 세포는 또한 생식 세포 (예컨대, 정자 또는 난모세포)일 수 있다. 세포는 유사분열적으로 유능한 세포 또는 유사분열적으로 비활성인 세포, 감수분열적으로 유능한 세포 또는 감수분열적으로 비활성인 세포일 수 있다. 유사하게, 세포는 또한 일차 체세포성 세포 또는 일차 체세포성 세포가 아닌 세포일 수 있다. 체세포성 세포는 배우자(gamete), 생식 세포, 생식세포, 또는 미분화 줄기 세포가 아닌 임의의 세포를 포함한다. 예를 들어, 세포는 뉴런, 예컨대 해마 뉴런 또는 대뇌피질 뉴런일 수 있다.

[0118] 본원에 제공된 적합한 세포는 또한 일차 세포를 포함한다. 일차 세포는 유기체, 장기, 또는 조직으로부터 직접 분리된 세포 또는 세포 배양물을 포함한다. 일차 세포는 형질전환되지도 않고 불멸의 것도 아닌 세포를 포함한다. 그것은 이전에 조직 배양으로 계대되지 않았거나 이전에 조직 배양으로 계대되었지만 조직 배양으로 무한하게 계대될 수 없는 유기체, 장기, 또는 조직으로부터의 임의의 세포를 포함한다. 이러한 세포는 종래 기법에 의해 분리될 수 있고, 예를 들어, 해마 뉴런 또는 대뇌피질 뉴런을 포함한다.

[0119] 본원에 제공된 다른 적합한 세포는 불멸화된 세포를 들 수 있다. 불멸화된 세포는 정상적으로는 무한하게 증식할 수 없겠지만, 돌연변이 또는 변경으로 인해, 정상적인 세포 노화를 피하고 대신 분할을 유지할 수 있는 다세포 유기체로부터의 세포를 포함한다. 이러한 돌연변이 또는 변경은 자연적으로 일어나거나 또는 의도적으로 유도될 수 있다. 불멸화된 세포주의 특정 실례는 N18TG2 또는 T48과 같은 신경모세포종 세포주 또는 NIH-3T3 세포주와 같은 세포주이다. 수많은 유형의 불멸화된 세포가 잘 알려져 있다. 불멸화된 또는 일차 세포는 재조합 유전자 또는 단백질의 배양 또는 발현에 전형적으로 사용되는 세포를 포함한다.

[0120] 본원에 제공된 세포는 또한 1세포기 배아 (즉, 수정된 난모세포 또는 접합체)를 포함한다. 이러한 1세포기 배아는 임의의 유전자 배경으로부터 유래될 수 있고 (예컨대, 마우스의 경우 BALB/c, C57BL/6, 129, 또는 이것들의 조합), 새로운 것이거나 냉동될 수 있으며, 자연적인 사육 또는 시험관내 수정으로부터 유래될 수 있다.

[0121] 본원에 제공된 세포는 정상적이거나, 건강한 세포이거나, 또는 병에 걸린 또는 돌연변이-포함 세포일 수 있다.

[0122] 본원에서 기술되는 것과 같이 인간화된 *TRKB* 유전자좌를 포함하는 비인간 동물은 본원의 다른 곳에서 기술되는 방법에 의해 만들어질 수 있다. 용어 "동물"은 포유류, 어류, 파충류, 양서류, 조류, 및 벌레를 포함한 동물계의 임의의 구성원을 포함한다. 비인간 포유류는, 예를 들어, 비인간 영장류, 원숭이, 유인원, 오랑우탄, 고양이, 개, 말, 황소, 사슴, 들소, 양, 토끼, 설치류 (예컨대, 마우스, 래트, 햄스터, 및 기니아 피그), 및 가축 (예컨대, 암소, 숫소 등과 같은 소 중; 양, 염소 등과 같은 양 중; 및 돼지 및 야생돼지와 같은 돼지 중)을 들 수 있다. 조류로는, 예를 들어, 닭, 칠면조, 타조, 거위, 및 오리를 들 수 있다. 가축화된 동물 및 경작용 동물 또한 포함된다. 용어 "비인간 동물"은 인간을 배제한다. 바람직한 비인간 동물은, 예를 들어, 설치류, 예컨대 마우스 및 래트를 들 수 있다.

[0123] 비인간 동물은 임의의 유전자 배경으로부터 유래될 수 있다. 예를 들어, 적합한 마우스는 129 스트레인, C57BL/6 스트레인, 129와 C57BL/6의 혼합, BALB/c 스트레인, 또는 Swiss Webster 스트레인으로 유래될 수 있다. 129 스트레인의 실례로는 129P1, 129P2, 129P3, 129X1, 129S1 (예컨대, 129S1/SV, 129S1/SvIm), 129S2, 129S4, 129S5, 129S9/SvEvH, 129S6 (129/SvEvTac), 129S7, 129S8, 129T1, 및 129T2를 들 수 있다. 예컨대,

Festing *et al.* (1999) *Mammalian Genome* 10:836 (모든 목적에 대해 그 전문이 본원에 참조로 포함됨)을 참조한다. C57BL 스트레인의 실례로는 C57BL/A, C57BL/An, C57BL/GrFa, C57BL/Kal_wN, C57BL/6, C57BL/6J, C57BL/6ByJ, C57BL/6NJ, C57BL/10, C57BL/10ScSn, C57BL/10Cr, 및 C57BL/Ola를 들 수 있다. 적합한 마우스는 또한 상기 언급한 129 스트레인과 상기 언급한 C57BL/6 스트레인의 혼합 (예컨대, 50% 129 및 50% C57BL/6)으로부터 유래될 수 있다. 마찬가지로, 적합한 마우스는 상기 언급한 129 스트레인의 혼합 또는 상기 언급한 BL/6 스트레인의 혼합 (예컨대, 129S6 (129/SvEvTac) 스트레인)으로부터 유래될 수 있다.

[0124] 유사하게, 래트는, 예를 들어, ACI 래트 스트레인, 다크 아구티 (Dark Agouti, DA) 래트 스트레인, Wistar 래트 스트레인, LEA 래트 스트레인, 스프라그 다울리 (Sprague Dawley, SD) 래트 스트레인, 또는 Fisher F344 또는 Fisher F6과 같은 Fischer 래트 스트레인을 포함한 임의의 래트 스트레인으로부터 유래될 수 있다. 래트는 또한 상기 열거한 둘 이상의 스트레인의 혼합으로부터 유도된 스트레인으로부터 얻어질 수 있다. 예를 들어, 적합한 래트는 DA 스트레인 또는 ACI 스트레인으로부터 유래될 수 있다. ACI 래트 스트레인은 블랙 아구티를 가지는 것으로 특성화되며, 흰색 배 및 발과 RTI^{av1} 할로타입을 가진다. 이러한 스트레인은 Harlan Laboratories를 포함한 다양한 공급처로부터 이용 가능하다. 다크 아구티 (DA) 래트 스트레인은 아구티 외피 및 RTI^{av1} 할로타입을 가지는 것으로 특성화된다. 이러한 래트는 Charles River 및 Harlan Laboratories를 포함한 다양한 공급처로부터 이용 가능하다. 일부 적합한 래트는 사육된 래트 스트레인으로부터 유래될 수 있다. 예컨대, US 2014/0235933 (모든 목적에 대해 그 전문이 본원에 참조로 포함됨)을 참조한다.

[0125] **III. 생체내 또는 생체외에서 인간-TRKB-표적화 시약의 효능을 평가하기 위해 인간화된 TRKB 유전자좌를 포함하는 비인간 동물의 사용 방법**

[0126] 생체내 또는 생체외에서 인간-TRKB-표적화 시약 (예컨대, 치료 작용물질 분자)의 전달 또는 효능을 평가 또는 최적화하기 위해 본원의 다른 곳에서 기술된 인간화된 TRKB 유전자좌를 포함하는 비인간 동물을 사용하는 다양한 방법이 제공된다. 비인간 동물이 인간화된 TRKB 유전자좌를 포함하기 때문에, 비인간 동물은 인간 TRKB-표적화 시약의 효능을 보다 정확하게 반영할 것이다.

[0127] **A. 생체내 또는 생체외에서 인간-TRKB-표적화 시약의 효능을 테스트하는 방법**

[0128] 본원의 다른 곳에서 기술된 인간화된 TRKB 유전자를 포함하는 비인간 동물을 사용하여 생체내에서 인간-TRKB-표적화 시약의 전달 또는 효능을 평가하기 위한 다양한 방법이 제공된다. 이러한 방법은 (a) 비인간 동물에 인간-TRKB-표적화 시약을 도입하는 단계; 및 (b) 인간-TRKB-표적화 시약의 활성을 평가하는 단계를 포함할 수 있다.

[0129] 인간-TRKB-표적화 시약은 인간 TRKB를 표적으로 하는 인간-TRKB-표적화 항체 또는 항원 결합 단백질 또는 임의의 다른 큰 분자 또는 소분자일 수 있다. 대안적으로, 인간-TRKB-표적화 시약은 인간 TRKB 유전자좌 (인간 TRKB 유전자), 인간 TRKB mRNA, 또는 인간 TRKB 단백질을 표적으로 하는 임의의 생물학적 또는 화학적 작용제일 수 있다. 인간-TRKB-표적화 시약의 실례는 본원의 다른 곳에서 개시된다.

[0130] 이러한 인간-TRKB-표적화 시약은 본원의 다른 곳에서 보다 상세하게 개시되는 것과 같이 임의의 전달 방법 (예컨대, 주사, AAV, LNP, 또는 HDD)에 의해 임의의 투여 경로에 의해 투여될 수 있다. 치료 분자의 전달 수단 및 투여 경로는 본원의 다른 곳에서 보다 상세하게 개시된다. 특정 방법에서, 시약은 주사 (예컨대, 직접 해마 주사, 피하 주사, 또는 유리체내 주사)를 통해 전달된다.

[0131] 인간-TRKB-표적화 시약의 활성을 평가하는 방법은 잘 알려져 있고 본원의 다른 곳에서 제공된다. 일부 방법에서, 인간-TRKB-표적화 시약의 활성 (예컨대, 작용물질 활성 또는 억제 활성)을 평가하는 것은 본원의 다른 곳에서 개시되는 것과 같은 TRKB 활성 (예컨대, TRKB 인산화, 하류 신호전달 경로의 TRKB-매개된 활성화, 또는 TRKB-유도 표현형)을 평가하는 것을 포함한다. 활성의 평가는 본원의 다른 곳에서 개시되는 것과 같이 임의의 세포 유형, 임의의 조직 유형, 또는 임의의 장기 유형에서 이루어질 수 있다. 일부 방법에서, 활성의 평가는 뇌 조직 (예컨대, 해마 또는 선조체) 또는 뉴런 (예컨대, 망막 신경절 세포, 해마 뉴런, 또는 대뇌피질 뉴런)에서 이루어진다.

[0132] 만약 TRKB-표적화 시약이 게놈 편집 시약 (예컨대, 뉴클레아제 작용제)이면, 이러한 방법은 인간화된 TRKB 유전자좌의 변형을 평가하는 단계를 포함할 수 있다. 예를 들어, 평가하는 단계는 비인간 동물로부터 분리된 하나 이상의 세포에서 인간화된 TRKB 유전자좌를 서열분석하는 것을 포함할 수 있다 (예컨대, 차세대 서열분석). 평가는 비인간 동물로부터 표적 장기 (예컨대, 뇌) 또는 조직을 분리하는 단계 및 표적 장기 또는 조직에서 인간화된 TRKB 유전자좌의 변형을 평가하는 단계를 포함할 수 있다. 평가는 또한 표적 장기 또는 조직 내의 둘 이상

의 상이한 세포 유형에서 인간화된 *TRKB* 유전자좌의 변형을 평가하는 단계를 포함할 수 있다. 유사하게, 평가는 비인간 동물로부터 비표적 장기 또는 조직 (예컨대, 둘 이상의 비표적 장기 또는 조직)을 분리하는 단계 및 비표적 장기 또는 조직에서 인간화된 *TRKB* 유전자좌의 변형을 평가하는 단계를 포함할 수 있다.

[0133] 이러한 방법은 또한 인간화된 *TRKB* 유전자좌에 의해 생성된 mRNA의 발현 수준을 측정하는 단계, 또는 인간화된 *TRKB* 유전자좌에 의해 암호화된 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함할 수 있다. 예를 들어, 단백질 수준은 특정 세포, 조직, 또는 장기 유형 (예컨대, 뇌)에서 측정될 수 있고, 또는 분비된 수준은 혈청에서 측정될 수 있다. 인간화된 *TRKB* 유전자좌로부터 발현된 *TRKB* mRNA 또는 단백질의 발현을 평가하는 방법은 본원의 다른 곳에서 제공되며 잘 알려져 있다.

[0134] 생체내에서 활성을 평가하기 위한 상기 제공된 다양한 방법은 본원의 다른 곳에서 기술되는 것과 같이 생체외에서 인간-*TRKB*-표적화 시약의 활성을 평가하기 위해 또한 사용될 수 있다.

[0135] B. 생체내 또는 생체외에서 인간-*TRKB*-표적화 시약의 전달 또는 효능을 최적화하는 방법

[0136] 인간-*TRKB*-표적화 시약의 세포 또는 비인간 동물로의 전달을 최적화하는 또는 생체내에서 인간-*TRKB*-표적화 시약의 활성 또는 효능을 최적화하는 다양한 방법이 제공된다. 이러한 방법은, 예를 들어: (a) 제1 비인간 동물 또는 제1 세포에서 첫 번째로 상기 기술된 인간-*TRKB*-표적화 시약의 효능을 테스트하는 방법을 수행하는 단계; (b) 변수를 변경하고 제2 비인간 동물 (즉, 동일한 종의) 또는 제2 세포에서 변경된 변수로 두 번째로 방법을 수행하는 단계; 및 (c) 단계 (a)에서의 인간-*TRKB*-표적화 시약의 활성을 단계 (b)에서의 인간-*TRKB*-표적화 시약의 활성과 비교하고, 더 높은 효능 또는 활성을 초래하는 방법을 선택하는 단계를 포함할 수 있다.

[0137] 인간-*TRKB*-표적화 시약의 전달, 효능, 또는 활성을 측정하는 방법은 본원의 다른 곳에서 개시된다. 더 높은 효능은 비인간 동물 또는 세포 내에서의 원하는 효과에 따라 상이한 것을 의미할 수 있다. 예를 들어, 더 높은 효능은 더 높은 활성 및/또는 더 높은 특이성을 의미할 수 있다. 더 높은 활성은, 예를 들어, *TRKB*를 활성화하는 활성 또는 *TRKB*를 억제하는 활성일 수 있다. 그것은 특정 표적 세포 유형 (예컨대, 망막 신경절 세포와 같은 뉴런) 내에서 또는 특정 표적 조직 또는 장기 (예컨대, 뇌) 내에서 표적화되는 세포의 더 높은 백분율을 나타낼 수 있다. 더 높은 특이성은 표적 외 효과와 비교되는 *TRKB*와 관련하여 더 높은 특이성, 표적화되는 세포 유형과 관련하여 더 높은 특이성, 또는 표적화되는 조직 또는 장기와 관련하여 더 높은 특이성을 나타낼 수 있다.

[0138] 변경되는 변수는 임의의 파라미터일 수 있다. 한 실례로서, 변경된 변수는 인간-*TRKB*-표적화 시약 또는 시약들이 세포 또는 비인간 동물에 도입되는 포장 또는 전달 방법일 수 있다. 전달 방법의 실례는 본원의 다른 곳에서 개시된다. 다른 실례로서, 변경된 변수는 인간-*TRKB*-표적화 시약 또는 시약들의 세포 또는 비인간 동물에의 도입을 위한 투여 경로일 수 있다. 투여 경로의 실례는 본원의 다른 곳에서 개시된다.

[0139] 또 다른 실례로서, 변경된 변수는 도입되는 인간-*TRKB*-표적화 시약 또는 시약들의 농도 또는 양일 수 있다. 또 다른 실례로서, 변경된 변수는 시약의 활성 또는 효능을 평가하는 시점과 관련하여 인간-*TRKB*-표적화 시약 또는 시약들의 도입 시점일 수 있다. 또 다른 실례로서, 변경된 변수는 인간-*TRKB*-표적화 시약 또는 시약들이 도입되는 횟수 또는 빈도일 수 있다. 또 다른 실례로서, 변경된 변수는 도입되는 인간-*TRKB*-표적화 시약 또는 시약들일 수 있다 (예컨대, 하나의 시약이 다른 시약과 비교됨).

[0140] C. 인간-*TRKB*-표적화 시약

[0141] 인간-*TRKB*-표적화 시약은 인간 *TRKB* 단백질, 인간 *TRKB* 유전자, 또는 인간 *TRKB* mRNA를 표적으로 하는 임의의 시약일 수 있다. 인간-*TRKB*-표적화 시약은, 예를 들어, 작용물질 (즉, 인간 *TRKB*를 간접적으로 또는 직접적으로 활성화시키는 분자)이거나 또는 그것은 길항물질 (즉, 인간 *TRKB* 활성을 차단하는 억제제 또는 억제 시약)일 수 있다. 특정 실례에서, 인간-*TRKB*-표적화 시약은 *TRKB* 작용물질이다. 본원에 개시된 방법에서 인간-*TRKB*-표적화 시약은 공지된 인간-*TRKB*-표적화 시약이거나, 추정되는 인간-*TRKB*-표적화 시약 (예컨대, 인간 *TRKB*를 표적으로 하기 위해 설계된 후보 시약)이거나, 또는 인간-*TRKB*-표적화 활성에 대해 스크리닝되는 시약일 수 있다.

[0142] 예를 들어, 인간-*TRKB*-표적화 시약은 인간 *TRKB* 단백질의 에피토프를 표적화하는 항원 결합 단백질 (예컨대, 작용물질 항체)일 수 있다. 이러한 시약의 실례는 *TRKB* 작용물질 항체 H4H9816P2이다. 다른 항-*TRKB* 항체는 본원의 다른 곳에서 개시된다. 일부 경우에, 항-*TRKB* 항체는 25°C 또는 37°C에서 표면 플라즈몬 공명에 의해 측정되는 바 인간 *TRKB*에 약 200 nM 미만의 K_D 로 결합한다. 다른 경우에, 항-*TRKB* 항체는 약 600 pM 미만, 약 300 pM 미만, 약 200 pM 미만, 약 150 pM 미만, 약 100 pM 미만, 약 80 pM 미만, 약 50 pM 미만, 약 40 pM 미만, 약 30 pM 미만, 약 20 pM 미만, 약 10 pM 미만, 약 5 pM 미만, 약 3 pM 미만, 또는 약 1 pM 미만의 K_D 로 인간 *TRKB*

에 결합한다. 일부 경우에, 항-TRKB 항체는 25℃ 또는 37℃에서 표면 플라스몬 공명에 의해 측정되는 바 약 10 분 이상의 해리성 반감기 ($t_{1/2}$)로 인간 TRKB에 결합한다. 다른 경우에, 항-TRKB 항체는 약 20분 이상, 약 50분 이상, 약 100분 이상, 약 120분 이상, 약 150분 이상, 약 300분 이상, 약 350분 이상, 약 400분 이상, 약 450 분 이상, 약 500분 이상, 약 550분 이상, 약 600분 이상, 약 700분 이상, 약 800분 이상, 약 900분 이상, 약 1000분 이상, 약 1100분 이상, 또는 약 1200분 이상의 $t_{1/2}$ 로 인간 TRKB에 결합한다. 특정 실험으로서, 항-TRKB 항체는 **표 22**에 제시된 군으로부터 선택된 6개의 CDR 세트 (HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3) 또는 그것에 대해 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 서열 동일성을 가지는 유사한 서열을 포함할 수 있다.

[0143] 다른 인간-TRKB-표적화 시약은 인간 TRKB 단백질을 표적으로 하는 소분자 (예컨대, 작용물질)를 포함한다. 소분자 TRKB 작용물질의 실험로는 7,8-다이하이드록시플라본 (7,8-DHF), 데옥시게두닌(deoxygedunin), LM22A-4 (*N,N',N''*-트리스(2-하이드록시에틸)-1,3,5-벤젠트라이카르복사미드), 및 LM22B-10 (2-[[4-[[4-Bis-(2-하이드록시에틸)-아미노]-페닐]-(4-클로로-페닐)-메틸]-페닐]-(2-하이드록시-에틸)-아미노]-에탄올)을 들 수 있다. 예컨대, Liu et al. (2015) *Translational Neurodegeneration* 5:2; Massa et al. (2010) *J. Clin. Invest.* 120(5):1774-1785; 및 Yang et al. (2016) *Neuropharmacology* 110:343-361 (이들은 각각 모든 목적에 대해 그 전문이 본원에 참조로 포함됨)을 참조한다. 억제제인 TRKB-표적화 시약의 실험은 K252a이다. 예컨대, Yang et al. (2016) *Neuropharmacology* 110:343-361 (모든 목적에 대해 그 전문이 본원에 참조로 포함됨)을 참조한다.

[0144] 다른 인간-TRKB-표적화 시약으로는 인간 TRKB 단백질을 표적화하는 펩타이드 또는 펩타이드 모방물 (예컨대, 작용물질)을 들 수 있다. 인간 TRKB 작용물질로서 작용하는 펩타이드의 실험은, 예컨대, O'Leary et al. (2003) *J. Biol. Chem.* 278(28):25738-25744 (모든 목적에 대해 그 전문이 본원에 참조로 포함됨)에서 개시된다.

[0145] 다른 인간-TRKB-표적화 시약으로는 인간 *TRKB* 유전자 내에서 인식 부위를 절단하는 뉴클레아제 작용제 (예컨대, 규칙적인 간격을 갖는 짧은 회문구조 반복부 (CRISPR)/CRISPR-회합 (Cas) (CRISPR/Cas) 뉴클레아제, 아연 핑거 뉴클레아제 (ZFN), 또는 전사 활성화제-유사 이펙터 뉴클레아제 (TALEN))와 같은 게놈 편집 시약을 들 수 있다. 마찬가지로, 인간-TRKB-표적화 시약은 인간 *TRKB* 유전자와 재조합하도록 설계된 외인성 도너 핵산 (예컨대, 표적화 벡터 또는 단일 가닥 올리고데옥시뉴클레오타이드 (ssODN))일 수 있다.

[0146] 다른 인간-TRKB-표적화 시약으로는 인간 *TRKB* mRNA를 표적화하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 (예컨대, siRNA 또는 shRNA)를 들 수 있다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드 (ASO) 또는 안티센스 RNA는 표적화된 단백질을 암호화하는 RNA에 선택적으로 결합함으로써 번역을 방지함으로써 표적화된 단백질의 발현을 방지하도록 설계된 뉴클레오타이드의 짧은 합성 스트링이다. 이들 화합물은 잘 특성화된 왓슨-크릭 염기쌍 형성 (혼성화)을 통해 높은 친화도 및 선택성으로 RNA에 결합한다. RNA 간섭 (RNAi)은 RNA-유도 침묵 복합체 (RISC)에 결합된 작은 간섭 RNA (siRNA)가 표적 메신저 RNA (mRNA)의 절단을 매개하는 유전자 발현을 제어하기 위한 내인성 세포 메커니즘이다.

[0147] 임의의 다른 공지된 또는 추정되는 인간-TRKB-표적화 시약의 활성은 또한 본원에 개시된 비인간 동물을 사용하여 평가될 수 있다. 유사하게, 임의의 다른 분자는 본원에 개시된 비인간 동물을 사용하여 인간-TRKB-표적화 활성에 대해 스크리닝될 수 있다.

[0148] D. 비인간 동물 또는 세포에 인간-TRKB-표적화 시약을 투여하기

[0149] 본원에 개시된 방법은 비인간 동물 또는 세포에 핵산, 단백질, 핵산-단백질 복합체, 펩타이드 모방물, 항원 결합 단백질, 또는 소분자를 포함한 다양한 분자 (예컨대, 항체 또는 소분자와 같은 인간-TRKB-표적화 시약)를 도입하는 것을 포함할 수 있다. "도입하기"는 세포 또는 비인간 동물에 분자 (예컨대, 핵산 또는 단백질 또는 소분자)를, 비인간 동물 내에서 세포 내부에 또는 세포 외부에 그것이 접근하게 되는 방식으로 제공하는 것을 포함한다. 도입하기는 임의의 수단에 의해 이루어질 수 있다. 만약 다수의 구성요소가 도입된다면, 그것들은 임의의 조합으로 동시에 또는 순차적으로 도입될 수 있다. 더불어, 둘 이상의 구성요소가 세포 또는 비인간 동물에 동일한 전달 방법 또는 상이한 전달 방법에 의해 도입될 수 있다. 유사하게, 둘 이상의 구성요소가 비인간 동물에 동일한 투여 경로 또는 상이한 투여 경로에 의해 도입될 수 있다.

[0150] 비인간 동물 또는 세포에 도입된 분자는 도입된 분자의 안정성을 증가시키는 (예컨대, 분해 생성물이 한계값 아래로, 예컨대 출발 핵산 또는 단백질의 0.5 중량% 아래로 유지되는 주어진 보관 조건 (예컨대, -20℃, 4℃, 또는 주변 온도) 하에서의 기간을 연장시키는; 또는 생체내에서 안정성을 증가시키는) 담체를 포함하는 조성물에 제공될 수 있다. 이러한 담체의 비제한적인 실험은 폴리(락트산) (PLA) 마이크로스피어, 폴리(D,L-락틱-코글리

콜릭-산) (PLGA) 마이크로스피어, 리포솜, 미셀, 역미셀, 지질 코클레이트, 및 지질 미세소관을 포함한다.

- [0151] 인간-TRKB-표적화 시약의 세포 또는 비인간 동물로의 도입을 허용하기 위한 다양한 방법 및 조성물이 본원에 제공된다. 핵산을 다양한 세포 유형으로 도입하는 방법은 알려져 있고, 예를 들어, 안정적인 트랜스펙션 방법, 일시적인 트랜스펙션 방법, 및 바이러스-매개된 방법을 포함한다.
- [0152] 핵산 서열을 세포로 도입하기 위한 프로토콜뿐만 아니라 트랜스펙션 프로토콜은 달라질 수 있다. 비제한적인 트랜스펙션 방법으로 리포솜; 나노입자; 인산 칼슘 (Graham *et al.* (1973) *Virology* 52 (2): 456-67, Bacchetti *et al.* (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74 (4): 1590-4, 및 Kriegler, M (1991). *Transfer and Expression: A Laboratory Manual*. New York: W. H. Freeman and Company. pp. 96-97); 덴드리머; 또는 DEAE-텍스트란 또는 폴리에틸렌이민과 같은 양이온 중합체를 사용하는 화학물질-기반 트랜스펙션 방법을 들 수 있다. 비-화학물질 방법은 전기천공법, 초음파처리법, 및 광학 트랜스펙션을 들 수 있다. 입자-기반 트랜스펙션은 유전자 총, 또는 자석-보조 트랜스펙션의 사용을 포함한다 (Bertram (2006) *Current Pharmaceutical Biotechnology* 7, 277-28). 바이러스 방법 또한 트랜스펙션을 위해 사용될 수 있다.
- [0153] 인간-TRKB-표적화 시약의 세포로의 도입은 또한 전기천공법에 의해, 세포질내 주입에 의해, 바이러스 감염에 의해, 아데노바이러스에 의해, 아데노 관련 바이러스에 의해, 렌티바이러스에 의해, 레트로바이러스에 의해, 트랜스펙션에 의해, 지질-매개된 트랜스펙션에 의해, 또는 뉴클레오펙션(nucleofection)에 의해 매개될 수 있다. 뉴클레오펙션은 핵산 기질이 세포질로뿐만 아니라 핵 막을 통해 핵 안으로 전달되는 것을 가능하게 하는 개선된 전기천공 기술이다. 더불어, 본원에 개시된 방법에서 뉴클레오펙션의 사용은 전형적으로 정규 전기천공법보다 훨씬 적은 수 (예컨대, 정규 전기천공법에 의한 7백만개와 비교하여 단지 약 2백만개)의 세포를 필요로 한다. 한 실례에서, 뉴클레오펙션은 LONZA[®] NUCLEOFECTOR[™] 시스템을 사용하여 수행된다.
- [0154] 인간-TRKB-표적화 시약의 세포 (예컨대, 접합체)로의 도입은 또한 마이크로주입에 의해 달성될 수 있다. 접합체 (즉, 1세포기 배아)에서, 마이크로주입은 모체의 및/또는 모 전핵으로 또는 세포질로 들어갈 수 있다. 만약 마이크로주입이 오직 하나의 전핵으로만 일어난다면, 모 전핵이 그것의 큰 크기로 인해 바람직하다. mRNA의 마이크로주입은 바람직하게는 세포질 안으로 일어나며 (예컨대, mRNA를 번역 기계로 직접 전달하기 위하여), 한편 단백질 또는 단백질 또는 RNA를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 마이크로주입은 핵/전핵 안으로 이루어지는 것이 바람직하다. 대안적으로, 마이크로주입은 핵/전핵 및 세포질 둘 다로의 주입에 의해 수행될 수 있다: 바늘이 먼저 핵/전핵으로 도입될 수 있고 제1 양이 주입될 수 있으며, 1세포기 배아로부터 바늘이 제거되면서 제2 양이 세포질로 주입될 수 있다. 만약 단백질이 세포질에 주입되고, 핵에 대해 표적화될 필요가 있다면, 그것은 핵/전핵으로의 전달을 보장하기 위해 핵 국지화 신호를 포함할 수 있다. 마이크로주입을 수행하기 위한 방법은 잘 알려져 있다. 예컨대, Nagy *et al.* (Nagy A, Gertszenstein M, Vintersten K, Behringer R., 2003, *Manipulating the Mouse Embryo*. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press)를 참조하고; 또한 Meyer *et al.* (2010) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107:15022-15026 및 Meyer *et al.* (2012) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109:9354-9359를 참조한다.
- [0155] 인간-TRKB-표적화 시약을 세포 또는 비인간 동물로 도입하기 위한 다른 방법으로, 예를 들어, 벡터 전달, 입자-매개된 전달, 엑소솜-매개된 전달, 지질 나노입자-매개된 전달, 세포-침투-펩타이드-매개된 전달, 또는 이식 가능한 장치-매개된 전달을 들 수 있다. 특정 실례로서, 핵산 또는 단백질은 폴리(락트산) (PLA) 마이크로스피어, 폴리(D,L-락트-코글리콜릭-산) (PLGA) 마이크로스피어, 리포솜, 미셀, 역미셀, 지질 코클레이트, 또는 지질 미세소관과 같은 담체로 세포 또는 비인간 동물에 도입될 수 있다. 비인간 동물에의 전달의 일부 특정 실례는 유체역학적 전달, 바이러스-매개된 전달 (예컨대, 아데노 관련 바이러스 (AAV)-매개된 전달), 및 지질 나노입자-매개된 전달을 포함한다.
- [0156] 인간-TRKB-표적화 시약의 세포 또는 비인간 동물로의 도입은 유체역학적 전달 (HDD)에 의해 달성될 수 있다. 유체역학적 전달은 생체내에서 세포내 DNA 전달을 위한 방법으로서 출현되었다. 실질 세포에의 유전자 전달을 위해, 필수 DNA 서열만이 선택된 혈관을 통해 주입됨으로써, 현재 바이러스 및 합성 벡터와 관련된 안전성 문제가 제거된다. 혈류로 주입될 때, DNA는 혈액에 접근할 수 있는 상이한 조직의 세포에 도달할 수 있다. 유체역학적 전달은 크고 막-불침투성인 화합물이 실질 세포로 들어가는 것을 방지하는 내피세포와 세포 막의 물리적 장벽을 극복하기 위하여 순환의 비압축성 혈액으로 많은 양의 용액의 신속한 주입에 의해 생성된 힘을 사용한다. DNA의 전달에 더불어, 이 방법은 생체내에서 RNA, 단백질, 및 다른 작은 화합물의 효율적인 세포내 전달에 유용하다. 예컨대, 모든 목적에 대해 그 전문이 본원에 참조로 포함된 Bonamassa *et al.* (2011) *Pharm. Res.* 28(4):694-701을 참조한다.

- [0157] 인간-TRKB-표적화 시약의 도입은 또한 바이러스-매개된 전달, 예컨대 AAV-매개된 전달 또는 렌티바이러스-매개된 전달에 의해 달성될 수 있다. 다른 예시적인 바이러스/바이러스 벡터로 레트로바이러스, 아데노바이러스, 벡시니아 바이러스, 폭스바이러스, 및 헤르페스 단순 바이러스를 들 수 있다. 바이러스는 분할 세포, 비분할 세포, 또는 분할 및 비분할 세포 둘 다를 감염시킬 수 있다. 바이러스는 숙주 계층으로 통합되거나 대안적으로 숙주 계층으로 통합되지 않을 수 있다. 이러한 바이러스는 또한 감소된 면역력을 갖도록 조작될 수 있다. 바이러스는 복제 경합성이거나 복제 결핍성일 수 있다 (예컨대, 비리온 복제 및/또는 포장의 추가적인 회기에 필요한 하나 이상의 유전자가 결핍됨). 바이러스는 일시적인 발현, 장기 지속되는 발현 (예컨대, 적어도 1주, 2주, 1개월, 2개월, 또는 3개월), 또는 영구적인 발현을 유발할 수 있다. 예시적인 바이러스 역가 (예컨대, AAV 역가)는 10^{12} , 10^{13} , 10^{14} , 10^{15} , 및 10^{16} 벡터 계층/mL을 포함한다.
- [0158] ssDNA AAV 계층은 상보하는 DNA 가닥의 합성을 허용하는 2개의 역 말단 반복부가 옆에 있는, 2개의 오픈 리딩 프레임, Rep 및 Cap으로 이루어진다. AAV 이동 플라스미드(transfer plasmid)를 구성할 때, 도입유전자는 2개의 ITR 사이에 배치되고, Rep 및 Cap은 트랜스로 공급될 수 있다. Rep 및 Cap에 더불어, AAV는 아데노바이러스로부터의 유전자를 함유한 헬퍼 플라스미드를 필요로 할 수 있다. 이들 유전자 (E4, E2a, 및 VA)는 AAV 복제를 매개하였다. 예를 들어, 이동 플라스미드, Rep/Cap, 및 헬퍼 플라스미드는 감염성 AAV 입자를 생성하기 위하여 아데노바이러스 유전자 E1+를 함유한 HEK293 세포로 트랜스펙션될 수 있다. 대안적으로, Rep, Cap, 및 아데노바이러스 헬퍼 유전자는 단일 플라스미드로 조합될 수 있다. 유사한 포장 세포 및 방법이 다른 바이러스, 예컨대 레트로바이러스에 대해 사용될 수 있다.
- [0159] AAV의 다중 혈청형이 확인되었다. 이들 혈청형은 그것들이 감염시키는 세포 유형 (즉, 그것의 향성(tropism))이 상이하여서, 특이적 세포 유형의 우선적인 형질도입이 허용된다. CNS 조직에 대한 혈청형은 AAV1, AAV2, AAV4, AAV5, AAV8, 및 AAV9를 포함한다. 심장 조직에 대한 혈청형은 AAV1, AAV8, 및 AAV9를 포함한다. 신장 조직에 대한 혈청형은 AAV2를 포함한다. 폐 조직에 대한 혈청형은 AAV4, AAV5, AAV6, 및 AAV9를 포함한다. 췌장 조직에 대한 혈청형은 AAV8을 포함한다. 광 수용기 세포에 대한 혈청형은 AAV2, AAV5, 및 AAV8을 포함한다. 망막 색소 상피 조직에 대한 혈청형은 AAV1, AAV2, AAV4, AAV5, 및 AAV8을 포함한다. 골격근 조직에 대한 혈청형은 AAV1, AAV6, AAV7, AAV8, 및 AAV9를 포함한다. 간 조직에 대한 혈청형은 AAV7, AAV8, 및 AAV9, 및 특히 AAV8을 포함한다.
- [0160] 향성은 상이한 바이러스 혈청형으로부터의 캡시드 및 계층을 혼합하는 것인 거짓분류(pseudotyping)를 통해 추가로 개선될 수 있다. 예를 들어 AAV2/5는 혈청형 5로부터의 캡시드에 포장된 혈청형 2의 계층을 함유한 바이러스를 나타낸다. 거짓분류된 바이러스의 사용은 형질도입 효율을 개선할 수 있을뿐 아니라, 향성을 변경시킬 수 있다. 상이한 혈청형으로부터 유래된 하이브리드 캡시드는 또한 바이러스 향성을 변경시키기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, AAV-DJ는 8개의 혈청형으로부터의 하이브리드 캡시드를 함유하고 생체내에서 광범위한 세포 유형을 가로지르는 높은 감염성을 나타낸다. AAV-DJ8은 AAV-DJ의 특성을 나타내지만 뇌 흡수가 증강된 또 다른 실례이다. AAV 혈청형은 또한 돌연변이를 통해 개선될 수 있다. AAV2의 돌연변이 변형의 실례는 Y444F, Y500F, Y730F, 및 S662V를 포함한다. AAV3의 돌연변이 변형의 실례는 Y705F, Y731F, 및 T492V를 포함한다. AAV6의 돌연변이 변형의 실례는 S663V 및 T492V를 포함한다. 다른 거짓분류된/변형된 AAV 변이체로는 AAV2/1, AAV2/6, AAV2/7, AAV2/8, AAV2/9, AAV2.5, AAV8.2, 및 AAV/SASTG를 들 수 있다.
- [0161] 도입유전자 발현을 가속화하기 위하여, 자체-상보하는 AAV (scAAV) 변이체가 사용될 수 있다. AAV가 AAV의 단일 가닥 DNA 계층의 상보하는 가닥을 합성하기 위해 세포의 DNA 복제 기계에 좌우되기 때문에, 도입유전자 발현이 지연될 수 있다. 이런 지연을 해결하기 위하여, 감염시에 자발적으로 어닐링될 수 있는 상보하는 서열을 함유하는 scAAV가 사용될 수 있어서, 숙주 세포 DNA 합성에 대한 필요조건이 제거된다.
- [0162] 포장 능력을 증가시키기 위하여, 더 긴 도입유전자는 2개의 AAV 이동 플라스미드 사이에서 분열될 수 있는데, 첫 번째는 3' 스플라이스 도너로 및 두 번째는 5' 스플라이스 억셉터로 분열될 수 있다. 세포의 동시 감염시, 이들 바이러스는 콘카테머(concatemer)를 형성하며, 함께 스플라이싱되고, 전장 도입유전자가 발현될 수 있다. 이것이 더 긴 도입유전자 발현을 허용하긴 하지만, 발현은 덜 효율적이다. 능력을 증가시키기 위한 유사한 방법은 상동 재조합을 이용한다. 예를 들어, 도입유전자는 2개의 이동 플라스미드 사이에서 나누어질 수 있지만 실질적인 서열은 동시발현이 상동 재조합 및 전장 도입유전자의 발현을 유도하도록 중복된다.
- [0163] 인간-TRKB-표적화 시약의 도입은 또한 지질 나노입자 (LNP)-매개된 전달에 의해 달성될 수 있다. 지질 제제는 생물학적 분자의 세포 흡수를 개선시키면서 그것이 분해되는 것으로부터 보호할 수 있다. 지질 나노입자는 분자 내 힘에 의해 서로 물리적으로 회합된 다수의 지질 분자를 포함하는 입자이다. 이들은 마이크로스피어 (단일층

및 다중층 소포, 예컨대 리포솜을 포함함), 에멀션에 분산된 상, 미셀, 또는 현탁액의 내부 상을 포함한다. 이러한 지질 나노입자는 전달을 위해 하나 이상의 핵산 또는 단백질을 캡슐화하기 위해 사용될 수 있다. 양이온성 지질을 함유한 제제는 핵산과 같은 다가음이온을 전달하는 데 유용하다. 포함될 수 있는 다른 지질은 중성 지질 (즉, 대전되지 않은 또는 양성이온성 지질), 음이온성 지질, 트랜스펙션을 증강시키는 헬퍼 지질, 및 나노입자가 생체내에서 존재할 수 있는 시간의 길이를 증가시키는 스텔스 지질 (stealth lipid)이다. 적합한 양이온성 지질, 중성 지질, 음이온성 지질, 헬퍼 지질, 및 스텔스 지질의 실례는 모든 목적에 대해 그 전문이 본원에 참조로 포함된 WO 2016/010840 A1에서 찾을 수 있다. 예시적인 지질 나노입자는 양이온성 지질 및 하나 이상의 다른 구성요소를 포함할 수 있다. 한 실례에서, 다른 구성요소는 콜레스테롤과 같은 헬퍼 지질을 포함할 수 있다. 다른 실례에서, 다른 구성요소는 콜레스테롤과 같은 헬퍼 지질 및 DSPC와 같은 중성 지질을 포함할 수 있다. 또 다른 실례에서, 다른 구성요소는 콜레스테롤과 같은 헬퍼 지질, DSPC와 같은 선택적 중성 지질, 및 S010, S024, S027, S031, 또는 S033과 같은 스텔스 지질을 포함할 수 있다.

[0164] 전달 양식은 면역원성을 감소시키기 위해 선택될 수 있다. 예를 들어, 만약 다중 구성요소가 전달된다면, 그것들은 상이한 양식에 의해 (예컨대, 이중 양식 전달) 전달될 수 있다. 이들 상이한 양식은 상이한 약역학 또는 약동학 특성을 대상 전달된 분자에 부여할 수 있다. 예를 들어, 상이한 양식은 상이한 조직 분포, 상이한 반감기, 또는 상이한 일시적 분포를 초래할 수 있다. 일부 전달 양식 (예컨대, 자율적인 복제 또는 게놈 통합에 의해 세포에서 지속되는 핵산 벡터의 전달)은 분자의 보다 지속적인 발현 및 존재를 초래하는 반면, 다른 전달 양식은 일시적이고 덜 지속적이다 (예컨대, RNA 또는 단백질의 전달).

[0165] 생체내 투여는, 예를 들어, 비경구, 정맥내, 경구, 피하, 동맥내, 두개내, 척수강내, 복강내, 국소적, 비강내, 또는 근육내를 포함한 임의의 적합한 경로에 의한 것일 수 있다. 전신적 투여 양식은, 예를 들어, 경구 및 비경구 경로를 포함한다. 비경구 경로의 실례는 정맥내, 동맥내, 골내, 근육내, 피부내, 피하, 비강내, 및 복강내 경로를 들 수 있다. 특정 실례는 정맥내 주입이다. 비강 주입 및 유리체내 주사가 다른 특정 실례이다. 국소적 투여 양식으로는, 예를 들어, 척수강내, 뇌실내, 뇌실질내 (예컨대, 선조체 (예컨대, 미상 선조체 안으로 또는 피각 안으로), 뇌피질, 중심 전회(precentral gyrus), 해마 (예컨대, 치아 이랑 또는 CA3 영역 안으로), 측두 피질, 편도체, 전방 피질, 시상, 소뇌, 수질, 시상하부, 중뇌덮개(tectum), 피개(tegmentum), 또는 흑질로의 국지화된 뇌실질내 전달), 안구내, 안와내, 결막하, 유리체내, 망막하, 및 경골 경로를 포함한다. 전신적으로 (예를 들어, 정맥내로) 투여될 때와 비교하여 국소적으로 (예를 들어, 뇌실질내로 또는 유리체내로) 투여될 때 유의하게 더 적은 양 (전신적 접근법과 비교하여)의 구성요소가 효과를 발휘할 수 있다. 국소적 투여 양식은 또한 치료적으로 효과적인 양의 구성요소가 전신적으로 투여될 때 발생할 수 있는 잠재적으로 독성인 부작용의 발생을 감소 또는 제거할 수 있다. 특정 실례에서, 인간-TRKB-표적화 시약은 직접 해마 주사, 피하 주사, 또는 유리체내 주사를 통해 투여된다.

[0166] 인간-TRKB-표적화 시약을 포함하는 조성물은 하나 이상의 생리적으로 및 제약학적으로 허용되는 담체, 희석제, 부형제 또는 보조제를 사용하여 제제화될 수 있다. 제제는 선택된 투여 경로에 좌우될 수 있다. 용어 "제약학적으로 허용되는"은 담체, 희석제, 부형제 또는 보조제가 제제의 다른 성분과 부합하고 그것의 수령체에 실질적으로 유해하지 않은 것을 의미한다.

[0167] 투여 빈도 및 복용량의 수는 다른 요인들 중에서도 인간-TRKB-표적화 시약의 반감기 및 투여 경로에 따라 좌우될 수 있다. 인간-TRKB-표적화 시약의 세포 또는 비인간 동물로의 도입은 한 번에 또는 일정 기간 동안 여러 번 수행될 수 있다. 예를 들어, 도입은 일정 기간 동안 적어도 2회, 일정 기간 동안 적어도 3회, 일정 기간 동안 적어도 4회, 일정 기간 동안 적어도 5회, 일정 기간 동안 적어도 6회, 일정 기간 동안 적어도 7회, 일정 기간 동안 적어도 8회, 일정 기간 동안 적어도 9회, 일정 기간 동안 적어도 10회, 일정 기간 동안 적어도 11회, 일정 기간 동안 적어도 12회, 일정 기간 동안 적어도 13회, 일정 기간 동안 적어도 14회, 일정 기간 동안 적어도 15회, 일정 기간 동안 적어도 16회, 일정 기간 동안 적어도 17회, 일정 기간 동안 적어도 18회, 일정 기간 동안 적어도 19회, 또는 일정 기간 동안 적어도 20회 수행될 수 있다.

[0168] **E. 생체내에서 또는 생체외에서 인간-TRKB-표적화 시약의 전달, 활성화, 또는 효능의 측정**

[0169] 본원에 개시된 방법은 추가로 인간-TRKB-표적화 시약의 활성을 검출 또는 측정하는 단계를 포함할 수 있다. 이러한 시약의 활성화 (예컨대, 작용물질 활성화 또는 억제제 활성화)를 측정하는 것은 TRKB 활성을 측정하는 것을 포함할 수 있다. TRKB 활성화는 임의의 공지된 수단에 의해 측정될 수 있다. 예를 들어, TRKB 인산화가 (예컨대, 뇌 또는 뉴런에서) 평가될 수 있고, TRKB에 의한 PI3K/AKT 및 MAPK/ERK와 같은 하류 경로의 활성화가 (예컨대, 뇌 또는 뉴런, 예컨대 일차 대뇌피질 뉴런에서) 평가될 수 있으며, 또는 세포 생존율 (예컨대, 뉴런 세포 생존율,

예컨대 망막 신경절 세포 생존율)이 평가될 수 있다. 예를 들어, 인산화 또는 하류 신호전달 경로의 활성화는 투약 후 15분, 30분, 1시간, 2시간, 4시간, 또는 18시간 후에 평가될 수 있다. TRKB 인산화, 하류 신호전달 경로의 활성화, 또는 세포 생존율의 증가는 TRKB 활성화의 표시일 수 있는 반면, 감소는 TRKB 억제의 표시일 수 있다.

[0170] 비인간 동물에서, 평가 단계는 체중, 체성분, 대사, 및 운동 중 하나 이상 또는 전부를 대조군-비인간 동물과 관련하여 (예컨대, 투약 후 12시간, 24시간, 48시간, 72시간, 96시간, 또는 120시간 췌에) 평가하는 것을 포함할 수 있다. 예컨대, Lin et al. (2008) *PLoS ONE* 3(4):e1900; Rios et al. (2013) *Trends in Neurosciences* 36(2):83-90; 및 Zorner et al. (2003) *Biol. Psychiatry* 54:972-982 (이들은 각각 모든 목적에 대해 그 전문이 본원에 참조로 포함됨)를 참조한다. 체성분의 변화를 평가하는 것은, 예를 들어, 제지방 및/또는 지방량을 평가하는 것을 포함할 수 있다. 대사의 변화를 평가하는 것은, 예를 들어, 식량 소비 및/또는 물 소비의 변화를 평가하는 것을 포함할 수 있다. 체중, 지방량, 제지방, 음식 섭취, 및 물 섭취의 감소는 TRKB 활성화의 표시일 수 있는 반면, 증가는 TRKB 억제의 표시일 수 있다. 운동의 증가는 TRKB 활성화의 표시일 수 있는 반면, 감소는 TRKB 억제의 표시일 수 있다.

[0171] 평가 단계는 신경보호 활성을 평가하는 것을 포함할 수 있다. 한 실례로서, 세포 생존율이 비인간 동물에서 평가될 수 있다. 예를 들어, 설치류 망막 신경절 세포 (RGC)는 신경보호 치료법을 검정하기 위해서뿐만 아니라 축삭 병변과 관련된 신경퇴행 과정을 연구하기 위해 종종 사용된다. 예컨대, Nadal-Nicolas et al. (2009) *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 50(8):3860-3868 (모든 목적에 대해 그 전문이 본원에 참조로 포함됨)을 참조한다. 망막 신경절 세포 생존율/생존 능력은 대조군 비인간 동물과 관련하여 인간-TRKB 표적화 시약으로 처리 후에 (예컨대, 시신경 손상 후 완전한 시신경 절단 모델에서) 평가될 수 있다. 예를 들어, 망막 신경절 세포 생존율/생존 능력은 시신경 손상 후에 완전한 시신경 절단 모델에서 평가될 수 있다. 예컨대, Nadal-Nicolas et al. (2009) *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 50(8):3860-3868 (모든 목적에 대해 그 전문이 본원에 참조로 포함됨)을 참조한다. 또 다른 실례로서, 망막 신경절 세포 생존율/생존 능력은 시신경 크러시 모델에서 평가될 수 있다. 이 모델에서, 시신경에 대한 크러시 손상은 점진적인 망막 신경절 세포 세포자멸사로 이어진다. 예컨대, Tang et al. (2011) *J. Vis. Exp.* 50:2685 (모든 목적에 대해 그 전문이 본원에 참조로 포함됨)를 참조한다. 망막 신경절 세포 생존율/생존 능력은, 예를 들어, by measuring 망막 신경절 세포 밀도를 (예컨대, 절개되고 망막 신경절 세포에 대해 염색된 망막에서) 측정함으로써 평가될 수 있다. 증가된 생존율/생존 능력은 TRKB 활성화의 표시일 수 있는 반면, 감소된 생존율/생존 능력은 TRKB 억제의 표시일 수 있다.

[0172] 만약 인간-TRKB-표적화 시약이 게놈 편집 시약이라면, 측정 단계는 변형에 대해 인간화된 *TRKB* 유전자좌를 평가하는 것을 포함할 수 있다. 표적화된 유전자 변형을 가지는 세포를 확인하기 위해 다양한 방법이 사용될 수 있다. 스크리닝은 모 염색체의 대립유전자의 변형 (MOA)을 평가하기 위한 정량적인 검정을 포함할 수 있다. 예를 들어, 정량적 검정은 정량적 PCR, 예컨대 실시간 PCR (qPCR)을 통해 수행될 수 있다. 실시간 PCR은 표적 유전자좌를 인식하는 제1 프라이머 세트 및 비표적화 참조 유전자좌를 인식하는 제2 프라이머 세트를 활용한다. 프라이머 세트는 증폭된 서열을 인식하는 형광 프로브를 포함할 수 있다. 적합한 정량적 검정의 다른 실례는 형광-매개된 인시튜 혼성화 (FISH), 비교용 게놈 혼성화, 등은 DNA 증폭, 고정된 프로브(들)에 대한 정량적 혼성화, INVADER[®] 프로브, TAQMAN[®] Molecular Beacon 프로브, 또는 ECLIPSE[™] 프로브 기술을 들 수 있다 (예컨대, 모든 목적에 대해 그 전문이 본원에 참조로 포함된 US 2005/0144655 참조). 차세대 서열분석 (NGS)이 또한 스크리닝에 사용될 수 있다. 차세대 서열분석은 또한 "NGS" 또는 "대규모 병렬 서열분석" 또는 "고처리량 서열분석"으로서 언급될 수 있다. NGS는 표적화된 유전자 변형의 정확한 성질 및 그것이 세포 유형 또는 조직 유형 또는 장기 유형을 가로질러 일관되는지를 규정하기 위해 MOA 검정에 더불어 스크리닝 도구로서 사용될 수 있다.

[0173] 비인간 동물에서 평가는 임의의 조직 또는 장기로부터의 임의의 세포 유형에서 이루어질 수 있다. 예를 들어, 평가는 동일한 조직 또는 장기 (예컨대, 뇌)로부터의 다중 세포 유형에서 또는 조직 또는 장기 (예컨대, 해마 및 선조체) 내의 다중 위치로부터의 세포에서 이루어질 수 있다. 이것은 표적 조직 또는 장기 내의 어떤 세포 유형이 표적화되는지 또는 조직 또는 장기의 어떤 부분이 TRKB-표적화 시약에 의해 도달되는지에 대한 정보를 제공할 수 있다. 다른 실례로서, 평가는 조직의 다중 유형에서 또는 다중 장기에서 이루어질 수 있다. 특정 조직, 장기, 또는 세포 유형이 표적화되는 방법에서, 이것은 어떻게 효과적으로 그 조직 또는 장기가 표적화되는지 및 다른 조직 또는 장기에서 표적 외 효과가 있는지의 여부에 대한 정보를 제공할 수 있다.

[0174] 만약 시약이 인간화된 *TRKB* 유전자좌를 비활성화시키거나, 인간화된 *TRKB* 유전자좌의 발현에 영향을 미치거나, 또는 인간화된 *TRKB* mRNA의 번역을 방지하기 위해 설계된다면, 측정 단계는 인간화된 *TRKB* mRNA 또는 단백질 발

현을 평가하는 것을 포함할 수 있다. 이런 측정은 뇌 또는 특정 세포 유형 (예컨대, 망막 신경절 세포와 같은 뉴런) 내에서 이루어질 수 있다.

[0175] **IV. 인간화된 TRKB 유전자좌를 포함하는 비인간 동물의 제조 방법**

[0176] 본원의 다른 곳에서 개시된 바와 같은 인간화된 TRKB 유전자좌를 포함하는 비인간 동물 계놈, 비인간 동물 세포, 또는 비인간 동물을 제조하기 위한 다양한 방법이 제공된다. 유전자 변형된 유기체를 제조하기 위한 임의의 편리한 방법 또는 프로토콜은 이러한 유전자 변형된 비인간 동물을 제조하기에 적합하다. 예컨대, 각각 모든 목적에 대해 그 전문이 본원에 참조로 포함된 Cho *et al.* (2009) *Current Protocols in 세포 Biology* 42:19.11:19.11.1-19.11.22 및 Gama Sosa *et al.* (2010) *뇌 Struct. Funct.* 214(2-3):91-109를 참조한다. 이러한 유전자 변형된 비인간 동물은, 예를 들어, 표적화된 *TrkB* 유전자좌에서 유전자 녹-인(knock-in)을 통해 생성될 수 있다.

[0177] 예를 들어, 인간화된 TRKB 유전자좌를 포함하는 비인간 동물의 제조 방법은: (1) 만능 세포의 계놈을 인간화된 TRKB 유전자좌를 포함하도록 변형시키는 단계; (2) 인간화된 TRKB 유전자좌를 포함하는 유전자 변형된 만능 세포를 확인 또는 선택하는 단계; (3) 유전자 변형된 만능 세포를 비인간 동물 숙주 배아로 도입하는 단계; 및 (4) 숙주 세포를 대리 모체에 이식하고 임신시키는 단계를 포함할 수 있다. 예를 들어, 인간화된 TRKB 유전자좌를 포함하는 비인간 동물의 제조 방법은: (1) 만능 세포의 계놈을 인간화된 TRKB 유전자좌를 포함하도록 변형시키는 단계; (2) 인간화된 TRKB 유전자좌를 포함하는 유전자 변형된 만능 세포를 확인 또는 선택하는 단계; (3) 유전자 변형된 만능 세포를 비인간 동물 숙주 배아로 도입하는 단계; 및 (4) 숙주 배아를 대리 모체에서 임신시키는 단계를 포함할 수 있다. 선택적으로, 변형된 만능 세포 (예컨대, 비-인간 ES 세포)를 포함하는 숙주 배아는 이식되기 전의 배반포 단계가 F0 비인간 동물을 생성하기 위해 대리 모체에 이식되고 임신될 때까지 인큐베이션될 수 있다. 대리 모체는 그런 후 인간화된 TRKB 유전자좌를 포함하는 F0 세대 비인간 동물을 생성할 수 있다.

[0178] 방법은 변형된 표적 계놈 유전자좌를 가지는 세포 또는 동물을 확인하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 다양한 방법이 표적화된 유전자 변형을 가지는 세포 및 동물을 확인하기 위해 사용될 수 있다.

[0179] 계놈의 변형 단계는, 예를 들어, 본원에서 개시된 인간화된 TRKB 유전자좌를 포함하도록 *rkB* 유전자좌를 변형시키기 위하여 외인성 수복 주형 (예컨대, 표적화 벡터)을 활용할 수 있다. 한 실례로서, 표적화 벡터는 내인성 *TrkB* 유전자좌 (예컨대, 내인성 비인간 동물 *TrkB* 유전자좌)에서 인간화된 TRKB 유전자를 생성하기 위한 것일 수 있고, 이때 표적화 벡터는 내인성 *TrkB* 유전자좌에서 5' 표적 서열을 표적화하는 5' 상동성 팔 및 내인성 *TrkB* 유전자좌에서 3' 표적 서열을 표적화하는 3' 상동성 팔을 포함한다. 외인성 수복 주형은 또한 *TrkB* 유전자좌에서 통합될 DNA의 분절을 포함한 핵산 삽입물을 포함할 수 있다. 핵산 삽입물의 *TrkB* 유전자좌에서의 통합은 관심의 핵산 서열의 *TrkB* 유전자좌에서의 첨가, 관심의 핵산 서열의 *TrkB* 유전자좌에서의 삭제, 또는 관심의 핵산 서열의 *TrkB* 유전자좌에서의 대체 (즉, 삭제 및 삽입)를 초래할 수 있다. 상동성 팔은 인간화된 TRKB 유전자좌를 생성하기 위하여 인간 TRKB 서열을 포함하는 삽입물 핵산의 옆에 있을 수 있다 (예컨대, 내인성 *TrkB* 유전자좌의 분절을 삭제하고 병렬상동 인간 TRKB 서열로 대체하기 위하여).

[0180] 외인성 수복 주형은 비상동성-단부-결합-매개된 삽입 또는 상동성 재조합을 위한 것일 수 있다. 외인성 수복 주형은 데옥시리보핵산 (DNA) 또는 리보핵산 (RNA)을 포함할 수 있는데, 이것들은 단일 가닥 또는 이중 가닥일 수 있고, 선형 또는 원형 형태로 있을 수 있다. 예를 들어, 수복 주형은 단일 가닥 올리고데옥시뉴클레오타이드 (ssODN)일 수 있다.

[0181] 외인성 수복 주형은 또한 표적화되지 않은 내인성 *TrkB* 유전자좌에 존재하지 않는 이중 서열을 포함할 수 있다. 예를 들어, 외인성 수복 주형은 선택 카세트, 예컨대 재조합효소 인식 부위가 옆에 있는 선택 카세트를 포함할 수 있다.

[0182] 일부 외인성 수복 주형은 상동성 팔을 포함한다. 만약 외인성 수복 주형 산이 또한 핵산 삽입물을 포함한다면, 상동성 팔은 핵산 삽입물 옆에 있을 수 있다. 용이한 언급을 위하여, 상동성 팔은 본원에서 5' 및 3' (즉, 상류 및 하류) 상동성 팔로서 언급된다. 이런 용어는 외인성 수복 주형 내에서 핵산 삽입물에 대한 상동성 팔의 상대적 위치에 관한 것이다. *TrkB* 유전자좌 내의 영역에 상응하는 5' 및 3' 상동성 팔은 각각 본원에서 "5' 표적 서열" 및 "3' 표적 서열"로서 언급된다.

[0183] 두 영역이 상동성 재조합 반응에 대한 기질로서 작용하기 위하여 서로에 대해 충분한 수준의 서열 동일성을 공유할 때 상동성 팔 및 표적 서열은 서로에 대해 "상응한다" 또는 "상응하는"것으로 말한다. 용어 "상동성"은 상

응하는 서열에 대해 동일하거나 서열 동일성을 공유하는 DNA 서열을 포함한다. 주어진 표적 서열과 외인성 수복 주형에서 발견되는 상응하는 상동성 팔 사이의 서열 동일성은 상동성 재조합이 일어나는 것을 허용하는 임의의 정도의 서열 동일성일 수 있다. 예를 들어, 외인성 수복 주형 (또는 그것의 단편)의 상동성 팔과 표적 서열 (또는 그것의 단편)에 의해 공유된 서열 동일성의 양은 적어도 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 서열 동일성이어서, 서열은 상동성 재조합을 진행하게 된다. 더욱이, 상동성 팔과 상응하는 표적 서열 사이의 상동성의 상응하는 영역은 상동성 재조합을 촉진하기에 충분한 임의의 길이의 것일 수 있다. 일부 표적화 벡터에서, 내인성 *TrkB* 유전자좌에서의 의도된 돌연변이는 상동성 팔이 옆에 있는 삽입물 핵산에 포함된다.

[0184] 1세포기 배아 이외의 세포에서, 외인성 수복 주형은 "큰 표적화 벡터" 또는 "LTVEC"일 수 있고, 그것은 세포에서 상동성 재조합을 수행하기 위해 의도된 다른 접근법에 의해 전형적으로 사용된 것들보다 큰 핵산 서열에 상응하고 그것으로부터 유래되는 상동성 팔을 포함하는 표적화 벡터를 포함한다. LTVEC는 또한 세포에서 상동성 재조합을 수행하기 위해 의도된 다른 접근법에 의해 전형적으로 사용된 것들보다 큰 핵산 서열을 가지는 핵산 삽입물을 포함하는 표적화 벡터를 포함한다. 예를 들어, LTVEC는 그것의 크기 제한으로 인해 전통적인 플라스미드-기저 표적화 벡터에 의해 수용될 수 없는 큰 유전자좌의 변형을 가능하게 만든다. 예를 들어, 표적화된 유전자좌는 종래 방법을 사용하여 표적화될 수 없는 또는 부정확하게만 또는 뉴클레아제 작용제 (예컨대, Cas 단백질)에 의해 유도된 Nick 또는 이중 가닥 절단의 부재 하에 충분히 낮은 효율로만 표적화될 수 있는 세포의 유전자좌일 수 있다 (즉, 5' 및 3' 상동성 팔이 상기 유전자좌에 상응할 수 있다). LTVEC는 임의의 길이를 가질 수 있고 길이는 전형적으로 적어도 10 kb이다. LTVEC에서 5' 상동성 팔과 3' 상동성 팔의 총 합은 전형적으로 10 kb이다.

[0185] 스크리닝 단계는, 예를 들어, 모 염색체의 대립유전자의 변형 (MOA)을 평가하기 위한 정량적 검정을 포함할 수 있다. 예를 들어, 정량적 검정은 정량적 PCR, 예컨대 실시간 PCR (qPCR)을 통해 수행될 수 있다. 실시간 PCR은 표적 유전자좌를 이식하는 제1 프라이머 세트 및 비표적화된 참조 유전자좌를 인식하는 제2 프라이머 세트를 활용할 수 있다. 프라이머 세트는 증폭된 서열을 인식하는 형광 프로브를 포함할 수 있다.

[0186] 적합한 정량적 검정의 다른 실례는 형광-매개된 제자리 혼성화 (FISH), 비교 게놈 혼성화, 등은 DNA 증폭, 고정된 프로브(들)에 대한 정량적 혼성화, INVADER[®] 프로브, TAQMAN[®] Molecular Beacon 프로브, 또는 ECLIPSE[™] 프로브 기술을 포함한다 (예컨대, 모든 목적에 대해 그 전문이 본원에 참조로 포함된 US 2005/0144655 참조).

[0187] 적합한 만능 세포의 실례는 배아 줄기 (ES) 세포 (예컨대, 마우스 ES 세포 또는 래트 ES 세포)이다. 변형된 만능 세포는, 예를 들어, (a) 세포에, 예를 들어 5' 및 3' 표적 부위에 상응하는 5' 및 3' 상동성 팔이 옆에 있는 삽입물 핵산을 포함하는 하나 이상의 외인성 도너 핵산 (예컨대, 표적화 벡터)을 도입하는 단계, 여기서 삽입물 핵산은 인간화된 *TRKB* 유전자좌를 생성하기 위해 인간 *TRKB* 서열을 포함하는 것인 단계; 및 (b) 그것의 게놈에 내인성 *TrkB* 유전자좌에서 통합된 삽입물 핵산을 포함하는 적어도 하나의 세포를 확인하는 단계 (즉, 인간화된 *TRKB* 유전자좌를 포함하는 적어도 하나의 세포를 확인하는 단계)에 의한 재조합을 통해 생성될 수 있다. 변형된 만능 세포는, 예를 들어, (a) 세포에 5' 및 3' 표적 부위에 상응하는 5' 및 3' 상동성 팔이 옆에 있는 삽입물 핵산을 포함하는 하나 이상의 표적화 벡터를 도입하는 단계, 여기서 삽입물 핵산은 인간화된 *TRKB* 유전자좌를 포함하는 것인 단계; 및 (b) 그것의 게놈에 표적 게놈 유전자좌에서 통합된 삽입물 핵산을 포함하는 적어도 하나의 세포를 확인하는 단계에 의한 재조합을 통해 생성될 수 있다.

[0188] 대안적으로, 변형된 만능 세포는 (a) 세포에: (i) 내인성 *TrkB* 유전자좌 내의 표적 부위에서 Nick 또는 이중 가닥 절단을 유도하는 뉴클레아제 작용제; 및 (ii) 뉴클레아제 표적 부위에 충분히 가까운 곳에 위치한 5' 및 3' 표적 부위에 상응하는 5' 및 3' 상동성 팔이 옆에 있는 삽입물 핵산을 선택적으로 포함하는 하나 이상의 외인성 도너 핵산 (예컨대, 표적화 벡터), 여기서 삽입물 핵산은 인간화된 *TRKB* 유전자좌를 생성하기 위해 인간 *TRKB* 서열을 포함하는 것인 하나 이상의 외인성 도너 핵산을 도입하는 단계; 및 (c) 그것의 게놈에 내인성 *TrkB* 유전자좌에서 통합된 삽입물 핵산을 포함하는 적어도 하나의 세포를 확인하는 단계 (즉, 인간화된 *TRKB* 유전자좌를 포함하는 적어도 하나의 세포를 확인하는 단계)에 의해 생성될 수 있다. 대안적으로, 변형된 만능 세포는 (a) 세포에: (i) 표적 게놈 유전자좌 내의 인식 부위에서 Nick 또는 이중 가닥 절단을 유도하는 뉴클레아제 작용제; 및 (ii) 인식 부위에 충분히 가까운 곳에 위치한 5' 및 3' 표적 부위에 상응하는 5' 및 3' 상동성 팔이 옆에 있는 삽입물 핵산을 포함하는 하나 이상의 표적화 벡터, 여기서 삽입물 핵산은 인간화된 *TRKB* 유전자좌를 포함하는 것인 표적화 벡터를 도입하는 단계; 및 (c) 표적 게놈 유전자좌에서 변형 (예컨대, 삽입물 핵산의 통합)을 포함하는 적어도 하나의 세포를 확인하는 단계에 의해 생성될 수 있다. 원하는 인식 부위에 Nick 또는 이중 가닥 절단

을 유도하는 임의의 뉴클레아제 작용제가 사용될 수 있다. 적합한 뉴클레아제의 실례는 전사 활성화제-유사 이펙터 뉴클레아제 (TALEN), 아연-핑거 뉴클레아제 (ZFN), 메가뉴클레아제, 및 규칙적인 간격을 갖는 짧은 회문구조 반복부 (CRISPR)/CRISPR-관련 (Cas) 시스템 (예컨대, CRISPR/Cas9 시스템) 또는 이러한 시스템의 구성요소 (예컨대, CRISPR/Cas9)를 포함한다. 예컨대, 각각 모든 목적에 대해 그 전문이 본원에 참조로 포함된 US 2013/0309670 및 US 2015/0159175를 참조한다.

[0189] 도너 세포는 임의의 단계에서, 예컨대 배반포 단계 또는 전-상실기 (즉, 4 세포 단계 또는 8 세포 단계)에서 숙주 배아에 도입될 수 있다. 생식선을 통해 유전자 변형을 전달할 수 있는 자손이 생성된다. 예컨대, 모든 목적에 대해 그 전문이 본원에 참조로 포함된 미국 특허 제 7,294,754호를 참조한다.

[0190] 대안적으로, 본원의 다른 곳에서 기술된 비인간 동물의 제조 방법은: (1) 만능 세포를 변형시키기 위해 상기 기술된 방법을 사용하여 1세포기 배아를 인간화된 *TRKB* 유전자좌를 포함하도록 변형시키는 단계; (2) 유전자 변형된 배아를 선택하는 단계; 및 (3) 유전자 변형된 배아를 대리 모체에 이식하고 임신시키는 단계를 포함할 수 있다. 대안적으로, 본원의 다른 곳에서 기술된 비인간 동물의 제조 방법은: (1) 만능 세포를 변형시키기 위해 상기 기술된 방법을 사용하여 1세포기 배아를 인간화된 *TRKB* 유전자좌를 포함하도록 변형시키는 단계; (2) 유전자 변형된 배아를 선택하는 단계; 및 (3) 유전자 변형된 배아를 대리 모체에서 임신시키는 단계를 포함할 수 있다. 생식선을 통해 유전자 변형을 전달할 수 있는 자손이 생성된다.

[0191] 핵 전달 기법이 비인간 포유류 동물을 생성하기 위해 사용될 수 있다. 간단히 설명하면, 핵 전달 방법은 (1) 난모세포를 적출하거나 적출된 난모세포를 제공하는 단계; (2) 적출된 난모세포와 조합될 도너 세포 또는 핵을 분리 또는 제공하는 단계; (3) 적출된 난모세포에 세포 또는 핵을 삽입하여 재구성된 세포를 형성하는 단계; (4) 배아를 형성하기 위하여 동물의 자궁에 재구성된 세포를 이식하는 단계; 및 (5) 배아가 발달하도록 허용하는 단계를 포함할 수 있다. 이러한 방법에서, 비록 난모세포가 또한 살아있는 동물의 난관 및/또는 난소로부터도 분리될 수 있긴 하지만, 난모세포는 일반적으로 죽은 동물로부터 회수된다. 난모세포는 적출 전에 잘 알려져 있는 다양한 배지에서 성숙될 수 있다. 난모세포의 적출은 많은 잘 알려져 있는 방식으로 수행될 수 있다. 재구성된 세포를 형성하기 위한 도너 세포 또는 핵의 적출된 난모세포로의 삽입은 융합 전 투명대(zona pellucida) 아래에서 도너 세포의 미세주입에 의한 것일 수 있다. 융합은 접촉/융합 평면을 가로지르는 DC 전기 펄스의 적용 (전기융합)에 의해, 세포의 융합-촉진 화학물질, 예컨대 폴리에틸렌 글리콜에의 노출에 의해, 또는 비활성화된 바이러스, 예컨대 센다이 바이러스에 의해 유도될 수 있다. 재구성된 세포는 핵 도너 및 수령체 난모세포의 융합 전에, 중에, 및/또는 후에 전기적 및/또는 비전기적 수단에 의해 활성화될 수 있다. 활성화 방법은 전기 펄스, 화학적으로 유도된 충격, 정자에 의한 침투, 난모세포에서 이가 양이온의 수준의 증가, 및 난모세포에서 세포 단백질의 인산화의 감소 (키나아제 억제제에 의한)를 포함한다. 활성화된 재구성된 세포, 또는 배아는 잘 알려져 있는 배지에서 배양된 후 동물의 자궁에 전달될 수 있다. 예컨대, 각각 모든 목적에 대해 그 전문이 본원에 참조로 포함된 US 2008/0092249, WO 1999/005266, US 2004/0177390, WO 2008/017234, 및 미국 특허 제 7,612,250호를 참조한다.

[0192] 본원에 제공된 다양한 방법은 유전자 변형된 F0 동물의 세포가 인간화된 *TRKB* 유전자좌를 포함하는 유전자 변형된 비-인간 F0 동물의 생성을 허용한다. F0 동물을 생성하기 위해 사용된 방법에 따라, 인간화된 *TRKB* 유전자좌를 가지는 F0 동물 내의 세포 수는 달라질 것으로 인지된다. 예를 들어, VELOCIMOUSE[®] 방법을 통해 상응하는 유기체로부터의 전-상실기 배아 (예컨대, 8-세포 단계 마우스 배아)로의 도너 ES 세포의 도입은 F0 동물의 더 큰 백분율의 세포 집단이 표적화된 유전자 변형을 포함하는 관심의 뉴클레오타이드 서열을 가지는 세포를 포함하는 것을 허용한다. 예를 들어, 비인간 F0 동물에 기여하는 세포의 적어도 50%, 60%, 65%, 70%, 75%, 85%, 86%, 87%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%가 표적화된 변형을 가지는 세포 집단을 포함할 수 있다.

[0193] 유전자 변형된 F0 동물의 세포는 인간화된 *TRKB* 유전자좌에 대해 이형접합성이거나 또는 인간화된 *TRKB* 유전자좌에 대해 동형접합성일 수 있다.

[0194] 상기 또는 하기에서 인용된 모든 특허 출원, 웹사이트, 다른 출판물, 등록 번호 등은 각각의 별개의 항목이 구체적으로 및 개별적으로 참조로 포함된 것으로 표시된 것과 같은 정도로 모든 목적에 대해 그 전문이 참조로 포함된다. 만약 상이한 버전의 서열이 상이한 시점의 등록 번호와 관련된다면, 본 출원의 유효 출원일의 등록 번호와 관련된 버전을 의미한다. 유효 출원일은 실제 출원일 또는 적용된다면 등록 번호를 언급하는 우선권 출원의 출원일보다 앞선 것을 의미한다. 마찬가지로, 만약 상이한 버전의 출판물, 웹사이트 등이 상이한 시점에 공개된다면, 다르게 표시되지 않는 한, 출원의 유효 출원일에 가장 최근에 공개된 버전을 의미한다. 발명의 임의

의 특징, 단계, 요소, 구체예, 또는 측면은 구체적으로 다르게 표시되지 않는 한 임의의 다른 것과 함께 사용될 수 있다. 비록 본 발명이 명료성과 이해를 목적으로 예시 및 실례에 의해 어느 정도 상세하게 기술되었지만, 특정 수정 및 변형이 첨부된 청구범위의 범주 내에서 실시될 수 있다는 것이 명백할 것이다.

[0195] **서열의 간단한 설명**

[0196] 첨부되는 서열 목록에 열거된 뉴클레오타이드 및 아미노산 서열은 뉴클레오타이드 염기에 대한 표준 문자 약어, 및 아미노산에 대한 3-문자 코드를 사용하여 제시된다. 뉴클레오타이드 서열은 서열의 5' 단부에서 시작하여 3' 단부를 향해 (즉, 각 라인의 좌측에서 우측으로) 진행되는 표준 관례를 따른다. 각 뉴클레오타이드 서열의 한 가닥만이 제시되지만, 상보하는 가닥이 표시된 가닥에 대한 임의의 참조에 의해 포함되는 것으로 이해된다. 아미노산 서열을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열이 제공될 때, 동일한 아미노산 서열을 암호화하는 그것의 코돈 축퇴성 변이체가 또한 제공되는 것으로 이해된다. 아미노산 서열은 서열의 아미노 말단에서 시작하여 카르복시 말단을 향해 (즉, 각 라인의 좌측에서 우측으로) 진행되는 표준 관례를 따른다.

표 1

서열의 설명.

[0197]

SEQ ID NO	유형	설명
1	단백질	마우스 TRKB/NTRK2 단백질 (P15209-1; NP_001020245.1; NP_001269890.1)
2	단백질	랫트 TRKB/NTRK2 단백질 (Q63604-1; NP_036863.1)
3	단백질	인간 TRKB/NTRK2 단백질 (Q16620-4; NP_006171.2)
4	단백질	마우스/인간 하이브리드 TRKB/NTRK2 단백질
5	단백질	랫트/인간 하이브리드 TRKB/NTRK2 단백질
6	DNA	마우스 <i>TrkB/Ntrk2</i> cDNA (NM_001025074.2)
7	DNA	랫트 <i>TrkB/Ntrk2</i> cDNA (NM_012731.2)
8	DNA	인간 <i>TRKB/NTRK2</i> cDNA (AF410899.1)
9	DNA	마우스 <i>TrkB/Ntrk2</i> CDS (CCDS ID CCDS26573.1)
10	DNA	랫트 <i>TrkB/Ntrk2</i> CDS
11	DNA	인간 <i>TRKB/NTRK2</i> CDS
12	DNA	마우스/인간 <i>TRKB/NTRK2</i> CDS
13	DNA	랫트/인간 <i>TRKB/NTRK2</i> CDS
14	DNA	7138 hU 전방향
15	DNA	7138 hU 프로브(FAM)
16	DNA	7138hU 역방향
17	DNA	7138 hD 전방향
18	DNA	7138 hD 프로브(Cal)
19	DNA	7138 hD 역방향
20	DNA	7138U 전방향
21	DNA	7138U 프로브(FAM)
22	DNA	7138U 역방향
23	DNA	7138D 전방향
24	DNA	7138D 프로브(Cal)
25	DNA	7138D 역방향
26	DNA	rnoTU 전방향
27	DNA	rnoTU 프로브 (FAM)
28	DNA	rnoTU 역방향
29	DNA	rnoTD 전방향
30	DNA	rnoTD 프로브 (Cal-Orange)
31	DNA	rnoTD 역방향
32	DNA	rnoTM 전방향
33	DNA	rnoTM 프로브 (FAM)
34	DNA	rnoTM 역방향
35	DNA	rnoTAU2 전방향
36	DNA	rnoTAU2 프로브(FAM)
37	DNA	rnoTAU2 역방향
38	DNA	rnoTAD 전방향
39	DNA	rnoTAD 프로브(Cal)
40	DNA	rnoTAD 역방향

41	DNA	rnoGU 가이드 표적
42	DNA	rnoGU2 가이드 표적
43	DNA	rnoGD 가이드 표적
44	DNA	rnoGD2 가이드 표적
45	DNA	rnoTGU 전방향
46	DNA	rnoTGU 프로브(FAM)
47	DNA	rnoTGU 역방향
48	DNA	rnoTGD 전방향
49	DNA	rnoTGD 프로브(Cal)
50	DNA	rnoTGD 역방향
51	단백질	마우스 TRKB/NTRK2 신호 펩타이드
52	단백질	마우스 TRKB/NTRK2 세포외 도메인
53	단백질	마우스 TRKB/NTRK2 경막 도메인
54	단백질	마우스 TRKB/NTRK2 세포질 도메인
55	단백질	랫 TRKB/NTRK2 신호 펩타이드
56	단백질	랫 TRKB/NTRK2 세포외 도메인
57	단백질	랫 TRKB/NTRK2 경막 도메인
58	단백질	랫 TRKB/NTRK2 세포질 도메인
59	단백질	인간 TRKB/NTRK2 신호 펩타이드
60	단백질	인간 TRKB/NTRK2 세포외 도메인
61	단백질	인간 TRKB/NTRK2 경막 도메인
62	단백질	인간 TRKB/NTRK2 세포질 도메인
63	DNA	마우스 <i>TrkB/Ntrk2</i> 신호 펩타이드 CDS
64	DNA	마우스 <i>TrkB/Ntrk2</i> 세포외 도메인 CDS
65	DNA	마우스 <i>TrkB/Ntrk2</i> 경막 도메인 CDS
66	DNA	마우스 <i>TrkB/Ntrk2</i> 세포질 도메인 CDS
67	DNA	랫 <i>TrkB/Ntrk2</i> 신호 펩타이드 CDS
68	DNA	랫 <i>TrkB/Ntrk2</i> 세포외 도메인 CDS
69	DNA	랫 <i>TrkB/Ntrk2</i> 경막 도메인 CDS
70	DNA	랫 <i>TrkB/Ntrk2</i> 세포질 도메인 CDS
71	DNA	인간 <i>TRKB/NTRK2</i> 신호 펩타이드 CDS
72	DNA	인간 <i>TRKB/NTRK2</i> 세포외 도메인 CDS
73	DNA	인간 <i>TRKB/NTRK2</i> 경막 도메인 CDS
74	DNA	인간 <i>TRKB/NTRK2</i> 세포질 도메인 CDS
75	단백질	인간 TRKB/NTRK2 단백질 (Q16620-1; NP_001018074.1)
76	DNA	인간 <i>TRKB/NTRK2</i> cDNA (NM_001018064.2)
77	DNA	인간 <i>TRKB/NTRK2</i> CDS (CCDS ID CCDS35050.1)
78-125	DNA/단백질	표 22 및 표 23의 중쇄 및 경쇄 가변 영역 및 선택된 항-TRKB 항체의 CDR

[0198] 실시예

[0199] 실시예 1. 인간화된 *TRKB* 유전자좌를 포함하는 마우스의 생성

[0200] *TRKB*의 74.4 kb의 상응하는 인간 서열로 마우스 TRKB 세포외 도메인을 암호화하는 마우스 *TrkB* 유전자로부터의 65.7 kb 영역을 대체하기 위하여, 마우스 *TrkB* 유전자좌의 41.6 kb를 포함하는 5' 상동성 팔 및 마우스 *TrkB* 유전자좌의 62.4 kb를 포함하는 3' 상동성 팔을 포함하는 큰 표적화 벡터 (LTVEC)를 생성하였다. 마우스 및 인간 TRKB에 대한 정보는 표 2에 제공한다. 큰 표적화 벡터의 생성의 설명은 표 3에 제공한다. VELOCIGENE® 유전자 조작 기술을 사용하는 박테리아 상동 재조합 (BHR)을 통해 박테리아 인공 염색체 (BAC)로부터 유래된 큰 표적화 벡터 (LTVEC)의 생성 및 사용은, 예컨대, US 6,586,251 및 Valenzuela et al. (2003) *Nat. Biotechnol.* 21(6):652-659 (이들은 각각 모든 목적에 대해 그 전문이 본원에 참조로 포함됨)에서 기술된다. 시험관내 어셈블리 방법을 통한 LTVEC의 생성은, 예컨대 US 2015/0376628 및 WO 2015/200334 (이들은 각각 모든 목적에 대해 그 전문이 본원에 참조로 포함됨)에서 기술된다.

표 2

[0201]

마우스 및 인간 TRKB/NTRK2.

	공식적인 기호	NCBI Gene ID	일차 공급원	RefSeq mRNA ID	UniProt ID	게놈 어셈블리	위치
마우스	Ntrk2	18212	MGI:97384	NM_001025074	P15209	GRCm38/mm10	Chr 13: 58,806,569-59, 133,970 (+)
인간	Ntrk2	4915	HGNC:8032	AF410899	Q16620	GRCh38/hg38	Chr 9: 84,669,778 - 85,027,070 (+)

표 3

[0202]

마우스 *TrkB/Ntrk2* 큰 표적화 벡터.

	구성된 게놈	시작	끝	길이 (bp)
5' 마우스 팔	GRCm38/mm10	Chr13: 58,767,209	Chr13: 58,808,821	41,613
인간 삽입물	GRCh38/hg38	Chr9: 84,670,730	Chr9: 84,745,139	74,409
3' 마우스 팔	GRCm38/mm10	Chr13: 58,874,563	Chr13: 58,936,986	62,424

[0203]

구체적으로, 인트론 10의 처음 137개의 염기쌍 및 엑손 2와 10 사이 (즉, 코딩 엑손 1과 엑손 10 사이)의 모든 인트론을 포함한, 엑손 2 (코딩 엑손 1; 아미노산 32로부터 시작하고, 신호 펩타이드를 보존함)에서 시작하여 엑손 10까지의 영역을 마우스 *TrkB* 유전자좌로부터 삭제하였다 (엑손 10 및 11에 의해 암호화된 마우스 경막 도메인은 보존됨). 인트론 10의 처음 177개의 염기쌍 및 엑손 2와 10 사이 (즉, 코딩 엑손 1과 엑손 10 사이)의 모든 인트론을 포함한, 엑손 2/코딩 엑손 1 (아미노산 32부터, 신호 펩타이드 뒤에서 시작됨)부터 엑손 10까지를 포함하는 영역을 삭제된 래트 영역 대신 삽입하였다 (엑손 10 및 11에 의해 암호화된 래트 경막 도메인은 보존됨).

[0204]

마우스 TRKB 신호 펩타이드, 세포외 도메인, 경막 도메인, 및 세포질 도메인에 대한 서열을 각각 SEQ ID NO: 51-54에 제시하고, 상응하는 코딩 서열을 각각 SEQ ID NO: 63-66에 제시한다. 인간 TRKB 신호 펩타이드, 세포외 도메인, 경막 도메인, 및 세포질 도메인에 대한 서열을 각각 SEQ ID NO: 59-62에 제시하고, 상응하는 코딩 서열을 각각 SEQ ID NO: 71-74에 제시한다. 예상된 암호화된 키메라 TRKB 단백질은 마우스 TRKB 경막 및 세포내 도메인, 마우스 TRKB 신호 펩타이드, 및 인간 TRKB 세포외 도메인을 가진다. 도 1을 참조한다. 마우스 및 인간 TRKB 단백질의 정렬을 도 6에 나타낸다. 마우스 및 인간 *TrkB/TRKB* 코딩 서열을 각각 SEQ ID NO: 9 및 11에 제시한다. 마우스 및 인간 TRKB 단백질 서열을 각각 SEQ ID NO: 1 및 3에 제시한다. 예상된 키메라 마우스/인간 *TRKB* 코딩 서열 및 예상된 키메라 마우스/인간 TRKB 단백질에 대한 서열을 각각 SEQ ID NO: 12 및 4에 제시한다.

[0205]

돌연변이 대립유전자를 생성하기 위하여, 큰 표적화 벡터를 F1H4 마우스 배아 줄기 세포에 도입하였다. 항생물 질 선택 후, 콜로니를 선택하여 팽창시키고, TAQMAN[®]에 의해 스크리닝하였다. 도 2를 참조한다. 표 4에 제시한 프라이머 및 프로브를 사용하여, 대립유전자 상실 검정을 수행하여 내인성 래트 대립유전자의 상실을 검출하였고, 대립유전자 획득 검정을 수행하여 인간화된 대립유전자 획득을 검출하였다.

표 4

[0206]

스크리닝 검정.

검정	설명	프라이머/ 프로브	서열
7138 hU	상류 인간 삽입	전방향	AGGTGGGTAGGTCCTGGAAGTG (SEQ ID NO: 14)
		프로브 (FAM)	AATGCTGTCCCAAGAGTGGG (SEQ ID NO: 15)
		역방향	GTCCTGCATCCCTTGCTTTG (SEQ ID NO: 16)
7138 hD	하류 인간 삽입	전방향	ATGTGGGCGTTGTGCAGTCTC (SEQ ID NO: 17)
		프로브 (Cal)	CGTGCAGTGCATTGAACTCAGCA (SEQ ID NO: 18)
		역방향	CTGTGGAGGGACGTGACCAG (SEQ ID NO: 19)

7138U	상류 마우스 LOA	전방향	TCCGCTAGGATTGGTGTACTG (SEQ ID NO: 20)
		프로브 (FAM)	AGCCTTCTCCAGGCATCGTGGCAT (SEQ ID NO: 21)
		역방향	TCCGGGTCAACGCTGTTAG (SEQ ID NO: 22)
7138D	하류 마우스 LOA	전방향	TCCTGCGAGGGTTCTGAC (SEQ ID NO: 23)
		프로브 (Ca)	TGGGTGCTCATATGCCAGAGAAATTGTCA (SEQ ID NO: 24)
		역방향	CGATCTGTGATGGCCTGCTTAC (SEQ ID NO: 25)

[0207] 대립유전자 상실 (LOA) 및 대립유전자 획득 (GOA) 검정을 포함하는 대립유전자 변형 (MOA) 검정은, 예를 들어, US 2014/0178879; US 2016/0145646; WO 2016/081923; 및 Frendewey *et al.* (2010) *Methods Enzymol.* 476:295-307 (이들은 각각 모든 목적에 대해 그 전문이 본원에 참조로 포함됨)에서 기술된다. 대립유전자 상실 (LOA) 검정은 종래의 스크리닝 로직을 반전시키고 돌연변이가 지시된 천연 유전자좌의 게놈 DNA 샘플에서 복사물의 수를 정량화한다. 정확하게 표적화된 이형접합성 세포 클론에서, LOA 검정은 (X 또는 Y 염색체 상에 없는 유전자에 대한) 두 천연 대립유전자 중 하나를 검출하고, 다른 대립유전자는 표적화된 변형에 의해 파괴된다. 동일한 원리를 대립유전자 획득 (GOA) 검정으로서 역으로 적용하여 게놈 DNA 샘플에서 삽입된 표적화 벡터의 복사물 수를 정량화할 수 있다.

[0208] VELOCIMOUSE[®] 방법을 사용하여 F0 마우스를 생성하였다. 예컨대, US 7,576,259; US 7,659,442; US 7,294,754; US 2008/0078000; 및 Poueymirou *et al.* (2007) *Nat. Biotechnol.* 25(1):91-99 (이들은 각각 모든 목적에 대해 그 전문이 본원에 참조로 포함됨)를 참조한다. VELOCIMOUSE[®] 방법에서, 표적화된 마우스 배아 줄기 (ES) 세포를 레이저-보조 조사를 통해 전-상실기 배아, 예컨대, 8-세포기 배아에 주입하고, 이것은 전체적으로 ES-세포-유래의 F0 세대 마우스를 효율적으로 생산한다. 하기에서 기술되는 것과 같이 인간화된 TRKB 마우스에서 수행한 모든 실험을 자기-삭제 선택 카세트가 자기 삭제된 마우스에서 수행하였다.

[0209] **실시예 2. TrkB^{hu/hu} 마우스 (MAID7139)에서의 체중 및 대사에 미치는 H4H9816 및 아이소타입 대조군 REGN1945 항체의 영향의 생체내 비교**

[0210] **실험 과정**

[0211] 체중 및 조성에 미치는 TRKB 작용물질 항체, H4H9816P2의 영향을 측정하기 위하여, 마우스 TRKB 수용체 (TrkB^{hu/hu} 마우스) 대신 인간 TRKB 수용체의 발현에 대해 동형접합성인 마우스의 대사 연구를 단일 피하 항체 주사 후에 수행하였다. 이들 연구를 부분적으로 TrkB 작용물질 및 TrkB-녹아웃 마우스의 이전의 연구를 기반으로 수행하였다. 예컨대, Lin *et al.* (2008) *PLoS ONE* 3(4):e1900; Rios *et al.* (2013) *Trends in Neurosciences* 36(2):83-90; 및 Zorner *et al.* (2003) *Biol. Psychiatry* 54:972-982 (이들은 각각 모든 목적에 대해 그 전문이 본원에 참조로 포함됨)를 참조한다. TrkB^{hu/hu} 마우스 (수컷, 생후 20주령)를 먼저 적응하는 2주 동안 그룹 케이지 하우징으로부터 단독 케이지 하우징으로 옮겼다. 이 기간이 지난 후, 마우스를 대사 케이지 (CLAMS, Columbus Instruments)로 옮겨서 항체 투여 후 음식 및 물 소비, 운동, 에너지 소모, 및 호흡의 변화를 평가하였다. 분말식 정규 차우식을 스프링-로드 스케일 (Mettler Toledo, PL602E) 상의 바닥 챔버에 저장하여 총 차우식 무게의 변화를 통해 식량 소비를 측정하였다. 물은 케이지 상부 분출을 통해 언제든지 접근가능하였고 섭취는 펌프 라인 부피 (Oxymax[®]/CLAMS Liquid Unit)의 변화를 추적함으로써 측정하였다. CLAMPS 대사 케이스를 이들 파라미터 각각에 대해, 연구 과정 전체에서 16 내지 18분 간격으로 연속적으로 측정하였다. 대사 데이터를 OXYMAX[®]/CLAMS 소프트웨어 (Columbus instruments, v5.35)를 사용하여 1회의 완전한 명암 주기를 함유한 24시간 간격으로 단일 측정으로 분석하였고 요약하였다. 2주 동안 케이지에 적응한 후에, TrkB^{hu/hu} 마우스에게 TRKB 작용물질 항체, H4H9816P2, 또는 pH 7.2의 PBS 중의 IgG4 아이소타입 대조군 항체 중 어느 하나를 1회 50 mg/kg 피하 용량으로 제공하였다. 각 마우스의 체성분을 측정하기 위하여, 정량적 자기 공명으로도 언급되는 핵 자기 공명 이완법(Nuclear Magnetic Resonance Relaxometry)을 EchoMRI[™]-500 분석기 (EchoMRI LLC)를 사용하여 수행하였다. 투약 전에, 마우스를 깨끗한 플라스틱 홀더에 놓고 NMR-MRI 장치에 넣어 각 피험체의 체지방, 지방량, 및 수화 상태를 측정하였다. 측정을 마우스당 0.5 내지 3.2분 과정에 걸쳐 수행하였고, 투약 후 대략 120시간 후에 다시 한 번 수행하였다.

[0212] **결과 및 결론**

[0213] 매일 체중 모니터링을 수행하여 H4H9816P2의 단일 피하 주사가 TrkB^{hu/hu} 마우스에서 체중 손실을 유도하였는지를 측정하였다. 투약 전에, 3개의 처리 그룹은 각각 28.39 - 29.85g의 평균 용량-전 체중을 가진 것으로 보아 (표 5) 3개 그룹의 평균 체중에 유의할만한 차이는 없었다. 그러나, 투약 후 48시간에, H4H9816P2-처리된 TrkB^{hu/hu} 마우스가 평균 1.70g, 또는 그들의 용량-전 체중의 5.96%를 손실하였다. 동일한 시점에, 나이브 및 아이소타입 대조군 항체-처리된 TrkB^{hu/hu} 마우스는 그들의 용량-전 체중의 1.79-2.37%를 획득하였다. H4H9816P2-처리된 TrkB^{hu/hu} 마우스는 계속해서 전 연구 과정 내내 체중이 손실되었고, 투약 후 72 및 96시간 후에 이들 마우스는 각각 그들의 용량-전 체중의 평균 8.42% 및 11.80%를 손실하였다. 투약 후 120시간 후에는, H4H9816P2-처리된 TrkB^{hu/hu} 마우스가 그들의 용량-전 체중의 평균 12.67%를 손실하였다. 역으로, 나이브 및 아이소타입 대조군-처리된 TrkB^{hu/hu} 마우스는 연구 기간 내내 용량-전 체중의 어떠한 손실도 나타내지 않았다. H4H9816P2-처리된 TrkB^{hu/hu} 마우스의 체중이 투약 후 48, 72, 96, 및 120시간 후에 나이브 및 아이소타입 대조군 둘 다에 비해 상당히 감소하였기 때문에, TRKB 작용물질 항체 H4H9816P2가 TrkB^{hu/hu} 마우스에서 상당한 체중 손실을 유도하였다고 결정하였다.

표 5

[0214] TRKB 작용물질 항체 H4H9816P2로의 투약 후 TrkB^{hu/hu} 마우스의 체중.

실험 그룹	평균 용량-전 체중 (g) (±SD)	용량 후 24시간 후 평균 체중 (g) (±SD)	용량 후 48시간 후 평균 체중 (g) (±SD)	용량 후 72시간 후 평균 체중 (g) (±SD)	용량 후 96시간 후 평균 체중 (g) (±SD)	용량 후 120시간 후 평균 체중 (g) (±SD)
	용량-전 체중으로부터의 퍼센트 변화 (+/- SD)	용량-전 체중으로부터의 퍼센트 변화 (+/- SD)	용량-전 체중으로부터의 퍼센트 변화 (+/- SD)	용량-전 체중으로부터의 퍼센트 변화 (+/- SD)	용량-전 체중으로부터의 퍼센트 변화 (+/- SD)	용량-전 체중으로부터의 퍼센트 변화 (+/- SD)
나이브 (n=3)	28.85 (+/- 0.81)	29.69 (+/- 0.97)	29.36 (+/- 1.10)	29.32 (+/- 1.29)	29.29 (+/- 1.10)	28.88 (+/- 1.04)
	N/A	+2.91% (+/- 0.62)	+1.79% (+/- 1.62)	+1.65% (+/- 2.24)	+1.54% (+/- 1.22)	+0.10% (+/- 1.05)
아이소타입 대조군 (n=4)	29.21 (+/- 2.68)	30.27 (+/- 2.51)	29.90 (+/- 2.63)	30.08 (+/- 2.69)	29.87 (+/- 2.52)	29.69 (+/- 2.68)
	N/A	+3.61% (+/- 1.68)	+2.37% (+/- 1.50)	+2.98% (+/- 1.09)	+2.25% (+/- 1.56)	+1.65% (+/- 0.81)
H4H9816P2 (n=4)	28.39 (+/- 1.35)	27.87 (+/- 1.29)	26.69 (+/- 0.87)	26.00* (+/- 0.98)	25.04** (+/- 1.03)	24.79** (+/- 1.36)
	N/A	-1.83% (+/- 0.56)	-5.96% (+/- 1.88)	-8.42% (+/- 1.85)	-11.80% (+/- 1.52)	-12.67% (+/- 1.66)

[0215] Tukey 다중 비교 사후 검정을 포함한 이원변량분석에 의해 측정된 통계적 유의성을 표시한다 (*= p<0.05, **=p<0.01, ***=p<0.001, ****= p<0.0001, 아이소타입 대조군 그룹: 50 mg/kg의 아이소타입 대조군 항체가 투여된 TrkB^{hu/hu} 마우스와 비교됨.

[0216] 체성분에 미치는 TRKB 작용물질 항체 H4H9816P2 주사의 영향을 또한 투약 전과 후의 각각의 피험체에 대해 NMR-MRI를 수행함으로써 측정하였다. 투약 전에, TrkB^{hu/hu} 마우스의 처리 그룹은, 각 그룹이 평균 4.19 - 4.75g의 지방량 및 21.32 - 21.70g의 체지방 (표 6)을 가진 것으로 보아, 지방량 또는 체지방에 어떠한 유의한 차이를 나타내지 않았다. 그러나, 항체 투여 후, H4H9816P2로 투여된 TrkB^{hu/hu} 마우스는 연구 과정 동안 그들의 총 체지방량의 평균 48.90%를 손실하였다 (표 6). 나이브 및 아이소타입 대조군 항체-처리된 TrkB^{hu/hu} 마우스는 각각 그들의 용량-전 지방량의 평균 8.49% 및 9.48%를 손실하였고, 이것은 H4H9816P2-처리된 피험체보다는 상당히 더 적었다 (표 6). 나아가, H4H9816P2-처리된 TrkB^{hu/hu} 마우스는 연구 내내 그들의 체지방의 평균 7.84%를 손실하였고, 이것은 나이브 및 아이소타입 대조군 항체-처리된 그룹 각각에 의한 2.41% 및 1.75%의 평균 용량-전 체지방

손실보다 상당히 더 컸다 (표 6). 이와 같이, 기술된 체중 손실은 TrkB^{hu/hu} 마우스에서 TRKB 작용물질 항체 H4H9816P2의 주사 후에 상당한 지방량 손실 및 중간정도의 제지방 손실에 의해 설명될 수 있었다.

표 6

[0217] TRKB 작용물질 항체 H4H9816P2로의 투약 후 TrkB^{hu/hu} 마우스의 체성분.

실험 그룹	평균 용량-전 지방량 (%) (±SD)	투약 후 120시간 후 평균 지방량 (%) (±SD)	투약 후 120시간 후 평균 제지방량 변화 (%) (±SD)	평균 용량-전 제지방 (%) (±SD)	용량 후 120시간 후 평균 제지방 (%) (±SD)	용량 후 120시간 후 평균 제지방 변화 (%) (±SD)
나이브 (n=3)	4.65 (+/- 0.32)	4.27 (+/- 0.55)	-8.49 (+/- 7.18)	21.45 (+/- 0.79)	20.94 (+/- 0.98)	-2.41 (+/- 1.81)
아이소타입 대조군 (n=4)	4.75(+/- 2.98)	4.40 (+/- 2.98)	-9.48 (+/- 6.00)	21.70 (+/- 0.50)	21.32 (+/- 0.35)	-1.75 (+/- 0.98)
H4H9816P2 (n=4)	4.19(+/- 1.15)	2.14 (+/- 0.64)	-48.90**** (+/- 5.06)	21.32 (+/- 1.87)	19.64 (+/- 1.69)	-7.84*** (+/- 0.94)

[0218] Tukey 다중 비교 사후 검정을 포함한 Kruskal-Wallis 일원변량분석에 의해 측정된 통계적 유의성을 표시한다 (*= p<0.05, **=p<0.01, ***=p<0.001, ****= p<0.0001, 아이소타입 대조군 그룹: 50 mg/kg의 아이소타입 대조군 항체가 투여된 TrkB^{hu/hu} 마우스와 비교됨.

[0219] TrkB^{hu/hu} 마우스에서 체중 및 조성에 미치는 TRKB 작용물질 항체 H4H9816P2 주사의 영향을 평가하는 것에 더불어, 급식, 식수, 및 운동 활성을 계속해서 대사 케이지에 의해 측정하였다. 투약 전에, TrkB^{hu/hu} 마우스는 1일당 평균 3.49 - 3.73g의 차우식을 소비하였다. 그러나, 투약 후 24시간 내에, H4H9816P2-처리된 TrkB^{hu/hu} 마우스는 1일당 2.20g의 차우식으로 음식 섭취가 상당히 감소하였다. H4H9816P2-처리된 TrkB^{hu/hu} 마우스에서 음식 섭취의 평균 수준은 나머지 연구 기간 내내 1일당 2.49g의 차우식을 초과하지 않았고, 한편 나이브 및 아이소타입 항체-처리된 TrkB^{hu/hu} 마우스는 1일당 평균 3.62 - 4.07g의 차우식을 꾸준히 소비하였다 (표 7).

[0220] 유사하게, 투약 전 처리 그룹간에 일일 물 소비에 유의할만한 차이는 없었다. TrkB^{hu/hu} 마우스는 각 처리 그룹에서 1일당 평균 4.67 - 5.55 mL의 물을 소비하였다 (표 8). 투약 후에, H4H9816P2-처리된 TrkB^{hu/hu} 마우스는 1일당 물 섭취가 2.05 - 3.24 mL의 물로 감소하였다. 이것은 연구 기간 내내 1일당 4.50 - 5.77 mL의 물을 꾸준히 소비한 나이브 및 아이소타입 대조군 항체-처리된 TrkB^{hu/hu} 마우스보다 상당히 더 낮았다 (표 8). 그러므로, TRKB 작용물질 항체, H4H9816P2의 주사는 나이브 및 아이소타입 대조군 둘 다에 비해 TrkB^{hu/hu} 마우스에서 음식 및 물 섭취 둘 다의 상당한 감소를 초래하는 것으로 나타났다.

표 7

[0221] TRKB 작용물질 항체 H4H9816P2로의 투약 후 TrkB^{hu/hu} 마우스의 식량 소비.

실험 그룹	용량-전 0 내지 24시간의 평균 총 음식 섭취 (g) (±SD)	용량-후 0 내지 24시간의 평균 총 음식 섭취 (g) (±SD)	용량-후 24 내지 48시간의 평균 총 음식 섭취 (g) (±SD)	용량-후 48 내지 72시간의 평균 총 음식 섭취 (g) (±SD)	용량-후 72 내지 96시간의 평균 총 음식 섭취 (g) (±SD)
나이브 (n=3)	3.51 (+/- 0.53)	3.98 (+/- 0.08)	3.76 (+/- 0.19)	3.62 (+/- 0.35)	3.91 (+/- 0.18)
아이소타입 대조군 (n=4)	3.73(+/- 0.48)	4.07 (+/- 0.23)	3.99 (+/- 0.17)	3.89 (+/- 0.22)	3.80 (+/- 0.22)
H4H9816P2 (n=4)	3.49 (+/- 1.07)	2.20**** (+/- 0.16)	2.08**** (+/- 0.36)	2.18**** (+/- 0.37)	2.49*** (+/- 0.47)

[0222] Tukey 다중 비교 사후 검정을 포함한 Kruskal-Wallis 일원변량분석에 의해 측정된 통계적 유의성을 표시한다

(* = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$, **** = $p < 0.0001$, 아이소타입 대조군 그룹: 50 mg/kg의 아이소타입 대조군 항체가 투여된 $\text{TrkB}^{\text{hu/hu}}$ 마우스와 비교됨.

표 8

[0223] TrkB 작용물질 항체 H4H9816P2로의 투약 후 $\text{TrkB}^{\text{hu/hu}}$ 마우스의 물 소비.

실험 그룹	용량-전 0 내지 24시간의 평균 총 물 섭취 (mL) ($\pm$ SD)	용량-후 0 내지 24시간의 평균 총 물 섭취 (mL) ($\pm$ SD)	용량-후 24 내지 48시간의 평균 총 물 섭취 (mL) ($\pm$ SD)	용량-후 48 내지 72시간의 평균 총 물 섭취 (mL) ($\pm$ SD)	용량-후 72 내지 96시간의 평균 총 물 섭취 (mL) ($\pm$ SD)
나이브 (n=3)	4.79 (+/- 0.21)	5.42 (+/- 0.94)	4.96 (+/- 0.91)	4.57 (+/- 0.56)	4.88 (+/- 0.32)
아이소타입 대조군 (n=4)	5.55(+/- 1.23)	4.50 (+/- 1.08)	5.08 (+/- 1.39)	5.09 (+/- 1.10)	5.77 (+/- 1.62)
H4H9816P2 (n=4)	4.67(+/- 1.13)	2.25** (+/- 0.55)	3.24* (+/- 1.10)	2.05*** (+/- 0.29)	2.25**** (+/- 0.24)

[0224] Tukey 다중 비교 사후 검정을 포함한 Kruskal-Wallis 일원변량분석에 의해 측정된 통계적 유의성을 표시한다 (* = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$, **** = $p < 0.0001$, 아이소타입 대조군 그룹: 50 mg/kg의 아이소타입 대조군 항체가 투여된 $\text{TrkB}^{\text{hu/hu}}$ 마우스와 비교됨.

[0225] 활성에 미치는 항체 처리의 영향을 측정하기 위하여, 운동을 각 마우스의 x-면 보행의 총 횟수를 연속적으로 측정하는 OXYMAX[®]/CLAMS 소프트웨어 (Columbus instruments, v5.35)에 의해 분석하였다. 한마리 마우스가 투약 전에 고활성을 나타내어 용량-후 통계적 분석으로부터 제거하였다. 나이브 및 아이소타입 항체-처리된 피험체는 연구 기간 내내 1일당 평균 11,000 - 15,000회의 보행을 일관되게 기록한 한편, H4H9816P2-처리된 $\text{TrkB}^{\text{hu/hu}}$ 마우스는 투약 후 24 내지 48시간에 28,260회의 보행을 기록하였고, 투약 후 48-72 및 72-96시간에 21,193 및 27,028회의 보행을 기록하였다 (표 9). H4H9816P2-처리된 $\text{TrkB}^{\text{hu/hu}}$ 마우스는 항체 투여 후 각 시점에서 더 많은 총 보행 횟수를 기록하였고, 고활성이 H4H9816P2 주사의 추가적인 영향인 것을 시사하였다. 조합적으로, 이들 영향은 TRKB 작용물질 항체, H4H9816P2의 단일 피하 주사가 $\text{TrkB}^{\text{hu/hu}}$ 마우스에서 체중, 체성분, 대사, 및 운동의 유의한 변화를 유도하였음을 시사한다.

표 9

[0226] TrkB 작용물질 항체 H4H9816P2로의 투약 후 $\text{TrkB}^{\text{hu/hu}}$ 마우스의 운동.

실험 그룹	용량-전 0 내지 24시간의 평균 총 보행 (횟수) ($\pm$ SD)	용량-후 0 내지 24시간의 평균 총 보행 (횟수) ($\pm$ SD)	용량-후 24 내지 48시간의 평균 총 보행 (횟수) ($\pm$ SD)	용량-후 48 내지 72시간의 평균 총 보행 (횟수) ($\pm$ SD)	용량-후 72 내지 96시간의 평균 총 보행 (횟수) ($\pm$ SD)
나이브 (n=3)	16562 (+/- 3380)	14692 (+/- 2792)	14387 (+/- 6126)	13279 (+/- 3607)	12525 (+/- 4121)
아이소타입 대조군 REGN1945 (n=4)	18105(+/- 4085)	13380 (+/- 2730)	13049 (+/- 3376)	11371 (+/- 2552)	11468 (+/- 2088)
H4H9816P2 (n=4)	13292(+/- 5294)	16575 (+/- 6836)	28260 (+/- 19874)	21193 (+/- 6668)	27028* (+/- 10969)

[0227] Tukey 다중 비교 사후 검정을 포함한 Kruskal-Wallis 일원변량분석에 의해 측정된 통계적 유의성을 표시한다 (* = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$, **** = $p < 0.0001$, 아이소타입 대조군 그룹: 50 mg/kg의 아이소타입 대조군 항체가 투여된 $\text{TrkB}^{\text{hu/hu}}$ 마우스와 비교됨.

[0228] 실시예 3. $\text{TrkB}^{\text{hu/hu}}$ 마우스 (MAID 7139)에서 입체 주사 후 뇌에서의 TRKB 인산화에 미치는 TRKB 작용물질 항체

H4H9816P2 및 IgG4 아이소타입 대조군 REGN1945의 영향의 생체내 비교

실험 과정

[0230] 티로신 수용체 키나제 B (TRKB)는 세포의 수용체 도메인에서 그것의 리간드 뇌-유래 신경영양 인자 (BDNF)의 결합을 통해 활성화되어, 세포내 수용체 도메인의 티로신 잔기의 다이머화 및 자가인산화 및 후속되는 세포질 신호전달 경로의 활성화를 유도한다. 예컨대, Haniu et al. (1997) *J. Biol. Chem.* 272(40):25296-25303 및 Rogalski et al. (2000) *J. Biol. Chem.* 275(33):25082-25088 (이들은 각각 모든 목적에 대해 그 전문이 본원에 참조로 포함됨)을 참조한다. TRKB 활성화 동역학에 미치는 TRKB 작용물질 항체, H4H9816P2의 영향을 측정하기 위하여, 직접 해마 주사 후의 TRKB 인산화의 시간-경과 연구를 세포의 도메인이 인간화되어 있는 (MAID 7139) 키메라 마우스/인간 TRKB 수용체에 대해 동형접합성인 마우스 (TrkB^{hu/hu} 마우스로 언급됨)에서 수행하였다. TrkB^{hu/hu} 마우스 (N=48마리)에게 본원에서 IgG4 아이소타입 대조군 항체로 언급한 2 μ L의 비히클 (PBS), REGN1945 (27.5 mg/mL 최종 농도) 또는 TRKB 작용물질 항체 H4H9816P2 (27.5 mg/mL 최종 농도) 중 어느 하나를 해마에, 브레그마에 대해 전방으로 -2 mm 및 옆으로 +1.5 mm에서 양측 입체 주사를 제공하였다. 조직 손상을 최소화하기 위하여, 주사 및 바늘 제거를 둘 다 5분 간격에 걸쳐 점진적으로 수행하였다. 그런 후 TrkB^{hu/hu} 마우스를 주사 후 대략 30분, 1시간, 4시간, 또는 18시간 후에 CO₂ 안락사에 의해 희생시켰다. 말단 출혈을 심장 천공을 통해 수행하여 혈액을 수집한 후, 마우스를 저온 해파린처리된 식염수로 심장을 가로질러 관류하였다. 뇌를 조심스럽게 두개로부터 제거하고, 주사 부위를 둘러싸고 있는 조직의 2 mm³ 섹션을 절개하고, 에펜도르프 튜브에 수집하여 얼음에서 보관하였다. 그런 후 뇌 섹션을 2x 프로테아제 및 포스파타제 억제제 (ThermoFisher Scientific, Cat#78444)를 함유한 300 μ L의 RIPA 용해 완충액 (ThermoFisher Scientific, Cat#89901)에서 용해시키고 얼음에서 보관하였다. 용해된 조직을 그런 후 추가의 프로세싱을 위해 균등화하고, 부분표본화하여 -80°C에서 보관하였다.

[0231] 뇌 조직에서 TRKB 인산화를 평가하기 위하여, 면역 침전 및 웨스턴 블롯팅을 수행하였다. H4H9816P2와의 결합에 대해 경합하지 않는 항-인간 TRKB 항체 H4H10108N을 NHS-활성화된 세파로스 비드 (제조사의 프로토콜을 사용하여 제조됨; GE Healthcare, Cat# 17-0906)에 결합시키고; DPBS로 3회 세척하여 임의의 잔류하는 보존 용액을 제거하였다. 균등화된 뇌 용해물을 얼음에서 해동시키고 TBST 중의 1% NP-40, 0.1% Tween-20, 프로테아제 및 포스파타제로 이루어진 완충액에서 1 mg/mL (뇌 무게 대 완충액 부피)의 농도로 희석하였다. 균등화된 뇌 용해물의 단백질 농도를 표준화된 BCA 검정을 제조사 (Thermo Scientific Pierce, Cat#23225)의 지시대로 수행함으로써 정성화하였다. 단백질의 모든 100 μ g에 대해, 15 μ L의 항-인간 TRKB 항체 (H4H10108N) NHS-활성화된 세파로스 비드를 뇌 용해물 용액에 첨가하고 그 혼합물을 20 rpm에서 부드럽게 진탕하면서 (Thermo rotator) 4°C에서 밤새 인큐베이션하였다. 다음날, 샘플을 1000 x g에서 1분 동안 원심분리한 후, 상층액을 조심스럽게 제거하였다. 비드를 계속해서 1% Tween-20 (Sigma Aldrich, Cat#P9416)이 첨가된 400 μ L의 Tris-완충된 식염수 (Bio-Rad, Cat#1706435)(TBST)로 2회 세척하였다. 세척 완충액을 조심스럽게 흡인한 후, pH 3.0의 물 중의 0.1% 트라이플루오로아세트산 (TFA; Sigma-Aldrich, T62200) 60 μ L를 각 샘플에 첨가하였다. 용액을 혼합하고 2분 동안 세워둔 후 수집하여 별도의 튜브로 옮겼다. 이 과정을 또 다른 60 μ L의 pH 3.0의 0.1% TFA로 반복하였다. 그런 후 각 샘플에 대한 2개의 0.1% TFA 용액을 조합하고, pH 8.5에서 2 μ L의 1M Tris-HCl (ThermoFisher Scientific, Cat#15567-027)을 첨가하였다.

[0232] 용액을 고속 진공을 사용하여 건조시킨 후 20 μ L의 1x Laemmli Buffer (Bio-Rad, Cat#1610737) 플러스 355 nM의 2-머캅토에탄올 (BME; Gibco, Cat#21985-023)의 혼합물로 재현탁하고 환원시켰다. 샘플을 95°C에서 10분 동안 끓인 후 10-웰, Mini-Protean 4-15% Tris-글리신 겔 (Bio-Rad, Cat#4561086) 위로 로딩하였다. 전기영동 후에, 단백질 샘플을 Tris-글리신 겔로부터 PVDF 막 (Bio-Rad, Cat#170-4156)으로 트랜스-블롯(Trans-Blot) 터보 전달 시스템 (Bio-Rad, Cat#1704156)을 통해 30분의 과정을 거쳐 1.3A 및 25 V의 일정한 속도에서 전달하였다. 전달 후, 막을 TBST 중의 2.5% 우유 (Bio-Rad, Cat#170-6406)로 1시간 동안 실온에서 차단하고, 계속해서 2.5% BSA 용액에 1:1000으로 희석된 항-포스포-TRKB 항체 (Novus, Cat#NB100-92656) 또는 2.5% 우유 TBST 용액에 1:1000으로 희석된 항-TRKB 일차 항체 (세포 신호전달, Cat#4603) 중 어느 하나로 4°C에서 30 rpm에서의 진탕기에서 밤새 프로빙하였다. 다음날, 블롯을 TBST로 세척하고 TBST 중의 1% 우유 중에 1:1000의 양고추냉이 과산화효소 (Jackson, Cat#111-035-144)로 콘쥬게이트된 항-토끼 IgG 항체와 함께 1시간 동안 실온에서 인큐베이션하였다. 그런 후 다시 블롯을 세척하고, ECL 용액 (PerkinElmer, Inc. Cat# RPN2106)으로 전개한 후, 후속적인 이미지 노출을 30초마다 수행하였다.

[0233] **결과 및 결론**

[0234] $TrkB^{hu/hu}$ 마우스 뇌 용해물로부터 유래된 단백질의 면역침전 및 후속되는 웨스턴 블롯팅은 해마 TRKB 인산화가, 도 3에서 나타난 것과 같이, TRKB 작용물질 항체, H4H9816P2가 주입된 마우스에서는 검출가능하였지만, 비히클 또는 아이소타입 대조군 항체로 처리된 마우스에서는 그렇지 않은 것을 입증하였다. 평가된 시점 중에서, TRKB 인산화는 H4H9816P2가 투여된 마우스에서 입체 주사 후 4시간째에 피크를 이루었다. TRKB 인산화는 또한 모든 마우스가 아닌 일부 마우스에서 투약 후 18시간 째에 웨스턴 블롯에 의해 검출되었다. 역으로, 비히클 및 IgG4 아이소타입 대조군 항체의 주사는 어떠한 시점에서도 TRKB 인산화를 유도하지 못하였다. 웨스턴 블롯팅은 또한 총 TRKB 수용체 수준이 비히클 및 아이소타입 대조군 처리된 마우스에 비해, H4H9816P2가 투여된 모든 $TrkB^{hu/hu}$ 마우스가 아니라 일부에서 하향조절되었음을 나타냈다. 총 TRKB 수준은 투약 후 18시간째에 H4H9816P2-처리된 피험체에서 약간 하향조절된 것으로 나타났다. 그러므로, 이들 결과는 TRKB 작용물질 항체, H4H9816P2의 직접 주사가 $TrkB^{hu/hu}$ 마우스에서 해마 TRKB 수용체의 인산화를 유도하는 것을 나타낸다.

[0235] **실시예 4. 출생 후 1일의 $TrkB^{hu/hu}$ 마우스로부터의 일차 대뇌피질 뉴런에서 TrkB 작용물질 항체에 의한 하류 신호전달 경로의 활성화**

[0236] **실험 과정**

[0237] 모든 과정을 안과 및 시력 연구 및 Regeneron Pharmaceuticals, Inc. IACUC의 동물 사용에 대한 ARVO 선언문을 따라 수행하였다. 일차 마우스 대뇌피질 뉴런을 인간화된 TrkB 마우스 (MAID 7139)로부터 분리하여 배양하였다. 예컨대, Beaudoin et al. (2012) *Nat. Protoc.* 7(9):1741-1754 (모든 목적에 대해 그 전문이 본원에 참조로 포함됨)를 참조한다. 웨스턴 블롯을 수행하여 Akt 및 Erk (p-Akt, p-Erk1/2)의 하류 경로에 미치는 TrkB 작용물질 항체의 영향을 측정하였다. 출생 후 1일 된 (P1) 인간화된 TrkB 마우스 새끼로부터의 일차 대뇌피질 뉴런을 GS21 중성 보충물 (Global Stem, cat. # GSM-3100), 글루타맥스 (Invitrogen, cat. # 35050-061) 및 페니실린/스트렙토마이신이 첨가된 중성Q 기초 배지 (Global Stem, cat. # GSM-9420)에서 4일 동안 배양하였다. 세포를 TrkB 작용물질 항체 H4H9816P-L1 (10 μ g/mL), TrkB 작용물질 항체 H4H9780P-L1 (10 μ g/mL), TrkB 작용물질 항체 H4H9814P-L1 (10 μ g/mL), IgG4 아이소타입 대조군 REGN1945 (10 μ g/mL), 대조군 항체 H1M8037C-L1 (10 μ g/mL), 또는 BDNF (1 μ g/mL)로, 15분 또는 2시간 동안 처리하였다. 웨스턴 블롯을 수행하여 작용물질이 하류 신호전달 유지 및 강도에서 차이를 나타냈는지를 측정하였다. 처리된 세포를 세정하고 1% 프로테아제 및 포스파타제 억제제 (Sigma)를 함유한 저온 PBS에서 스크램핑하였다. 단백질을 Bradford 단백질 검정 (Pierce)에 의해 측정하였다. 샘플 (50 μ g)을 3-8% Tris-아세테이트 환원 겔 (Novex)에서 SDS-PAGE에 의해 분리하고 니트로셀룰로오스 막 (Bio-Rad)에 옮겼다.

[0238] 막을 1시간 동안 5% 우유 및 0.1% Tween-20, pH 7.6을 함유한 차단 용액에서 인큐베이션하였다. 그런 후 5% BSA, 0.1% Tween-20, 및 토끼 항-포스포TrkB (세포 신호전달, cat. # 9141, 1:500), 토끼 항-포스포-Akt (세포 신호전달, cat. # 9271, 1:1000), 또는 토끼 항-포스포-ERK1/2 항체 (Sigma, cat. # E7028, 1:5000)를 함유한 차단 완충액에서 4°C에서 밤새 인큐베이션하였다. 계속해서, 표지된 단백질을 양고추냉이 과산화효소 (HRP) 콘쥬게이트된 항-염소, 마우스 또는 토끼 IgG와의 인큐베이션 및 이어서 HRP (Pierce)에 대한 화학발광 기질과의 전개에 의해 시각화하였다. 각 레인에 존재하는 총 TrkB, MAPK 또는 Akt의 양을 측정하기 위하여, 니트로셀룰로오스 막을 스트리핑 완충액 (Pierce)에서 20분 동안 항체를 스트리핑하고 토끼 항-TrkB (세포 신호전달, cat. # 4603, 1:1000), 토끼 항-Erk1/2 (세포 신호전달, cat. # 06-182, 1:1000), 또는 토끼 항-Akt 항체 (세포 신호전달, cat. # 9272, 1:1000)와 함께 인큐베이션한 후 상기에서 기술한 것과 같이 시각화하였다. 베타-액틴 (Sigma, cat. # A5316, 1:20000 및 GAPDH (Sigma, cat. # G9295)를 샘플 로딩 대조군으로서 프로빙하였다.

[0239] **물질**

표 10

mAB 클론 ID.

[0240]

REGN	AbPID	Lot
	H4H9816P	L1
REGN1945		L1
	H4H9780P	L1
	H4H9814P	L1

	H1M8037CComparator, 대조군 항체	L1
--	----------------------------	----

표 11

시약.

1. 시약/장비	2. 공급원	3. 식별자	4. Lot #
5. 페니실린/스트렙토마이신	6. Invitrogen	7. 15140	8.
9. 소 태아 혈청	10. Invitrogen	11. 10082-147	12.
13. GS21 중성 보충물 (50X)	14. GlobalStem	15. GSM-3100	16. 18130001
17. 신경Q 기초 배지	18. GlobalStem	19. GSM-9420	20. 18190001
21. 글루타맥스	22. Invitrogen	23. 35050-061	24.
25. 프로테아제 억제제 카테일	26. Sigma	27. P8340	28.
29. 포스파타제 억제제 카테일 3	30. Sigma	31. P0044	32. 034M4010V
33. RIPA 용해 완충액 1x	34. Rockland	35. MB-030-0250	36. 24805
37. BSA	38. Sigma	39. A8806	40.
41. 트리스-아세트레이트 4-8% 환원 겔	42. Invitrogen	43. WG1602BX10	44. 14022684
45. BCA 단백질 검정 키트	46. Pierce	47. 23227	48.
49. ECL	50. Pierce	51. 32209	52.
53. 복원 웨스턴 블롯 스트리핑 완충액	54. Pierce	55. 21059	56.
57. 니트로셀룰로오스 막	58. Bio-Rad Laboratories	59. 1620112	60.

표 12

신경기초 배지.

신경Q 기초 배지 (Global Stem, GSM-9420) 50 mL
GS21 중성 보충물 (50X) (Global Stem, GSM-3100) 10 mL
글루타맥스 (Invitrogen, 35050-061) 0.5mL
페니실린/스트렙토마이신 5mL

표 13

항체.

H4H9816P lot1 (10 µg/mL)
H4H9780P lot1 (10 µg/mL)
H4H9814P lot1 (10 µg/mL)
REGN1945 인간 IgG4 lot1 (10 µg/mL)
C2 H1M8037C lot1 (10 µg/mL)

표 14

웨스턴 블롯.

p-Trk (세포 신호전달, 9141) Rb, 1:500
총 TrkB (세포 신호전달, 4603) Rb 1:1000
p-Akt (세포 신호전달, 9271) Rb 1:1000
총-Akt (세포 신호전달, 9272) Rb 1:1000
p-Erk1/2 (Sigma, E7028) 1:5000
총 Erk1/2 (세포 신호전달, 06-182) Rb 1:1000
b-액틴 (Sigma, A5316) Ms 1:20000
GAPDH (Sigma, G9295) HRP 콘쥬게이트됨 1:20000

[0245] **결과 및 결론**

[0246] 도 7에서 나타낸 것과 같이, 모든 TrkB 작용물질 항체가 인큐베이션 15분 후에 MAPK/ERK 및 PI3K/Akt 경로의 활성화를 보인 한편, BDNF 및 H4H9814P만이 TrkB 인산화를 보였다. 인큐베이션 후 2시간째에, 모든 TrkB 작용물질 항체가 TrkB의 활성화를 보였다.

[0247] **실시예 5. 인간화된 TrkB 및 야생형 마우스에서 항-TrkB 항체의 약물동역학적 평가**

[0248] **실험 과정**

[0249] 항-TrkB 항체, H4H9816P2 (Lot H4H9816P2-L7)의 약물동역학에 대한 평가를 인간화된 TrkB (키메라 마우스/인간 TrkB 발현에 대해 동형접합성인 마우스, TrkB^{hu/hu}) (MAID7139) 및 야생형 (WT) 마우스에서 수행하였다. 집단은 마우스 스트레인당 5마리 마우스를 포함하였다. 모든 마우스에게 단일 피하 (SC) 10 mg/kg 용량을 제공하였다. 혈액 샘플을 투약 후 6시간 및 1, 2, 3, 6, 9, 16, 21, 및 30일 후에 수집하였다. 혈액을 혈청으로 프로세싱하였고 분석할 때까지 -80℃에서 냉동시켰다.

[0250] 순환하는 항체 농도를 Gyrolab xPloreTM (Gyros, Uppsala, Sweden)을 사용하여 총 인간 IgG4/hIgG1 항체 분석에 의해 측정하였다. 간단히 설명하면, 항체 희석 완충액 (0.05% Tween-20 + PBS)에 100 µg/mL로 희석된 비오티닐화된 마우스 항-인간 IgG4/IgG1-특이적 단클론성 항체 (REGN2567; Lot RSCH15088)를 스트랩트아비딘-코팅 비드 (DynospheresTM)로 사전로딩된 친화성 칼럼을 포함한 Gyrolab Bioaffy 200 CD 상에서 포획하였다. 이 검정에서 보정을 위해 사용한 표준은 0.1% 정상 마우스 혈청 (NMS)을 함유한 희석 완충액 (0.5% BSA + PBS) 중의 0.488 내지 2000 ng/mL의 범위의 농도의 H4H9816P2였다. 혈청 샘플을 항체 희석 완충액에 1:100으로 희석하였다. 실온에서 작동된 CD 상의 항-REGN2567-코팅 친화성 칼럼에서 포획된 인간 IgG를 검출 완충액 (Rexxip F 완충액)에 희석된 0.5 µg/mL의 Alexa-647-콘주게이트된 마우스 항-인간 카파 단클론성 항체 (REGN654; Lot RSCH13067)의 첨가에 의해 검출하였고; 그 결과 생성된 형광 신호를 Gyrolab xPlore 기기에 의해 반응 유닛 (RU)으로 기록하였다. 샘플 농도를 Gyrolab Evaluator 소프트웨어를 사용하는 5-파라미터 로지스틱 곡선 피트를 사용하여 맞춘 표준 곡선으로부터의 내삽에 의해 측정하였다. 2개의 복제 실험으로부터의 평균 농도를 후속 PK 분석에 사용하였다.

[0251] PK 파라미터를 Phoenix[®] WinNonlin[®] 소프트웨어 버전 6.3 (Certara, L.P., Princeton, NJ) 및 혈관의 투약 모델을 사용하여 비구획 분석 (NCA)에 의해 측정하였다. 각 항체에 대한 각각의 평균 농도 값을 사용하여, 혈청 중의 관찰된 최대 농도 (C_{max}), 관찰된 추정 반감기 (t_{1/2}), 및 마지막 측정 가능한 농도까지의 시간 대비 농도 곡선 아래의 면적 (AUC_{last})을 포함한 모든 파라미터를 선형 내삽 및 균일한 무게측정을 포함한 선형 사다리꼴 규칙을 사용하여 측정하였다.

[0252] **결과 및 결론**

[0253] 항-TrkB 항체, H4H9816P2의 10 mg/kg의 s.c. 투여 후에, 항체의 유사한 최대 농도 (C_{max})를 TrkB^{hu/hu} 및 WT 마우스 둘 다에서 제1 또는 제2일에 관찰하였다 (각각 135 및 131 µg/mL). 제9일에, H4H9816P2는 WT 마우스에서보다 TrkB^{hu/hu} 마우스에서 더 급격한 약물 제거를 나타냈고, 이것은 표적-매개 효과를 나타낸다. 제30일에 항체 농도는 TrkB^{hu/hu} 마우스에서 약 35배 더 적었다. WT 마우스에서 H4H9816P2에 대한 항체 노출 (AUC_{last})은 TrkB^{hu/hu} 마우스에서 볼 수 있는 것보다 약 1.7배 더 높았다 (각각 1730 및 1020 d*µg/mL). WT 마우스는 또한 TrkB^{hu/hu} 마우스를 능가하는 반감기의 약 3배 증가를 나타냈다 (각각 8.4일 및 2.9일).

[0254] 총 항-TrkB 항체 농도에 대한 데이터의 요약은 표 15에 나타내고, 평균 PK 파라미터는 표 16에 기술하며 시간 대비 평균 총 항체 농도는 도 8에 도시한다. 도 8에서, 마우스에 제0일에 단일한 10 mg/kg 피하 용량을 투여하였다. 혈청 중의 총 H4H9816P2의 농도를 Gyros 면역검정을 사용하여 측정하였다. 용량-후 6시간, 1, 2, 3, 6, 9, 16, 21, 및 30일을 표시한 데이터는 항체의 평균 농도를 나타낸다. H4H9816P2의 총 항체 농도를 TrkB^{hu/hu} 마우스에 대해서는 진한 원형으로 표시하고 야생형 마우스에 대해서는 진한 사각형으로 표시한다. 데이터를 평균 ± SD로서 도표화한다.

표 15

[0255] TrkB^{hu/hu} 및 야생형 마우스에서 시간 경과에 따른 H4H9816P2의 단일 10 mg/kg 피하 주사 후 혈청 중의 총 IgG의 평균 농도 (± SD).

항체	시간 (일)	마우스 혈청 중의 총 mAb 농도	
		10 mg/kg	
		평균 (μg/mL)	+/- SD
TrkB ^{hu/hu} 마우스	0.25	72.42	4.06
	1	132.0	18.0
	2	124.9	15.9
	3	113.4	11.8
	6	78.72	9.98
	9	37.74	14.0
	16	5.592	4.97
	21	2.060	2.11
	30	0.447	0.506
WT 마우스	0.25	56.73	14.5
	1	120.8	6.26
	2	131.2	7.54
	3	125.7	7.46
	6	101.9	11.4
	9	75.94	7.06
	16	42.61	16.1
	21	27.75	16.9
	30	15.52	13.0

[0256] 약어: 시간 = 단일 용량 주사 후 경과일을 나타내는 시간; d = 연구일; SD = 표준 편차.

표 16

[0257] 약동학적 파라미터의 요약.

파라미터	단위	H4H9816P2	
		TrkB ^{hu/hu} 마우스	WT 마우스
C _{max}	μg/mL	135 ± 15	131 ± 7.5
T _{1/2}	d	2.94 ± 1.1	8.36 ± 3.9
AUC _{last}	평균 μg/mL	1020 ± 150	1730 ± 310

[0258] PK 파라미터를 시간 대비 평균 농도 프로파일로부터 이끌어냈다. T_{1/2} 및 AUC_{last}는 제30일까지의 농도를 기반으로 한다.

[0259] 약어: C_{max} = 피크 농도; AUC = 농도-시간 곡선 아래의 면적; AUC_{last} = 0 시간으로부터 마지막 양의(positive) 농도 시간까지 계산된 AUC; T_{1/2} = 최종 제거 반감기.

[0260] 실시예 6. 인간화된 TRKB 유전자좌를 포함하는 래트의 생성

[0261] TRKB의 74.4 kb의 상응하는 인간 서열로 래트 TRKB 세포의 도메인을 암호화하는 래트 TrkB 유전자로부터의 68.5 kb 영역을 대체하기 위하여, 래트 TrkB 유전자좌의 7 kb를 포함하는 5' 상동성 팔 및 래트 TrkB 유전자좌의 47 kb를 포함하는 3' 상동성 팔을 포함하는 큰 표적화 벡터를 생성하였다. VELOCIGENE[®] 유전자 조작 기술을 사용하여 박테리아 상동성 재조합 (BHR) 반응을 통해 박테리아 인공 염색체 (BAC) DNA로부터 유래되는 큰 표적화 벡터 (LTVEC)의 생성 및 사용이, 예컨대 US 6,586,251 및 Valenzuela et al. (2003) Nat. Biotechnol. 21(6):652-

659 (이들은 각각 모든 목적에 대해 그 전문이 본원에 참조로 포함됨)에서 기술된다. 시험관내 어셈블리 방법을 통한 LTVEC의 생성은, 예컨대, US 2015/0376628 및 WO 2015/200334 (이들은 각각 모든 목적에 대해 그 전문이 본원에 참조로 포함됨)에서 기술된다. 래트 및 인간 TRKB에 대한 정보는 표 17에 제공한다. 큰 표적화 벡터의 생성의 설명은 표 18에 제공한다.

표 17

[0262]

래트 및 인간 TRKB/NTRK2.

	공식 기호	NCBI GeneID	일차 공급원	RefSeq mRNA ID	UniProt ID	게놈 어셈블리	위치
래트	Ntrk2	25054	RGD:3213	NM_012731.2	Q63604	RGSC 5.0/rn5	Chr 17: 8,156,432 - 8,464,507 (-)
인간	Ntrk2	4915	HGNC:8032	AF410899	Q16620	GRCh38/hg38	Chr 9: 84,669,778 - 85,027,070 (+)

표 18

[0263]

래트 *TrkB/Ntrk2* 큰 표적화 벡터.

	구성된 게놈	시작	끝	길이 (bp)
5' 래트 팔	RGSC 5.0/rn5	Chr17: 8,470,615	Chr17: 8,463,379	7,236
인간 삽입물	GRCh38/hg38	Chr9: 84,670,730	Chr9: 84,745,139	74,409
3' 래트 팔	RGSC 5.0/rn5	Chr17: 8,394,967	Chr17: 8,347,889	47,078

[0264]

구체적으로, 인트론 10의 처음 50개의 염기쌍 및 엑손 2와 10 사이 (즉, 코딩 엑손 1과 엑손 10 사이)의 모든 인트론을 포함한, 엑손 2 (코딩 엑손 1; 아미노산 32로부터 시작하고, 신호 펩타이드를 보존함)에서 시작하여 엑손 10까지의 영역을 래트 *TrkB* 유전자좌로부터 삭제하였다 (엑손 10 및 11에 의해 암호화된 래트 경막 도메인은 보존됨). 인트론 10의 처음 66개의 염기쌍 및 엑손 2와 10 사이 (즉, 코딩 엑손 1과 엑손 10 사이)의 모든 인트론을 포함한, 엑손 2/코딩 엑손 1 (아미노산 32부터, 신호 펩타이드 뒤에서 시작됨)부터 엑손 10까지를 포함하는 영역을 삭제된 래트 영역 대신 삽입하였다 (엑손 10 및 11에 의해 암호화된 래트 경막 도메인은 보존됨).

[0265]

래트 TRKB 신호 펩타이드, 세포외 도메인, 경막 도메인, 및 세포질 도메인에 대한 서열을 각각 SEQ ID NO: 55-58에 제시하고, 상응하는 코딩 서열을 각각 SEQ ID NO: 67-70에 제시한다. 인간 TRKB 신호 펩타이드, 세포외 도메인, 경막 도메인, 및 세포질 도메인에 대한 서열을 각각 SEQ ID NO: 59-62에 제시하고, 상응하는 코딩 서열을 각각 SEQ ID NO: 71-74에 제시한다. 예상된 암호화된 키메라 TRKB 단백질은 래트 TRKB 경막 및 세포내 도메인, 래트 TRKB 신호 펩타이드, 및 인간 TRKB 세포외 도메인을 가진다. 도 4를 참조한다. 래트 및 인간 TRKB 단백질의 정렬을 도 6에 나타낸다. 래트 및 인간 *TrkB/TRKB* 코딩 서열을 각각 SEQ ID NO: 10 및 11에 제시한다. 래트 및 인간 TRKB 단백질 서열을 각각 SEQ ID NO: 2 및 3에 제시한다. 예상된 키메라 래트/인간 *TRKB* 코딩 서열 및 예상된 키메라 래트/인간 TRKB 단백질에 대한 서열을 각각 SEQ ID NO: 13 및 5에 제시한다.

[0266]

돌연변이 대립유전자를 생성하기 위하여, 4개의 가이드 RNA (SEQ ID NO: 41-44에 제시된 가이드 RNA 표적 서열)를 포함하는 CRISPR/Cas9 구성요소를 큰 표적화 벡터와 함께 래트 배아 줄기 세포에 도입하였다. 구체적으로, 4×10^6 개의 래트 ES 세포 (다크 아구티 라인 DA2B)를 다음으로 전기천공하였다: 2 mg TrkB LTVEC; 5 mg Cas9 발현 플라스미드; 및 5 mg의 각각의 gRNA: gU, gU2, gD 및 gD2. 전기천공 조건은 다음과 같았다: 400 V 전압; 100 mF 용량; 및 0 W 저항. 항생물질 선택을 75 mg/mL 농도의 G418을 사용하여 수행하였다. 콜로니를 선택하고, 팽창시키고, TAQMAN[®]에 의해 스크리닝하였다. 도 5를 참조한다. 대립유전자 상실 검정을 수행하여 내인성 래트 대립유전자의 손실을 검출하였고, 대립유전자 획득 검정을 수행하여 인간화된 대립유전자의 획득을 검출하였으며, 표 19에 제시한 프라이머 및 프로브를 사용하여 CRISPR 및 보유 검정을 수행하였다.

표 19

[0267]

스크리닝 검정.

검정	설명	프라이머/프로브	서열
rnoTU	상류 LOA	전방향	GGGCTCAGGCAGGTATATGTTG (SEQ ID NO: 26)
		프로브 (FAM)	ACAGATGCTGTCCCAAACATAGCAAGA (SEQ ID NO: 27)
		역방향	CCAACCTAAGCCAGTGAAACAG (SEQ ID NO: 28)
rnoTM	중간 LOA	전방향	GCAGACACTGGATGGGTCA (SEQ ID NO: 32)
		프로브 (FAM)	CCATTCGCGAGTTATGAGAAGCTGCA (SEQ ID NO: 33)
		역방향	ACAGGGTTAGCTGGTGAATGGA (SEQ ID NO: 34)
rnoTD	하류 LOA	전방향	GTGCTGGAGACCAGGAGACT (SEQ ID NO: 29)
		프로브 (Cal-Orange)	TGCCATACTCAGTTTATACGGTGCTGAC (SEQ ID NO: 30)
		역방향	GCCTGGTGGCTCAGTCAATG (SEQ ID NO: 31)
7138 hU	상류 인간 삽입	전방향	AGGTGGGTAGGTCCTGGAAGTG (SEQ ID NO: 14)
		프로브 (FAM)	AATGCTGTCCCAAGAGTGGG (SEQ ID NO: 15)
		역방향	GTCCTGCATCCCTTGTCTTTG (SEQ ID NO: 16)
7138 hD	하류 인간 삽입	전방향	ATGTGGGCGTTGTGCAGTCTC (SEQ ID NO: 17)
		프로브 (Cal)	CGCTGCAGTGCATTGAACTCAGCA (SEQ ID NO: 18)
		역방향	CTGTGGAGGGACGTGACCAG (SEQ ID NO: 19)
rnoTAU2	상류 보유	전방향	TCGGAGCACAGGACTACAG (SEQ ID NO: 35)
		프로브 (FAM)	CAAGAGGAACTGTGTCCAGGAAAGC (SEQ ID NO: 36)
		역방향	AGCGTGCCTCACCTAACCTCTA (SEQ ID NO: 37)
rnoTAD2	하류 보유	전방향	GCACAGCACTGTAAAGGCA (SEQ ID NO: 38)
		프로브 (Cal)	ACGGAACCTGAAGGAATTGGTATTGTTGT (SEQ ID NO: 39)
		역방향	ACACAGCTATGGGAGAAAGACTG (SEQ ID NO: 40)
rnoTGU	상류 CRISPR 검정	전방향	CTGGGTGATTGGGACTGAGAAAG (SEQ ID NO: 45)
		프로브 (FAM)	CAGCCTTGAAAGTATGGCTTGGGC (SEQ ID NO: 46)
		역방향	GCACTCGCCAACCGGAAG (SEQ ID NO: 47)
rnoTGD	하류 CRISPR 검정	전방향	GACCAGCTCACCTTACTTATGG (SEQ ID NO: 48)
		프로브 (Cal)	ACTGAATGCCAAGGGTGCCTTGA (SEQ ID NO: 49)
		역방향	TCTTGGAATCCGCTGAAGAGTT (SEQ ID NO: 50)

[0268]

대립유전자 상실 (LOA) 및 대립유전자 획득 (GOA) 검정을 포함하는 대립유전자 변형 (MOA) 검정은, 예를 들어, US 2014/0178879; US 2016/0145646; WO 2016/081923; 및 Frendewey *et al.* (2010) *Methods Enzymol.* 476:295-307 (이들은 각각 모든 목적에 대해 그 전문이 본원에 참조로 포함됨)에서 기술된다. 대립유전자 상실 (LOA) 검정은 종래의 스크리닝 로직을 반전시키고 돌연변이가 지시된 천연 유전자좌의 게놈 DNA 샘플에서 복사물의 수를 정량화한다. 정확하게 표적화된 이형접합성 세포 클론에서, LOA 검정은 (X 또는 Y 염색체 상에 없는 유전자에 대한) 두 천연 대립유전자 중 하나를 검출하고, 다른 대립유전자는 표적화된 변형에 의해 파괴된다. 동일한 원리를 대립유전자 획득 (GOA) 검정으로서 역으로 적용하여 게놈 DNA 샘플에서 삽입된 표적화 벡터의 복사물 수를 정량화할 수 있다.

[0269]

보유 검정은 US 2016/0145646 및 WO 2016/081923 (이들은 각각 모든 목적에 대해 그 전문이 본원에 참조로 포함됨)에서 기술된다. 보유 검정은 표적화 벡터의 5' 및 3' 상동성 팔에 상응하는 5' 및 3' 표적 서열로부터의 DNA 주형의 복사물 수를 각각 평가함으로써, 표적 게놈 유전자좌 외부의 게놈 위치에 핵산 삽입물의 무작위 트랜스제닉 삽입으로부터 표적 게놈 유전자좌에 핵산 삽입물의 정확하게 표적화된 삽입을 식별한다. 구체적으로, 보유 검정은 변형된 표적 게놈 유전자좌에 보유될 것으로 의도된 5' 표적 서열 DNA 주형 및/또는 변형된 표적 게놈 유전자좌에 보유될 것으로 의도된 3' 표적 서열 DNA 주형의 게놈 DNA 샘플 중의 복사물 수를 측정한다. 이배체 세포에서, 정확하게 표적화된 클론은 2의 복사물 수를 보유할 것이다. 2보다 큰 복사물 수는 일반적으로 표적 게놈 유전자좌에서보다는 표적 게놈 유전자좌의 외부에서 무작위로 표적화 벡터의 트랜스제닉 통합이 있음을 나타낸다. 그것보다 적인 복사물 수는 일반적으로 삭제에 대해 표적화된 영역을 넘어 확장된 큰 삭제를 나타낸다.

[0270]

CRISPR 검정은 CRISPR gRNA에 의해 파괴된 영역을 커버하기 위해 설계된 TAQMAN[®] 검정이다. CRISPR gRNA가 절단하여 indel (삽입 또는 삭제)을 생성할 때, TAQMAN[®] 검정은 증폭하지 못할 것이고 따라서 CRISPR 절단이 보고된다.

[0271]

양성 클론 CB1을 해동시키고, 팽창시키고, TAQMAN[®]에 의해 재확인하였다. CB1을 또한 5' 상동성 팔의 단부를 지

나 측면의 래트 게놈 서열에 대한 인간 대체 서열의 5' 단부로부터 연속적인 PCR에 의해 확인하였다. PCR 앰플리콘을 단부의 서열분석에 의해 정확한 것으로서 확인하였다.

[0272] US 2014/0235933, US 2014/0310828, WO 2014/130706, 및 WO 2014/172489 (이들은 각각 모든 목적에 대해 그 전문이 본원에 참조로 포함됨)에 기술된 방법을 사용하여 F0 및 F1 래트를 생성하였다. 이러한 방법에서, 확인된 표적화된 래트 ES 세포 클론 (예컨대, 다크 아구티 ES 세포 클론)을 배반포 (예컨대, 스포라그 다울리 (SD) 배반포)에 미세주입하고, 그런 후 그것을 임신에 위해 표준 기법을 사용하여 위임된 수령체 암컷 (예컨대, SD 수령체 암컷)에 전달한다. 키메라를 확인하고 (예컨대, 외피 색에 의해), 수컷 F0 키메라를 동일 스트레인의 암컷 야생형 래트 (예컨대, SD 암컷)와 교배시킨다. 생식선 (예컨대, 아구티) F1 새끼를 그런 후에 표적화된 대립유전자의 존재에 대해 유전자형분류를 한다. 하기에서 기술하는 것과 같이 인간화된 TRKB 래트에서 수행한 모든 실험을 자기-삭제 선택 카세트가 자기 삭제된 래트에서 수행하였다.

[0273] **실시예 7. 망막 신경절 세포 (RGC) 생존 TrkB^{hu/hu} 래트에 미치는 TRKB 작용물질 항체 H4H9816P2 및 IgG4 아이소타입 대조군 REGN1945의 영향의 생체내 비교**

[0274] **실험 과정**

[0275] 모든 과정을 안과 및 시력 연구 및 Regeneron Pharmaceuticals, Inc. IACUC의 동물 사용에 대한 ARVO 선언문을 따라 수행하였다. 체중이 각각 200 내지 250 g인 생후 8 내지 10주령의 성체 암컷 TrkB 인간화된 래트 (MAID100010)를 사용하였다. 래트에 대한 모든 수술 과정을 케타민 (63 mg/kg) 및 자일라진 (6.0 mg/kg)의 복강내 주사를 사용하는 일반 마취과정 하에 수행하였다. 각막 보호를 위해 에리트로마이신 (0.5%, Bausch & Lomb)을 함유한 눈 연고를 각막에 적용하였다.

[0276] **안와내 시신경 축색절단 및 유리체내 주사.** 좌측 시신경 (ON)을 안와내로 노출시키고, 그것의 경막을 개방하였다. ON을 구제 뒤 약 1.5 mm에서 가로로 절개하였다. 망막으로의 혈액 공급을 손상시키는 것을 피하기 위해 주의를 기울였다. 유리체내 주사를 50 μ L 해밀턴 주사기에 연결된 잡아당기는 유리 피펫을 사용하여 파스 평면 바로 뒤에서 수행하였다. 수정체를 손상시키지 않도록 주의를 기울였다. 임의의 유의한 수술후 합병증 (예컨대, 망막 허혈, 백내장)을 가진 래트를 추가 분석으로부터 배제하였다. 동물을 상이한 실험 그룹에 할당하였다. ON 축색절단 후 3 및 10일째에 한 대조군 그룹에 3 μ L의 아이소타입 대조군 REGN1945 (46.6 μ g/ μ L)를 유리체내에 주사하였고; 다른 그룹에는 3 μ L의 항-인간 TRKB 항체 H4H9816P2 (45.7 μ g/ μ L)를 주사하였다.

[0277] **생존 가능한 망막 신경절 세포 (RGC)의 면역조직화학적 염색 및 계수.** BRN3A (뇌-특이적 호메오박스/POU 도메인 단백질 3A)를, 그것이 ON 손상 후 망막의 전체 마운트의 생존 가능한 RGC의 선택적 표지화에 대한 효율적이고 신뢰할만한 방법인 것으로 나타났기 때문에, 생존하는 망막 신경절 세포 (RGC)에 대한 마커로서 사용하였다. 예컨대, Nadal-Nicolás et al. (2009) *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 50(8):3860-3868 (모든 목적에 대해 그 전문이 본원에 참조로 포함됨)을 참조한다. BRN3A에 대해 면역염색하기 위하여, 망막을 10% 정상 당나귀 혈청 및 0.5% Triton X-100에서 1시간 동안 차단한 후, BRN3A 항체 (1:400; Cat#: sc-31984, Santa Cruz)를 포함한 동일한 배지에서 2시간 동안 실온에서 인큐베이션하였다. 망막을 추가로 세척한 후 Alexa594-콘주게이트된 당나귀 항-염소 이차 항체 (1:400; Cat#: A-11058, Invitrogen)와 함께 밤새 4°C에서 인큐베이션하였다.

[0278] **결과 및 결론**

[0279] 생체내에서 RGC 생존율에 미치는 TRKB 작용물질 항체의 영향을 평가하기 위하여, 본 발명자들은 완전한 시신경절단 모델을 사용하였다. TRKB 작용물질 항체 (H4H9816P2) 또는 아이소타입 대조군 항체를 수술 후 3일 및 10일째에 적용하였다. 동물을 축색절단 후 14일 후에 안락사시켰다. 손상되지 않은 반대쪽 눈의 RGC 밀도는 3개의 TRKB 유전자형 (동형접합성 인간화된, 이형접합성 인간화된, 및 야생형)에서 유사하고, **표 20**에서 나타난 것과 같이 평균 약 1600 per mm^2 이다. 생존하는 RGC의 밀도를 BRN3A 염색을 사용하여 망막 전체 마운트에서 평가하였다. 본 발명자들은 동형접합성 TrkB^{hu/hu} 인간화된 래트에서, TRKB 작용물질 항체 (H4H9816P2)가 대조군과 비교하여 RGC 생존율을 상당히 ($p < 0.01$, Mann-Whitney 테스트) 증가시켰음을 발견하였다 (mm^2 당 255 ± 66 대비 685 ± 106). 이형접합성 TrkB^{hu/+} 인간화된 래트에서도, 또한 TrkB 작용물질 Ab의 상당한 ($p < 0.05$, Mann-Whitney 테스트) 생존 효과가 있다 (mm^2 당 208 ± 50 대비 444 ± 90 RGC). 야생형 래트에서는, 아이소타입 대조군과 비교하여 TRKB 작용물질 항체로 처리된 래트에서 유의하지는 않지만 약간의 RGC 수의 증가가 있었다 (**표 21**).

결론적으로, TRKB 작용물질 항체 (H4H9816P2)는 TrkB^{hu/hu} 인간화된 래트에서 RGC 생존율을 상당히 증가시켰다.

표 20

단일손상 대조군 눈에서 RGC 정량화 (RGCs /mm²).

hu/hu	hu/+	+/+
1637.3	1720.4	1636.3
1551.5	2064.6	1670.2
1651.4	1738.8	1873.4
1628.2	2029.8	1725.4
1804.7	1929.6	1973.4
1741.3	1645.9	
1739.7	1761.5	
1698.8	1787.5	
1862.5	1914.0	
1779.4		

[0280]

표 21

시신경 손상 후 RGC 정량화 (RGC/mm²).

	H4H9816P2					아이소타입 대조군 Ab				
	A:Y1	A:Y2	A:Y3	A:Y4	A:Y5	B:Y1	B:Y2	B:Y3	B:Y4	B:Y5
Hu/Hu	790.1	737.1	756.3	587.8	555.7	322.8	295.0	286.9	171.3	197.9
Hu/+	530.4	457.5	522.9	390.6	319.2	231.0	184.6	265.1	151.3	
+/+	320.9	355.5	256.9	342.7		112.3				

[0281]

[0282]

실시예 8. 실시예에서 사용된 항-TRKB 항체의 중쇄 및 경쇄 가변 영역 아미노산 서열.

[0283]

H4H9780P, H4H9814P, 및 H4H9816P2로 지정된 항체를 포함한, 몇몇 전체 인간 항-TRKB 항체 (즉, 인간 가변 도메인 및 인간 불변 도메인을 가진 항체)를 실시예에서 테스트하였다. 표 22는 실시예에서 사용된 선택된 항-TRKB 항체의 중쇄 및 경쇄 가변 영역 및 CDR의 아미노산 식별자를 제시한다. 표 23은 실시예에서 사용된 선택된 항-TRKB 항체의 중쇄 및 경쇄 가변 영역 및 CDR의 핵산 서열 식별자를 제시한다. 이들 항체는 2018년 11월 28일에 출원된 미국 특허 출원 번호 16/202,881호 (모든 목적에 대해 그 전문이 본원에 참조로 포함됨)에서 보다 상세하게 기술된다.

표 22

항-TRKB 항체에 대한 아미노산 SEQ ID NO.

Ab 명칭	VH	HCDR1	HCDR2	HCDR3	VK	LCDR1	LCDR2	LCDR3
H4H9780P	79	81	83	85	87	89	91	93
H4H9814P	95	97	99	101	103	105	107	109
H4H9816P2	111	113	115	117	119	121	123	125

[0284]

표 23

항-TRKB 항체에 대한 핵산 SEQ ID NO.

Ab 명칭	VH	HCDR1	HCDR2	HCDR3	VK	LCDR1	LCDR2	LCDR3
H4H9780P	78	80	82	84	86	88	90	92
H4H9814P	94	96	98	100	102	104	106	108
H4H9816P2	110	112	114	116	118	120	122	124

[0285]

- [0286] 항체는 전형적으로 본원에서 다음의 명명법에 따라 언급한다: Fc 접두어 (예컨대, "H4H"), 이어서 숫자 식별자 (예컨대, 표 22에서 나타난 것과 같이 "9780", "9816", 등), 이어서 "P" 또는 "P2" 접미어. 항체 표시에서 H4H 접두어는 항체의 특정 Fc 영역 아이소타입을 나타낸다. 그러므로, 이 명명법에 따르면, 항체는 본원에서, 예컨대, "H4H9780P"로 언급될 수 있고, 이것은 인간 IgG4 Fc 영역을 나타낸다. 가변 영역은 항체 표시에서 처음 "H"로 표시되면 전체적으로 인간이다. 기술분야의 당업자에 의해 인지되는 것과 같이, 특정 Fc 아이소타입을 가진 항체는 상이한 Fc 아이소타입을 가진 항체로 전환될 수 있지만 (예컨대, 마우스 IgG1 Fc를 가진 항체는 인간 IgG4를 가진 항체로 전환될 수 있음), 임의의 경우에, 가변 도메인 (CDR을 포함함) - 표 22에서 나타난 숫자 식별자에 의해 표시됨 -은 동일하게 남아 있을 것이고, 항원에 대한 결합 특성은 Fc 도메인의 본질과 관계없이 동일하거나 실질적으로 유사할 것으로 예상된다.
- [0287] **실시예 9. 인간화된 TrkB 래트에서 항-인간 TrkB 작용물질 항체의 신경보호 효과**
- [0288] 하기 실험을 야생형 (WT) 마우스 및 래트에서 및 인간화된 TrkB 마우스 및 래트에서 내인성 TRKB 작용물질, 뇌-유래 신경영양 인자 (BDNF), 및 TRKB 작용물질 단클론성 항체 (mAb)의 신경보호 효과를 평가하기 위해 수행하였다.
- [0289] BDNF 및 TRKB Ab의 시험관내 효과를 분화된 인간 신경모세포종 세포주 SH-SY5Y를 사용하여 세포 생존율 검정에 의해 정량화하였다. 시험관내에서, BDNF 또는 TRKB Ab는 레티노산-분화된 SH-SY5Y 세포에서 세포 생존율을 상당히 증가시켰다. 효과는 BDNF의 경우 1 μ g/mL 또는 TRKB Ab의 경우 10 μ g/mL의 최적 용량으로 벨 모양 용량 반응을 나타냈다. 신경모세포종 세포주 SH-SY5Y를 전체-트랜스 10 μ M 레티노산을 함유한 분화 배지에서 4일 동안 배양하였다. 배양을 상이한 용량의 항체 (0.01-100 μ g/mL)를 함유한 혈청-유리 분화 배지로 교환하였다. 2일 후에, CCK8 시약을 첨가하고, 플레이트를 3-4시간 동안 인큐베이션한 후, OD450을 측정하여 생존하는 세포의 백분율을 결정하였다. 데이터를 항체가 없는 혈청-유리 배지에 대해 표준화하였다. 도 9에서 나타난 것과 같이, TRKB mAb (TrkB mAb1은 H4H9816P2이고; TrkB mAb2는 대조군 TrkB 작용물질 항체임)는 SH-SY5Y 세포의 생존율을 용량 의존적으로 증가시켰다. 인간 아이소타입 대조군은 SH-SY5Y 세포 생존율에 영향을 미치지 못하였다. 항체가 없는 혈청-유리 배지는 100% 생존율을 초래하였다.
- [0290] 그런 후 P2 C57BL/6J 마우스로부터의 망막을 절개하고 분해하였다. 망막 신경절 세포를 면역-패닝에 의해 정제하고 96-웰 플레이트에서 처리하거나 처리 없이 배양하였다. 24시간 후에, MTT (3-(4,5-다이메틸티아졸-2-일)-2,5-다이페닐테트라졸리움 브로마이드)를 각 웰에 첨가하여 각 그룹에 대한 세포 생존율을 계산하였다. 도 10에서 나타난 것과 같이, BDNF는 벨-모양 용량 곡선을 가졌고 1 μ g/mL에서 최적 용량을 가졌다. TrkB mAb2 (인간 TrkB, 마우스 TrkB, 및 래트 TrkB에 대한 친화성을 가진 대조군 TrkB 작용물질 항체)는 더 높은 용량에서도 벨-모양 곡선을 가질 수 있지만 신경보호 효과를 나타낸다.
- [0291] 생체내 신경보호 효과를 테스트하기 위하여, WT 및 인간화된 TrkB 마우스 및 래트를 사용하였다. 동물은 시신경 절개 (ONT) 후 3일 및 10일째에 BDNF 또는 TRKB mAb의 유리체내 (IVT) 주사를 받았다. 망막 신경절 세포 (RGC) 수를 망막 플랫 마운트 상에서 Brn3a IHC에 의한 시신경 절단 후 마우스의 경우 1주 후에 또는 래트의 경우 2주 후에 HALO 소프트웨어 (Indica Labs)를 사용하여 정량화하였다.
- [0292] 시신경 절단 후 1 또는 2주 후에 TrkB^{hu/hu} 마우스에서 RGC 사멸은 WT 마우스와 유사하였다. BDNF 또는 TRKB Ab는 WT 또는 TrkB^{hu/hu} 마우스에서 작은 또는 유의하지 않은 신경보호 효과를 가졌다. 대조적으로, TrkB^{hu/hu} 래트에서는 IVT TRKB Ab로 상당한 RGC 신경보호가 있었다. IVT TRKB Ab 처리 후에 체중의 감소가 TrkB^{hu/hu} 마우스에서 관찰되었지만 래트에서는 그렇지 않았다. BDNF는 마우스나 래트에서 체중에 아무 영향을 미치지 못하였다.
- [0293] **도 11A 및 11B**는 WT 마우스 및 래트에서의 시신경 절단 모델에서 신경보호를 평가하는 실험의 결과를 도시한다. **도 11A**에서, 생후 8 내지 9주령의 다크 아구티 래트에 절단 후 3 및 10일 후에 BDNF (5 μ g), TrkB mAb2 (18 μ g), 아이소타입 대조군 항체 (18 μ g), 또는 비히클 대조군을 유리체내로 제공하였다. TrkB mAb2는 인간 TrkB, 마우스 TrkB, 및 래트 TrkB에 대해 친화성을 가진 대조군 TrkB 작용물질 항체이다. 절단 후 14일 후에 망막을 절개하고 망막 신경절 세포에 대해 염색하였다. BDNF 및 TRKB mAb는 망막 신경절 세포 (RGC) 밀도에 의해 측정되는 바 상당한 신경보호를 나타냈다. **도 11B**에서, 생후 8주령의 C57BL/6J WT 마우스에 절단 후 3 및 10일 후에 BDNF (2.5 μ g), TrkB mAb2 (10 μ g), 아이소타입 대조군 항체 (10 μ g), 또는 비히클 대조군을 유리체내로 제공하였다. TrkB mAb2는 인간 TrkB, 마우스 TrkB, 및 래트 TrkB에 대해 친화성을 가진 대조군 TrkB 작용물질

질 항체이다. 그러므로, BDNF 및 TRKB mAb 처리는 시신경 절단 후 야생형 래트에서 절개된 망막에서 RGC 밀도의 상당한 증가를 초래한 반면, 야생형 마우스에서의 동일 모델에서 RGC 밀도에 대한 유의한 영향은 관찰되지 않았다.

[0294] **도 12A** 및 **12B**는 WT 마우스 및 래트에서 BDNF 용량 반응을 도시한다. **도 12A**에서, WT 마우스에서의 시신경 크러시 (ONC) 모델에서 BDNF 용량 반응은 신경보호의 작은 창을 보여준다. **도 12B**는 0.13 μg 내지 30 μg 의 WT 래트에서의 시신경 절단 모델에서 DNF 용량 반응을 보여준다. 0.8 μg 의 최적 용량으로, 시험관내 데이터와 유사한 벨-모양 반응이 있다. 절단 후 14일 후에 망막을 절개하고 망막 신경절 세포에 대해 염색하였다. 그러므로, BDNF 처리는 시신경 크러시 후 야생형 마우스에서 절개된 망막의 RGC 밀도에 의해 측정되는 바 훨씬 덜 뚜렷한 BDNF 용량 반응 곡선과 비교하여, 시신경 절단 후 야생형 래트에서 절개된 망막의 RGC 밀도에 의해 측정되는 바 훨씬 더 뚜렷한 용량 반응 곡선을 초래하였다.

[0295] 다음에 TRKB Ab의 신경보호 효과를 인간화된 TrkB 래트에서 테스트하였다. **도 13A** 및 **13B**의 결과는 시신경 절단된 인간화된 TrkB 래트에서 TRKB mAb의 유리체내 주사가 망막 신경절 세포의 상당한 신경보호를 나타내는 것을 보여준다. 인간 TRKB 동형접합성, 인간 TRKB 이형접합성, 또는 야생형 TrkB 래트에게 시신경 절단 후 3 및 10일 째에 TrkB mAb1 또는 아이소타입 대조군 항체를 유리체내로 (3 μL) 제공하였다. 절단 후 14일 후, 망막을 절개하고 RGC에 대해 염색하였다. 래트는 생후 17 내지 19주령의 암컷이었다. **도 13A**에서 나타난 것과 같이, TrkB mAb1 (H4H9816P2)로 처리된 래트는 아이소타입 대조군 항체로 처리된 상응하는 래트와 비교하여 3가지의 유전자형에서 전부 신경보호를 나타냈다. 인간 TRKB에 대한 아이소타입-대조군-처리된 동형접합성 및 이형접합성 래트는 아이소타입-대조군-처리된 야생형 래트보다 높은 RGC 밀도를 가진다. **도 13B**는 유전자형간의 나이브 눈에서의 RGC 수 차이를 도시한다. **도 13C**는 절단 후 14일 후에 TrkB 작용물질 항체 (H4H9816P2) 또는 아이소타입 대조군 항체 (REGN1945) 중 하나가 제공된 인간 TRKB 동형접합성 마우스의 체중을 도시한다.

[0296] 그런 다음 3개의 유전자형에서 손상되지 않은 및 처리된 손상된 눈의 Brn3a 표지된 세포를 보여주는 래트 망막의 전체 마운트 RGC 등밀도 지도를 생성하였다 (데이터 미도시). 전체 마운트 재구성을 형광 현미경 (Nikon Eclipse Ti) 상의 전동 스테이지의 도움을 받아 제조하였다. RGC를 이미지 분석 소프트웨어 (HALO[®]; Indica Labs, Corrales, NM, USA)를 사용하여 계수하였다. 등밀도 지도를 Matlab을 통해 생성하였다. 아이소타입-대조군-처리된 래트와 비교하여 더 높은 RGC 밀도를 TrkB mAb1 (H4H9816P2)로 처리된 인간화된 TrkB 래트로 관찰하였다 (데이터 미도시).

[0297] 이들을 함께 취하면, **도 11A**, **11B**, **12A**, **12B**, 및 **13A-13C**에 도시된 데이터는 TRKB 작용물질 mAb의 유리체내 투여가, 인간화된 TrkB 마우스에서 시신경 손상 후 관찰된 작은 또는 유의하지 않은 신경보호 효과와는 대조적으로, 인간화된 TrkB 래트에서 시신경 손상 후 상당한 신경보호 효과를 나타내는 것을 입증한다.

[0298] 시신경 절단 (ONT) 모델에서 래트에서의 RGC 생존율에 미치는 TRKB 작용물질 항체의 영향을 추가로 평가하기 위하여, 용량-반응 연구를 진행하였다. 생후 1 내지 9개월의 인간 TRKB 동형접합성 래트 (MAID100010; 75%SD, 25% DA)를 사용하였다. 6마리의 래트를 각 그룹에 사용하였다. 인간 TRKB 동형접합성 래트에게 시신경 절단 후 3 및 10일 째에 상이한 용량의 TrkB mAb1 또는 아이소타입 대조군 항체 (REGN1945)를 유리체내로 (3 μL) 제공하였다. 절단 후 14일 후에, 망막을 절개하고 RGC에 대해 염색하였다. **도 14**에서 나타난 것과 같이, TrkB mAb1은 TrkB 인간화된 래트에서 RGC 생존율을 용량 의존적으로 증가시켰다.

[0299] 다음에, 상이한 TrkB 작용물질 항체의 신경보호 효과를 시신경 절단 (ONT) 모델에서 인간 TRKB 동형접합성 래트에서 비교하였다. 생후 8 내지 10주령의 인간화된 TrkB 래트 (MAID100010; 75%SD, 25% DA)를 사용하였다. 5 내지 6마리의 래트를 각 그룹에 사용하였다. 인간 TRKB 동형접합성 래트에 시신경 절단 후 3 및 10일 째에 H4H9816P2-L9 (10 μg), H4H9814P-L9 (10 μg), H4H9780P-L5 (10 μg), 이 세가지 전부의 조합 (각각 3.3 μg), 또는 아이소타입 대조군 항체 (REGN1945; 10 μg)를 유리체내로 (3 μL) 제공하였다. 절단 후 14일 후에, 망막을 절개하고 RGC에 대해 염색하였다. 그 결과를 **도 15A** 및 **15B**에 나타낸다. 각각의 TrkB 작용물질 항체는 아이소타입 대조군 항체에 비교하여 신경보호 효과를 가졌다. 각 그룹에서의 체중은 유사하였다 (데이터 미도시).

[0300] 대조적으로, TrkB 작용물질 항체 H4H9780P 및 H4H9814P는 야생형 래트에서 어떠한 신경보호 효과를 갖지 못하였다. 신경보호 효과를 시신경 절단 (ONT) 모델을 사용하여 야생형 래트에서 평가하였다. 생후 8 내지 10주령의 암컷 야생형 래트를 사용하였다. 5 내지 6마리의 래트를 각 그룹에 사용하였다. 야생형 래트에 시신경 절단 후 3 및 10일 째에 H4H9780P (120 μg), H4H9814P (120 μg), 또는 아이소타입 대조군 항체 (REGN1945; 120 μg)를 유리체내로 (3 μL) 제공하였다. 절단 후 14일 후에, 망막을 절개하고 RGC에 대해 염색하였다. **도 16**에서 나

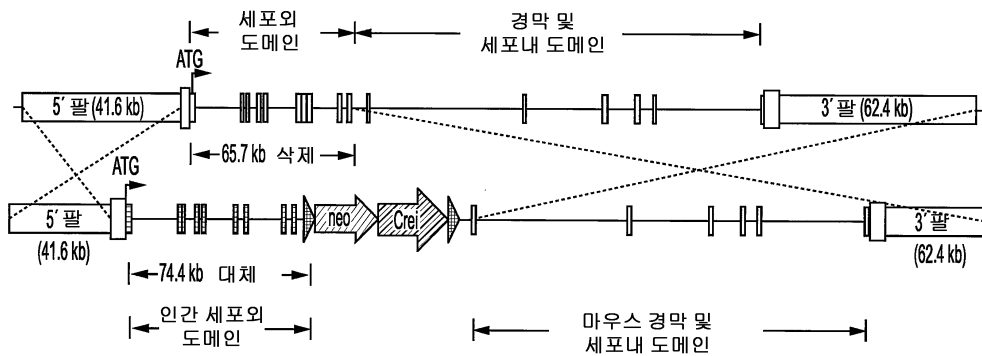
타낸 것과 같이, TrkB 작용물질 항체는 어느 것도 야생형 래트에서 유의한 신경보호 효과를 갖지 못하였다.

[0301]

이에 더불어, TrkB 작용물질 항체 (H4H9780P)은 인간 TRKB 동형접합성 마우스에서 신경보호 효과를 갖지 못하였다. 생후 5개월의 수컷 인간 TRKB 동형접합성 마우스 (MAID7139; 75% C57BL/6, 25% 129)를 사용하였다. 5 내지 6마리의 래트를 각 그룹에 사용하였다. 인간 TRKB 동형접합성 마우스에 시신경 절단 후 3 및 10일 째에 H4H9780P (한 눈 당 40 μ g) 또는 아이소타입 대조군 항체 (REGN1945; 한 눈 당 40 μ g)를 유리체내로 (1 μ L) 제공하였다. 절단 후 14일 후에, 망막을 절개하고 RGC에 대해 염색하였다. 도 17A 및 17B에서 나타난 것과 같이, TrkB 작용물질 항체는 인간 TRKB 동형접합성 래트에서 볼 수 있는 신경보호 효과와는 대조적으로 인간 TRKB 동형접합성 마우스에서 신경보호 효과를 나타내지 못하였다. 도 17C는 절단 후 14일 째에 H4H9780P 또는 아이소타입 대조군 항체를 받은 인간 TRKB 동형접합성 마우스의 체중을 도시한다.

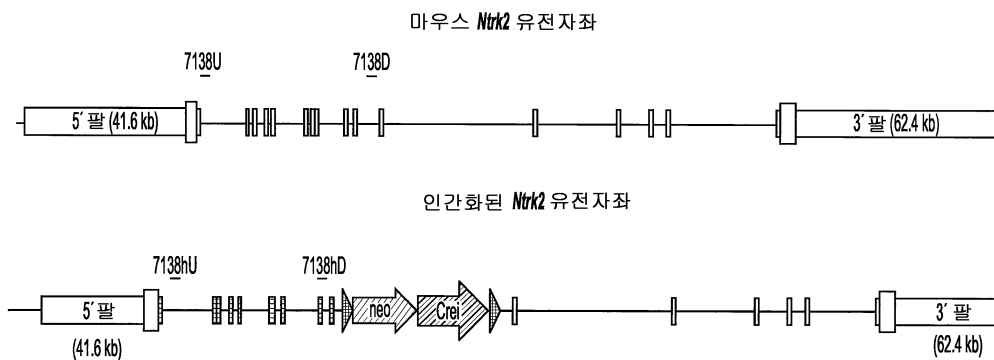
도면

도면1



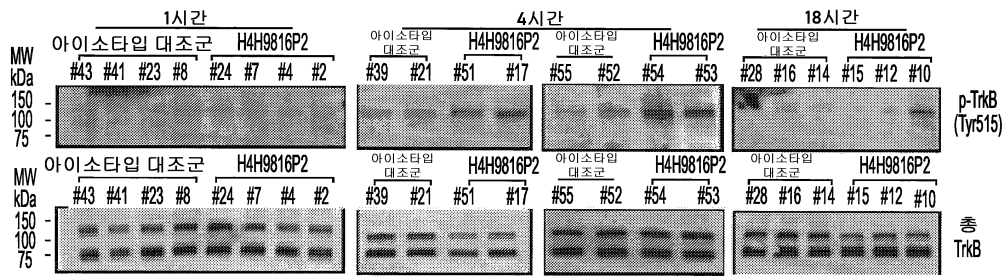
도 1

도면2



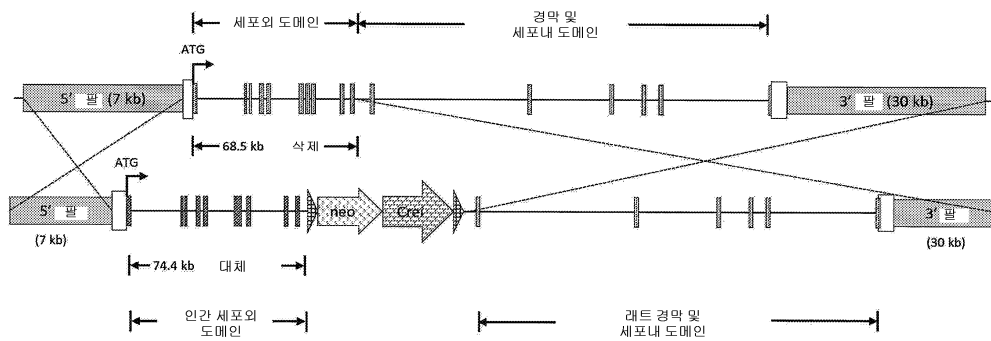
도 2

도면3



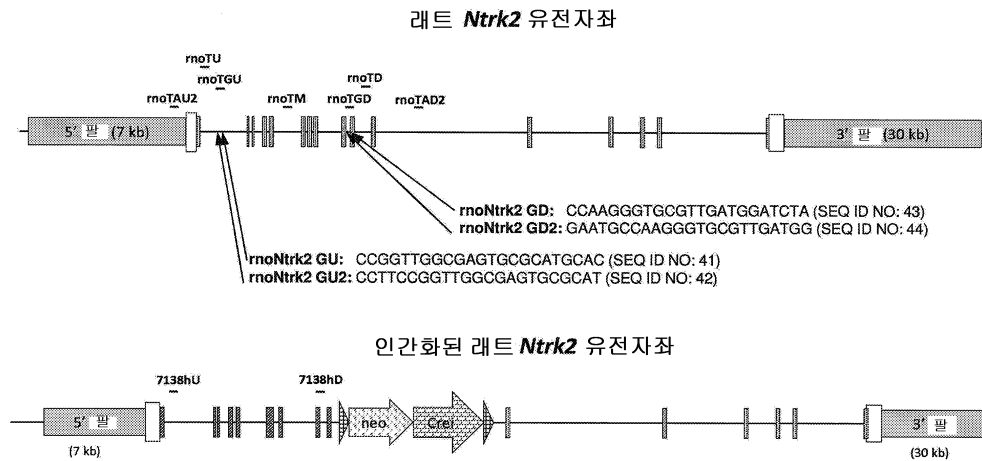
도 3

도면4

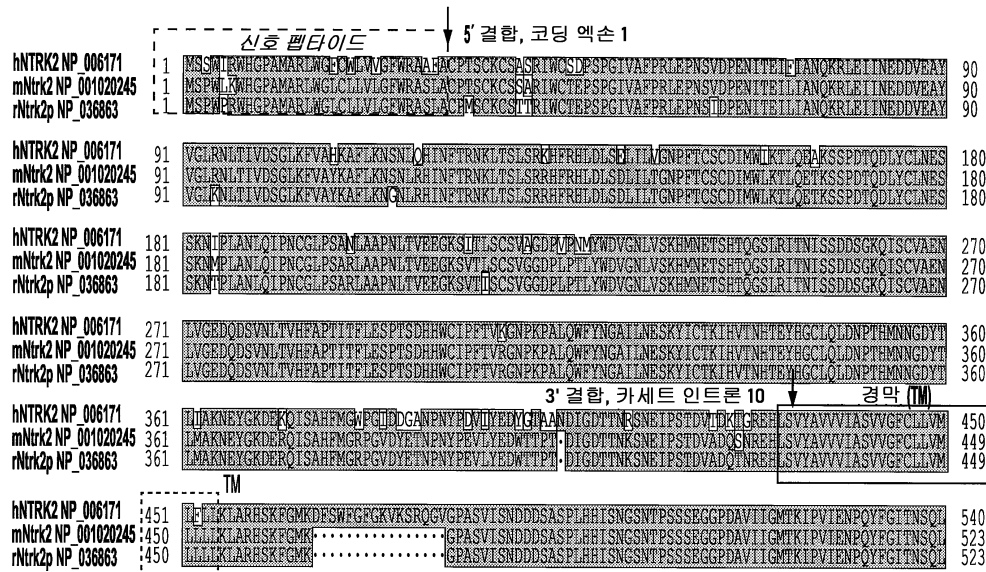


도 4

도면5

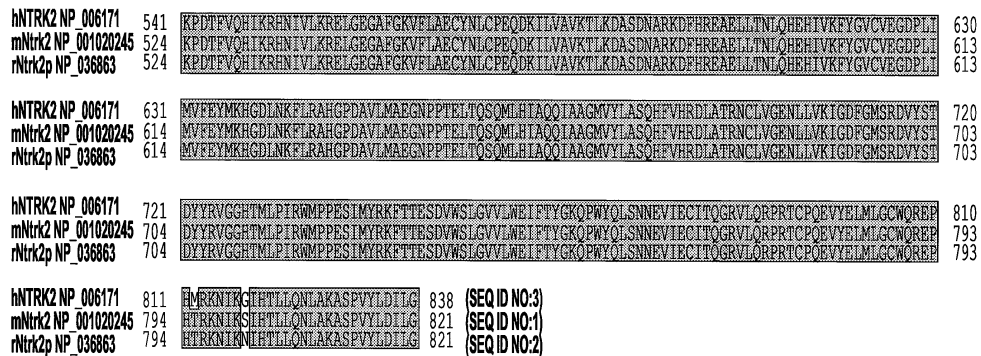


도면6



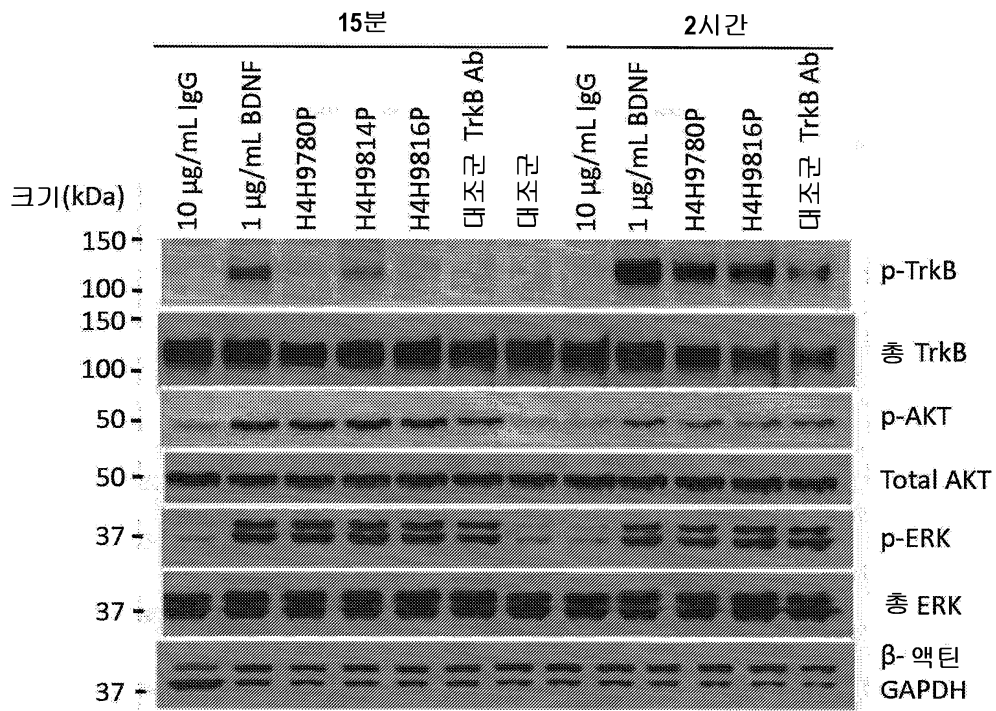
도 6

도면6a



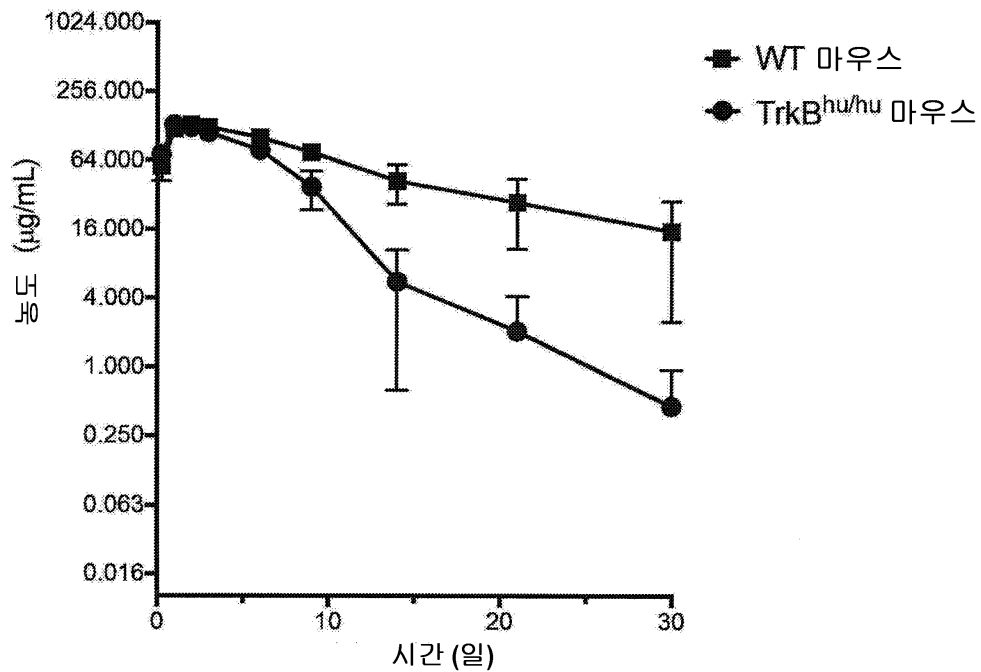
도 6 (계속)

도면7



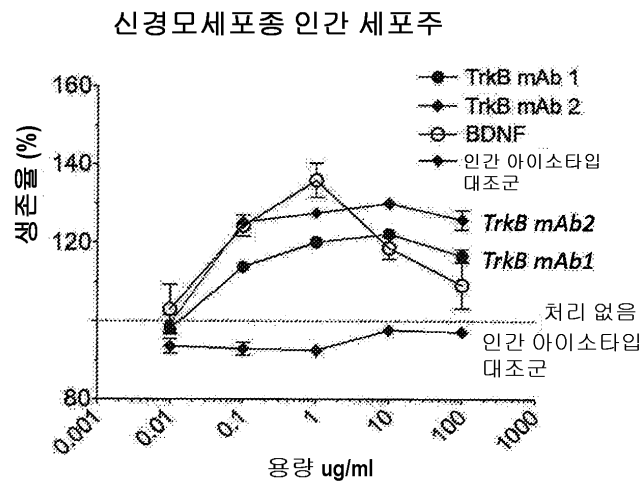
도 7

도면8



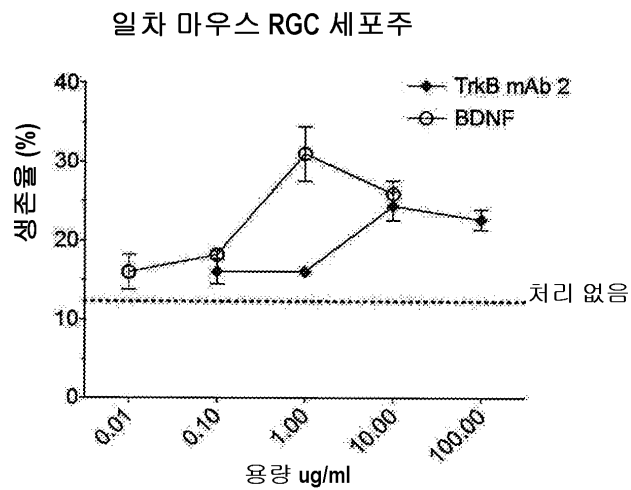
도 8

도면9



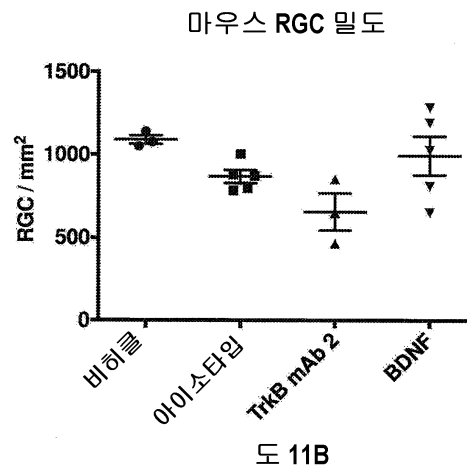
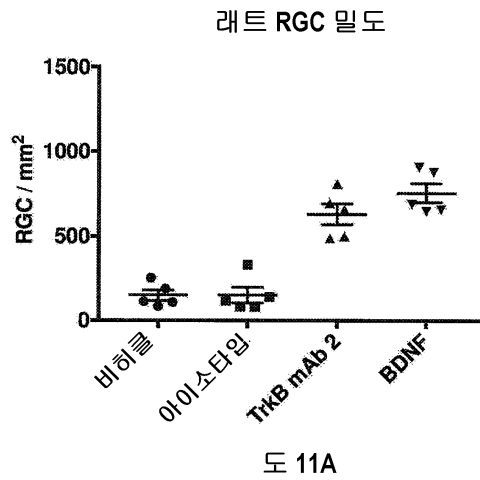
도 9

도면10

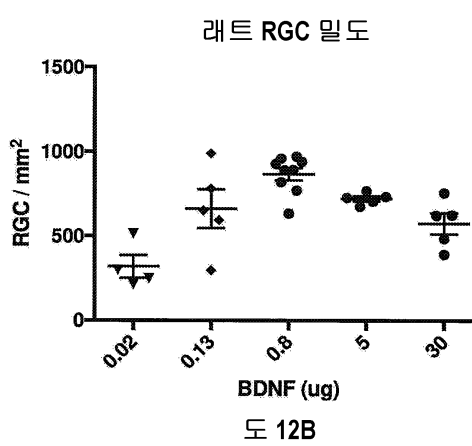
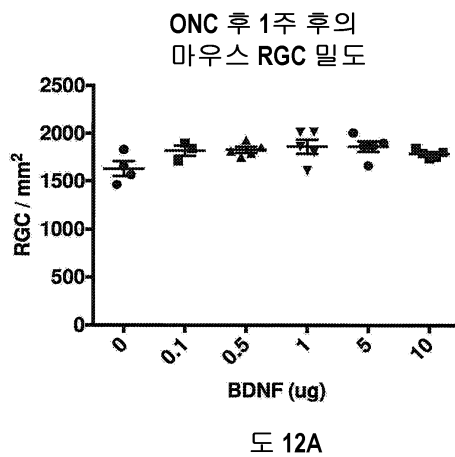


도 10

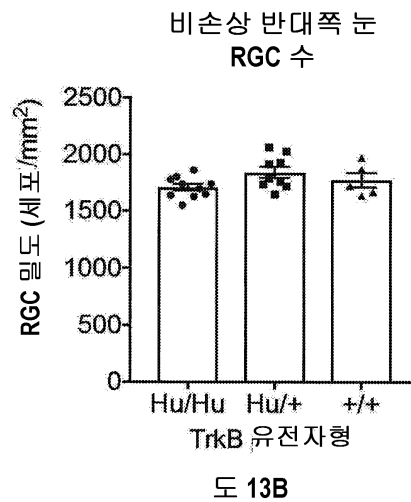
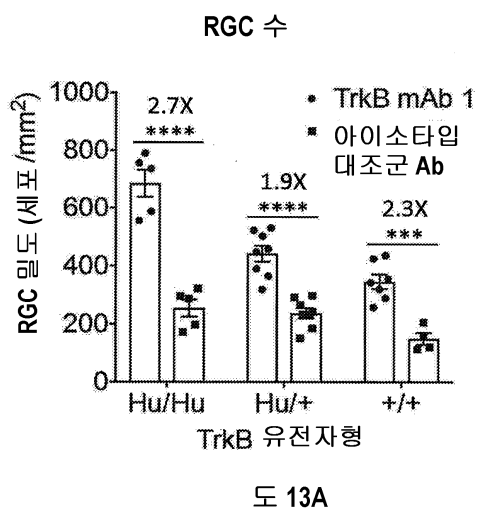
도면11



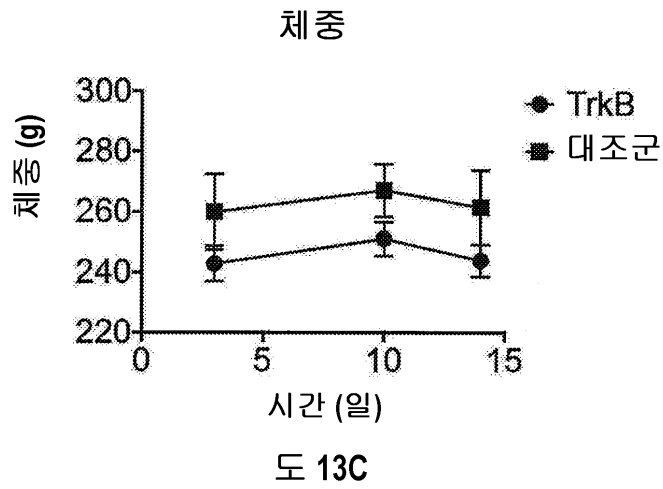
도면12



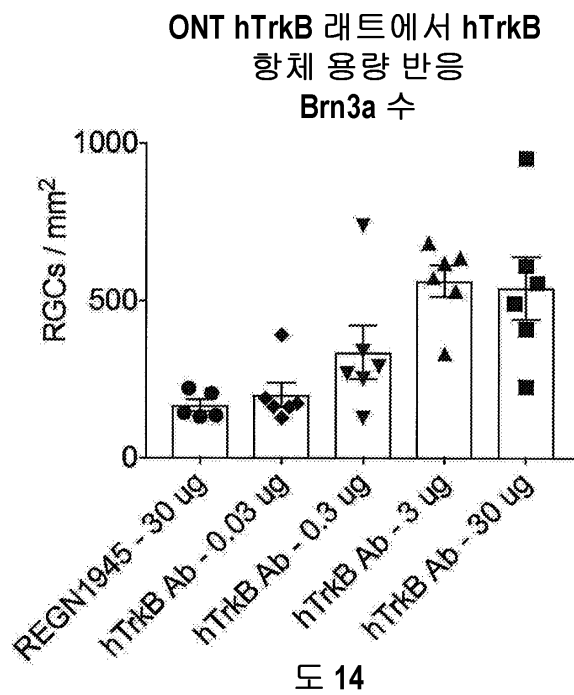
도면13ab



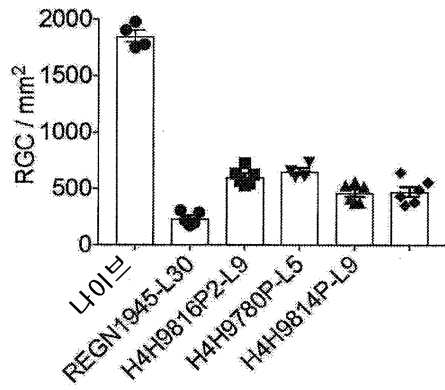
도면13c



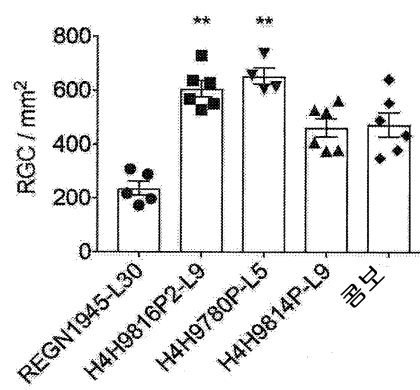
도면14



도면15

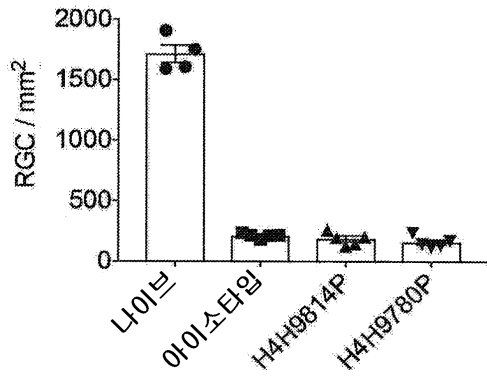


도 15A



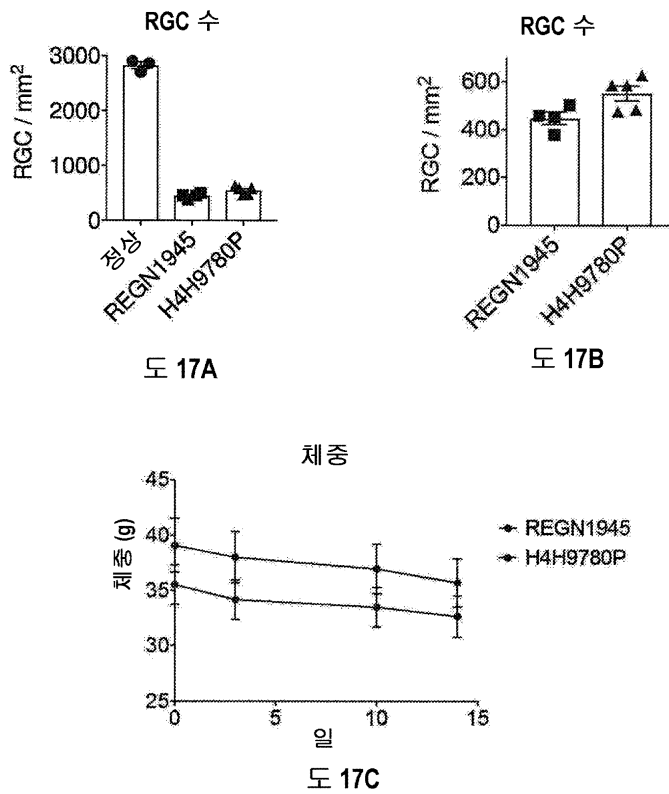
도 15B

도면16



도 16

도면17



서열 목록

SEQUENCE LISTING

- <110> Regeneron Pharmaceuticals, Inc.
- <120> NON-HUMAN ANIMALS COMPRISING A HUMANIZED TRKB LOCUS
- <130> 57766-523380
- <150> US 62/592,905
- <151> 2017-11-30
- <150> US 62/661,373
- <151> 2018-04-23
- <160> 125
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 821
- <212> PRT
- <213> Mus musculus
- <220><221> MISC_FEATURE
- <222> (1)..(31)

<223> Signal Peptide

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (32)..(429)

<223> Extracellular Domain

<220

><221> MISC_FEATURE

<222> (430)..(453)

<223> Transmembrane Domain

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (454)..(821)

<223> Cytoplasmic Domain

<400> 1

Met Ser Pro Trp Leu Lys Trp His Gly Pro Ala Met Ala Arg Leu Trp

1 5 10 15

Gly Leu Cys Leu Leu Val Leu Gly Phe Trp Arg Ala Ser Leu Ala Cys

20 25 30

Pro Thr Ser Cys Lys Cys Ser Ser Ala Arg Ile Trp Cys Thr Glu Pro

35 40 45

Ser Pro Gly Ile Val Ala Phe Pro Arg Leu Glu Pro Asn Ser Val Asp

50 55 60

Pro Glu Asn Ile Thr Glu Ile Leu Ile Ala Asn Gln Lys Arg Leu Glu

65 70 75 80

Ile Ile Asn Glu Asp Asp Val Glu Ala Tyr Val Gly Leu Arg Asn Leu

85 90 95

Thr Ile Val Asp Ser Gly Leu Lys Phe Val Ala Tyr Lys Ala Phe Leu

100 105 110

Lys Asn Ser Asn Leu Arg His Ile Asn Phe Thr Arg Asn Lys Leu Thr

115 120 125

Ser Leu Ser Arg Arg His Phe Arg His Leu Asp Leu Ser Asp Leu Ile

130 135 140

Leu Thr Gly Asn Pro Phe Thr Cys Ser Cys Asp Ile Met Trp Leu Lys

145 150 155 160

Thr Leu Gln Glu Thr Lys Ser Ser Pro Asp Thr Gln Asp Leu Tyr Cys

165 170 175
 Leu Asn Glu Ser Ser Lys Asn Met Pro Leu Ala Asn Leu Gln Ile Pro
 180 185 190
 Asn Cys Gly Leu Pro Ser Ala Arg Leu Ala Ala Pro Asn Leu Thr Val
 195 200 205
 Glu Glu Gly Lys Ser Val Thr Leu Ser Cys Ser Val Gly Gly Asp Pro
 210 215 220
 Leu Pro Thr Leu Tyr Trp Asp Val Gly Asn Leu Val Ser Lys His Met
 225 230 235 240

 Asn Glu Thr Ser His Thr Gln Gly Ser Leu Arg Ile Thr Asn Ile Ser
 245 250 255
 Ser Asp Asp Ser Gly Lys Gln Ile Ser Cys Val Ala Glu Asn Leu Val
 260 265 270
 Gly Glu Asp Gln Asp Ser Val Asn Leu Thr Val His Phe Ala Pro Thr
 275 280 285
 Ile Thr Phe Leu Glu Ser Pro Thr Ser Asp His His Trp Cys Ile Pro
 290 295 300

 Phe Thr Val Arg Gly Asn Pro Lys Pro Ala Leu Gln Trp Phe Tyr Asn
 305 310 315 320
 Gly Ala Ile Leu Asn Glu Ser Lys Tyr Ile Cys Thr Lys Ile His Val
 325 330 335
 Thr Asn His Thr Glu Tyr His Gly Cys Leu Gln Leu Asp Asn Pro Thr
 340 345 350
 His Met Asn Asn Gly Asp Tyr Thr Leu Met Ala Lys Asn Glu Tyr Gly
 355 360 365

 Lys Asp Glu Arg Gln Ile Ser Ala His Phe Met Gly Arg Pro Gly Val
 370 375 380
 Asp Tyr Glu Thr Asn Pro Asn Tyr Pro Glu Val Leu Tyr Glu Asp Trp
 385 390 395 400
 Thr Thr Pro Thr Asp Ile Gly Asp Thr Thr Asn Lys Ser Asn Glu Ile
 405 410 415

Pro Ser Thr Asp Val Ala Asp Gln Ser Asn Arg Glu His Leu Ser Val
420 425 430

Tyr Ala Val Val Val Ile Ala Ser Val Val Gly Phe Cys Leu Leu Val
435 440 445

Met Leu Leu Leu Leu Lys Leu Ala Arg His Ser Lys Phe Gly Met Lys
450 455 460

Gly Pro Ala Ser Val Ile Ser Asn Asp Asp Asp Ser Ala Ser Pro Leu
465 470 475 480

His His Ile Ser Asn Gly Ser Asn Thr Pro Ser Ser Ser Glu Gly Gly
485 490 495

Pro Asp Ala Val Ile Ile Gly Met Thr Lys Ile Pro Val Ile Glu Asn
500 505 510

Pro Gln Tyr Phe Gly Ile Thr Asn Ser Gln Leu Lys Pro Asp Thr Phe
515 520 525

Val Gln His Ile Lys Arg His Asn Ile Val Leu Lys Arg Glu Leu Gly
530 535 540

Glu Gly Ala Phe Gly Lys Val Phe Leu Ala Glu Cys Tyr Asn Leu Cys
545 550 555 560

Pro Glu Gln Asp Lys Ile Leu Val Ala Val Lys Thr Leu Lys Asp Ala
565 570 575

Ser Asp Asn Ala Arg Lys Asp Phe His Arg Glu Ala Glu Leu Leu Thr
580 585 590

Asn Leu Gln His Glu His Ile Val Lys Phe Tyr Gly Val Cys Val Glu
595 600 605

Gly Asp Pro Leu Ile Met Val Phe Glu Tyr Met Lys His Gly Asp Leu
610 615 620

Asn Lys Phe Leu Arg Ala His Gly Pro Asp Ala Val Leu Met Ala Glu
625 630 635 640

Gly Asn Pro Pro Thr Glu Leu Thr Gln Ser Gln Met Leu His Ile Ala
645 650 655

Gln Gln Ile Ala Ala Gly Met Val Tyr Leu Ala Ser Gln His Phe Val

660 665 670
 His Arg Asp Leu Ala Thr Arg Asn Cys Leu Val Gly Glu Asn Leu Leu
 675 680 685

 Val Lys Ile Gly Asp Phe Gly Met Ser Arg Asp Val Tyr Ser Thr Asp
 690 695 700
 Tyr Tyr Arg Val Gly Gly His Thr Met Leu Pro Ile Arg Trp Met Pro
 705 710 715 720
 Pro Glu Ser Ile Met Tyr Arg Lys Phe Thr Thr Glu Ser Asp Val Trp
 725 730 735
 Ser Leu Gly Val Val Leu Trp Glu Ile Phe Thr Tyr Gly Lys Gln Pro
 740 745 750

 Trp Tyr Gln Leu Ser Asn Asn Glu Val Ile Glu Cys Ile Thr Gln Gly
 755 760 765
 Arg Val Leu Gln Arg Pro Arg Thr Cys Pro Gln Glu Val Tyr Glu Leu
 770 775 780
 Met Leu Gly Cys Trp Gln Arg Glu Pro His Thr Arg Lys Asn Ile Lys
 785 790 795 800
 Ser Ile His Thr Leu Leu Gln Asn Leu Ala Lys Ala Ser Pro Val Tyr
 805 810 815

 Leu Asp Ile Leu Gly
 820

 <210> 2
 <211> 821
 <212> PRT
 <213> Rattus norvegicus
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(31)
 <223> Signal Peptide
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (32)..(429)
 <223> Extracellular Domain
 <220><221> MISC_FEATURE

<222> (430)..(453)

<223> Transmembrane Domain

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (454)..(821)

<223> Cytoplasmic Domain

<400> 2

Met Ser Pro Trp Pro Arg Trp His Gly Pro Ala Met Ala Arg Leu Trp

1 5 10 15

Gly Leu Cys Leu Leu Val Leu Gly Phe Trp Arg Ala Ser Leu Ala Cys

20 25 30

Pro Met Ser Cys Lys Cys Ser Thr Thr Arg Ile Trp Cys Thr Glu Pro

35 40 45

Ser Pro Gly Ile Val Ala Phe Pro Arg Leu Glu Pro Asn Ser Ile Asp

50 55 60

Pro Glu Asn Ile Thr Glu Ile Leu Ile Ala Asn Gln Lys Arg Leu Glu

65 70 75 80

Ile Ile Asn Glu Asp Asp Val Glu Ala Tyr Val Gly Leu Lys Asn Leu

85 90 95

Thr Ile Val Asp Ser Gly Leu Lys Phe Val Ala Tyr Lys Ala Phe Leu

100 105 110

Lys Asn Gly Asn Leu Arg His Ile Asn Phe Thr Arg Asn Lys Leu Thr

115 120 125

Ser Leu Ser Arg Arg His Phe Arg His Leu Asp Leu Ser Asp Leu Ile

130 135 140

Leu Thr Gly Asn Pro Phe Thr Cys Ser Cys Asp Ile Met Trp Leu Lys

145 150 155 160

Thr Leu Gln Glu Thr Lys Ser Ser Pro Asp Thr Gln Asp Leu Tyr Cys

165 170 175

Leu Asn Glu Ser Ser Lys Asn Thr Pro Leu Ala Asn Leu Gln Ile Pro

180 185 190

Asn Cys Gly Leu Pro Ser Ala Arg Leu Ala Ala Pro Asn Leu Thr Val

195 200 205
 Glu Glu Gly Lys Ser Val Thr Ile Ser Cys Ser Val Gly Gly Asp Pro
 210 215 220
 Leu Pro Thr Leu Tyr Trp Asp Val Gly Asn Leu Val Ser Lys His Met
 225 230 235 240
 Asn Glu Thr Ser His Thr Gln Gly Ser Leu Arg Ile Thr Asn Ile Ser
 245 250 255
 Ser Asp Asp Ser Gly Lys Gln Ile Ser Cys Val Ala Glu Asn Leu Val
 260 265 270

 Gly Glu Asp Gln Asp Ser Val Asn Leu Thr Val His Phe Ala Pro Thr
 275 280 285
 Ile Thr Phe Leu Glu Ser Pro Thr Ser Asp His His Trp Cys Ile Pro
 290 295 300
 Phe Thr Val Arg Gly Asn Pro Lys Pro Ala Leu Gln Trp Phe Tyr Asn
 305 310 315 320
 Gly Ala Ile Leu Asn Glu Ser Lys Tyr Ile Cys Thr Lys Ile His Val
 325 330 335

 Thr Asn His Thr Glu Tyr His Gly Cys Leu Gln Leu Asp Asn Pro Thr
 340 345 350
 His Met Asn Asn Gly Asp Tyr Thr Leu Met Ala Lys Asn Glu Tyr Gly
 355 360 365
 Lys Asp Glu Arg Gln Ile Ser Ala His Phe Met Gly Arg Pro Gly Val
 370 375 380
 Asp Tyr Glu Thr Asn Pro Asn Tyr Pro Glu Val Leu Tyr Glu Asp Trp
 385 390 395 400

 Thr Thr Pro Thr Asp Ile Gly Asp Thr Thr Asn Lys Ser Asn Glu Ile
 405 410 415
 Pro Ser Thr Asp Val Ala Asp Gln Thr Asn Arg Glu His Leu Ser Val
 420 425 430
 Tyr Ala Val Val Val Ile Ala Ser Val Val Gly Phe Cys Leu Leu Val
 435 440 445

Met Leu Leu Leu Leu Lys Leu Ala Arg His Ser Lys Phe Gly Met Lys
450 455 460

Gly Pro Ala Ser Val Ile Ser Asn Asp Asp Asp Ser Ala Ser Pro Leu
465 470 475 480

His His Ile Ser Asn Gly Ser Asn Thr Pro Ser Ser Ser Glu Gly Gly
485 490 495

Pro Asp Ala Val Ile Ile Gly Met Thr Lys Ile Pro Val Ile Glu Asn
500 505 510

Pro Gln Tyr Phe Gly Ile Thr Asn Ser Gln Leu Lys Pro Asp Thr Phe
515 520 525

Val Gln His Ile Lys Arg His Asn Ile Val Leu Lys Arg Glu Leu Gly
530 535 540

Glu Gly Ala Phe Gly Lys Val Phe Leu Ala Glu Cys Tyr Asn Leu Cys
545 550 555 560

Pro Glu Gln Asp Lys Ile Leu Val Ala Val Lys Thr Leu Lys Asp Ala
565 570 575

Ser Asp Asn Ala Arg Lys Asp Phe His Arg Glu Ala Glu Leu Leu Thr
580 585 590

Asn Leu Gln His Glu His Ile Val Lys Phe Tyr Gly Val Cys Val Glu
595 600 605

Gly Asp Pro Leu Ile Met Val Phe Glu Tyr Met Lys His Gly Asp Leu
610 615 620

Asn Lys Phe Leu Arg Ala His Gly Pro Asp Ala Val Leu Met Ala Glu
625 630 635 640

Gly Asn Pro Pro Thr Glu Leu Thr Gln Ser Gln Met Leu His Ile Ala
645 650 655

Gln Gln Ile Ala Ala Gly Met Val Tyr Leu Ala Ser Gln His Phe Val
660 665 670

His Arg Asp Leu Ala Thr Arg Asn Cys Leu Val Gly Glu Asn Leu Leu
675 680 685

Val Lys Ile Gly Asp Phe Gly Met Ser Arg Asp Val Tyr Ser Thr Asp

690 695 700
Tyr Tyr Arg Val Gly Gly His Thr Met Leu Pro Ile Arg Trp Met Pro
705 710 715 720

Pro Glu Ser Ile Met Tyr Arg Lys Phe Thr Thr Glu Ser Asp Val Trp
725 730 735
Ser Leu Gly Val Val Leu Trp Glu Ile Phe Thr Tyr Gly Lys Gln Pro
740 745 750
Trp Tyr Gln Leu Ser Asn Asn Glu Val Ile Glu Cys Ile Thr Gln Gly
755 760 765
Arg Val Leu Gln Arg Pro Arg Thr Cys Pro Gln Glu Val Tyr Glu Leu
770 775 780

Met Leu Gly Cys Trp Gln Arg Glu Pro His Thr Arg Lys Asn Ile Lys
785 790 795 800
Asn Ile His Thr Leu Leu Gln Asn Leu Ala Lys Ala Ser Pro Val Tyr
805 810 815
Leu Asp Ile Leu Gly
820

<210> 3

<211> 838

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(31)

<223> Signal Peptide

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (32)..(430)

<223> Extracellular Domain

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (431)..(454)

<223> Transmembrane Domain

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (455)..(838)

<223> Cytoplasmic Domain

<400> 3

Met Ser Ser Trp Ile Arg Trp His Gly Pro Ala Met Ala Arg Leu Trp

1 5 10 15

Gly Phe Cys Trp Leu Val Val Gly Phe Trp Arg Ala Ala Phe Ala Cys

20 25 30

Pro Thr Ser Cys Lys Cys Ser Ala Ser Arg Ile Trp Cys Ser Asp Pro

35 40 45

Ser Pro Gly Ile Val Ala Phe Pro Arg Leu Glu Pro Asn Ser Val Asp

50 55 60

Pro Glu Asn Ile Thr Glu Ile Phe Ile Ala Asn Gln Lys Arg Leu Glu

65 70 75 80

Ile Ile Asn Glu Asp Asp Val Glu Ala Tyr Val Gly Leu Arg Asn Leu

85 90 95

Thr Ile Val Asp Ser Gly Leu Lys Phe Val Ala His Lys Ala Phe Leu

100 105 110

Lys Asn Ser Asn Leu Gln His Ile Asn Phe Thr Arg Asn Lys Leu Thr

115 120 125

Ser Leu Ser Arg Lys His Phe Arg His Leu Asp Leu Ser Glu Leu Ile

130 135 140

Leu Val Gly Asn Pro Phe Thr Cys Ser Cys Asp Ile Met Trp Ile Lys

145 150 155 160

Thr Leu Gln Glu Ala Lys Ser Ser Pro Asp Thr Gln Asp Leu Tyr Cys

165 170 175

Leu Asn Glu Ser Ser Lys Asn Ile Pro Leu Ala Asn Leu Gln Ile Pro

180 185 190

Asn Cys Gly Leu Pro Ser Ala Asn Leu Ala Ala Pro Asn Leu Thr Val

195 200 205

Glu Glu Gly Lys Ser Ile Thr Leu Ser Cys Ser Val Ala Gly Asp Pro

210 215 220

Val Pro Asn Met Tyr Trp Asp Val Gly Asn Leu Val Ser Lys His Met

225 230 235 240
 Asn Glu Thr Ser His Thr Gln Gly Ser Leu Arg Ile Thr Asn Ile Ser
 245 250 255
 Ser Asp Asp Ser Gly Lys Gln Ile Ser Cys Val Ala Glu Asn Leu Val
 260 265 270
 Gly Glu Asp Gln Asp Ser Val Asn Leu Thr Val His Phe Ala Pro Thr
 275 280 285
 Ile Thr Phe Leu Glu Ser Pro Thr Ser Asp His His Trp Cys Ile Pro
 290 295 300

 Phe Thr Val Lys Gly Asn Pro Lys Pro Ala Leu Gln Trp Phe Tyr Asn
 305 310 315 320
 Gly Ala Ile Leu Asn Glu Ser Lys Tyr Ile Cys Thr Lys Ile His Val
 325 330 335
 Thr Asn His Thr Glu Tyr His Gly Cys Leu Gln Leu Asp Asn Pro Thr
 340 345 350
 His Met Asn Asn Gly Asp Tyr Thr Leu Ile Ala Lys Asn Glu Tyr Gly
 355 360 365

 Lys Asp Glu Lys Gln Ile Ser Ala His Phe Met Gly Trp Pro Gly Ile
 370 375 380
 Asp Asp Gly Ala Asn Pro Asn Tyr Pro Asp Val Ile Tyr Glu Asp Tyr
 385 390 395 400
 Gly Thr Ala Ala Asn Asp Ile Gly Asp Thr Thr Asn Arg Ser Asn Glu
 405 410 415
 Ile Pro Ser Thr Asp Val Thr Asp Lys Thr Gly Arg Glu His Leu Ser
 420 425 430

 Val Tyr Ala Val Val Val Ile Ala Ser Val Val Gly Phe Cys Leu Leu
 435 440 445
 Val Met Leu Phe Leu Leu Lys Leu Ala Arg His Ser Lys Phe Gly Met
 450 455 460
 Lys Asp Phe Ser Trp Phe Gly Phe Gly Lys Val Lys Ser Arg Gln Gly
 465 470 475 480

Val Gly Pro Ala Ser Val Ile Ser Asn Asp Asp Asp Ser Ala Ser Pro
485 490 495

Leu His His Ile Ser Asn Gly Ser Asn Thr Pro Ser Ser Ser Glu Gly
500 505 510

Gly Pro Asp Ala Val Ile Ile Gly Met Thr Lys Ile Pro Val Ile Glu
515 520 525

Asn Pro Gln Tyr Phe Gly Ile Thr Asn Ser Gln Leu Lys Pro Asp Thr
530 535 540

Phe Val Gln His Ile Lys Arg His Asn Ile Val Leu Lys Arg Glu Leu
545 550 555 560

Gly Glu Gly Ala Phe Gly Lys Val Phe Leu Ala Glu Cys Tyr Asn Leu
565 570 575

Cys Pro Glu Gln Asp Lys Ile Leu Val Ala Val Lys Thr Leu Lys Asp
580 585 590

Ala Ser Asp Asn Ala Arg Lys Asp Phe His Arg Glu Ala Glu Leu Leu
595 600 605

Thr Asn Leu Gln His Glu His Ile Val Lys Phe Tyr Gly Val Cys Val
610 615 620

Glu Gly Asp Pro Leu Ile Met Val Phe Glu Tyr Met Lys His Gly Asp
625 630 635 640

Leu Asn Lys Phe Leu Arg Ala His Gly Pro Asp Ala Val Leu Met Ala
645 650 655

Glu Gly Asn Pro Pro Thr Glu Leu Thr Gln Ser Gln Met Leu His Ile
660 665 670

Ala Gln Gln Ile Ala Ala Gly Met Val Tyr Leu Ala Ser Gln His Phe
675 680 685

Val His Arg Asp Leu Ala Thr Arg Asn Cys Leu Val Gly Glu Asn Leu
690 695 700

Leu Val Lys Ile Gly Asp Phe Gly Met Ser Arg Asp Val Tyr Ser Thr
705 710 715 720

Asp Tyr Tyr Arg Val Gly Gly His Thr Met Leu Pro Ile Arg Trp Met

725 730 735
 Pro Pro Glu Ser Ile Met Tyr Arg Lys Phe Thr Thr Glu Ser Asp Val
 740 745 750

 Trp Ser Leu Gly Val Val Leu Trp Glu Ile Phe Thr Tyr Gly Lys Gln
 755 760 765
 Pro Trp Tyr Gln Leu Ser Asn Asn Glu Val Ile Glu Cys Ile Thr Gln
 770 775 780
 Gly Arg Val Leu Gln Arg Pro Arg Thr Cys Pro Gln Glu Val Tyr Glu
 785 790 795 800
 Leu Met Leu Gly Cys Trp Gln Arg Glu Pro His Met Arg Lys Asn Ile
 805 810 815

Lys Gly Ile His Thr Leu Leu Gln Asn Leu Ala Lys Ala Ser Pro Val
 820 825 830
 Tyr Leu Asp Ile Leu Gly
 835

<210> 4
 <211> 822
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(31)
 <223> Signal Peptide
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(31)
 <223> Mouse Sequence
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (32)..(430)
 <223> Extracellular Domain
 <220><221> MISC_FEATURE

 <222> (32)..(432)
 <223> Human Sequence

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (431)..(454)

<223> Transmembrane Domain

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (433)..(822)

<223> Mouse Sequence

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (455)..(822)

<223> Cytoplasmic Domain

<400> 4

Met Ser Pro Trp Leu Lys Trp His Gly Pro Ala Met Ala Arg Leu Trp

1 5 10 15

Gly Leu Cys Leu Leu Val Leu Gly Phe Trp Arg Ala Ser Leu Ala Cys

20 25 30

Pro Thr Ser Cys Lys Cys Ser Ala Ser Arg Ile Trp Cys Ser Asp Pro

35 40 45

Ser Pro Gly Ile Val Ala Phe Pro Arg Leu Glu Pro Asn Ser Val Asp

50 55 60

Pro Glu Asn Ile Thr Glu Ile Phe Ile Ala Asn Gln Lys Arg Leu Glu

65 70 75 80

Ile Ile Asn Glu Asp Asp Val Glu Ala Tyr Val Gly Leu Arg Asn Leu

85 90 95

Thr Ile Val Asp Ser Gly Leu Lys Phe Val Ala His Lys Ala Phe Leu

100 105 110

Lys Asn Ser Asn Leu Gln His Ile Asn Phe Thr Arg Asn Lys Leu Thr

115 120 125

Ser Leu Ser Arg Lys His Phe Arg His Leu Asp Leu Ser Glu Leu Ile

130 135 140

Leu Val Gly Asn Pro Phe Thr Cys Ser Cys Asp Ile Met Trp Ile Lys

145 150 155 160

Thr Leu Gln Glu Ala Lys Ser Ser Pro Asp Thr Gln Asp Leu Tyr Cys

165 170 175

Leu Asn Glu Ser Ser Lys Asn Ile Pro Leu Ala Asn Leu Gln Ile Pro
 180 185 190
 Asn Cys Gly Leu Pro Ser Ala Asn Leu Ala Ala Pro Asn Leu Thr Val
 195 200 205
 Glu Glu Gly Lys Ser Ile Thr Leu Ser Cys Ser Val Ala Gly Asp Pro
 210 215 220

 Val Pro Asn Met Tyr Trp Asp Val Gly Asn Leu Val Ser Lys His Met
 225 230 235 240
 Asn Glu Thr Ser His Thr Gln Gly Ser Leu Arg Ile Thr Asn Ile Ser
 245 250 255
 Ser Asp Asp Ser Gly Lys Gln Ile Ser Cys Val Ala Glu Asn Leu Val
 260 265 270
 Gly Glu Asp Gln Asp Ser Val Asn Leu Thr Val His Phe Ala Pro Thr
 275 280 285

 Ile Thr Phe Leu Glu Ser Pro Thr Ser Asp His His Trp Cys Ile Pro
 290 295 300
 Phe Thr Val Lys Gly Asn Pro Lys Pro Ala Leu Gln Trp Phe Tyr Asn
 305 310 315 320
 Gly Ala Ile Leu Asn Glu Ser Lys Tyr Ile Cys Thr Lys Ile His Val
 325 330 335
 Thr Asn His Thr Glu Tyr His Gly Cys Leu Gln Leu Asp Asn Pro Thr
 340 345 350

 His Met Asn Asn Gly Asp Tyr Thr Leu Ile Ala Lys Asn Glu Tyr Gly
 355 360 365
 Lys Asp Glu Lys Gln Ile Ser Ala His Phe Met Gly Trp Pro Gly Ile
 370 375 380
 Asp Asp Gly Ala Asn Pro Asn Tyr Pro Asp Val Ile Tyr Glu Asp Tyr
 385 390 395 400
 Gly Thr Ala Ala Asn Asp Ile Gly Asp Thr Thr Asn Arg Ser Asn Glu
 405 410 415

 Ile Pro Ser Thr Asp Val Thr Asp Lys Thr Gly Arg Glu His Leu Ser

420 425 430
 Val Tyr Ala Val Val Val Ile Ala Ser Val Val Gly Phe Cys Leu Leu
 435 440 445
 Val Met Leu Leu Leu Leu Lys Leu Ala Arg His Ser Lys Phe Gly Met
 450 455 460
 Lys Gly Pro Ala Ser Val Ile Ser Asn Asp Asp Asp Ser Ala Ser Pro
 465 470 475 480

 Leu His His Ile Ser Asn Gly Ser Asn Thr Pro Ser Ser Ser Glu Gly
 485 490 495
 Gly Pro Asp Ala Val Ile Ile Gly Met Thr Lys Ile Pro Val Ile Glu
 500 505 510
 Asn Pro Gln Tyr Phe Gly Ile Thr Asn Ser Gln Leu Lys Pro Asp Thr
 515 520 525
 Phe Val Gln His Ile Lys Arg His Asn Ile Val Leu Lys Arg Glu Leu
 530 535 540

 Gly Glu Gly Ala Phe Gly Lys Val Phe Leu Ala Glu Cys Tyr Asn Leu
 545 550 555 560
 Cys Pro Glu Gln Asp Lys Ile Leu Val Ala Val Lys Thr Leu Lys Asp
 565 570 575
 Ala Ser Asp Asn Ala Arg Lys Asp Phe His Arg Glu Ala Glu Leu Leu
 580 585 590
 Thr Asn Leu Gln His Glu His Ile Val Lys Phe Tyr Gly Val Cys Val
 595 600 605

 Glu Gly Asp Pro Leu Ile Met Val Phe Glu Tyr Met Lys His Gly Asp
 610 615 620
 Leu Asn Lys Phe Leu Arg Ala His Gly Pro Asp Ala Val Leu Met Ala
 625 630 635 640
 Glu Gly Asn Pro Pro Thr Glu Leu Thr Gln Ser Gln Met Leu His Ile
 645 650 655
 Ala Gln Gln Ile Ala Ala Gly Met Val Tyr Leu Ala Ser Gln His Phe
 660 665 670

Val His Arg Asp Leu Ala Thr Arg Asn Cys Leu Val Gly Glu Asn Leu
675 680 685

Leu Val Lys Ile Gly Asp Phe Gly Met Ser Arg Asp Val Tyr Ser Thr
690 695 700

Asp Tyr Tyr Arg Val Gly Gly His Thr Met Leu Pro Ile Arg Trp Met
705 710 715 720

Pro Pro Glu Ser Ile Met Tyr Arg Lys Phe Thr Thr Glu Ser Asp Val
725 730 735

Trp Ser Leu Gly Val Val Leu Trp Glu Ile Phe Thr Tyr Gly Lys Gln
740 745 750

Pro Trp Tyr Gln Leu Ser Asn Asn Glu Val Ile Glu Cys Ile Thr Gln
755 760 765

Gly Arg Val Leu Gln Arg Pro Arg Thr Cys Pro Gln Glu Val Tyr Glu
770 775 780

Leu Met Leu Gly Cys Trp Gln Arg Glu Pro His Thr Arg Lys Asn Ile
785 790 795 800

Lys Ser Ile His Thr Leu Leu Gln Asn Leu Ala Lys Ala Ser Pro Val
805 810 815

Tyr Leu Asp Ile Leu Gly
820

<210> 5

<211> 822

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(31)

<223> Signal Peptide

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(31)

<223> Rat Sequence

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (32)..(430)

<223> Extracellular Domain

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (32)..(432)

<223> Human Sequence

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (431)..(454)

<223> Transmembrane Domain

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (433)..(822)

<223> Rat Sequence

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (455)..(822)

<223> Cytoplasmic Domain

<400> 5

Met Ser Pro Trp Pro Arg Trp His Gly Pro Ala Met Ala Arg Leu Trp

1 5 10 15

Gly Leu Cys Leu Leu Val Leu Gly Phe Trp Arg Ala Ser Leu Ala Cys

20 25 30

Pro Thr Ser Cys Lys Cys Ser Ala Ser Arg Ile Trp Cys Ser Asp Pro

35 40 45

Ser Pro Gly Ile Val Ala Phe Pro Arg Leu Glu Pro Asn Ser Val Asp

50 55 60

Pro Glu Asn Ile Thr Glu Ile Phe Ile Ala Asn Gln Lys Arg Leu Glu

65 70 75 80

Ile Ile Asn Glu Asp Asp Val Glu Ala Tyr Val Gly Leu Arg Asn Leu

85 90 95

Thr Ile Val Asp Ser Gly Leu Lys Phe Val Ala His Lys Ala Phe Leu

100 105 110

Lys Asn Ser Asn Leu Gln His Ile Asn Phe Thr Arg Asn Lys Leu Thr

115 120 125

Ser Leu Ser Arg Lys His Phe Arg His Leu Asp Leu Ser Glu Leu Ile

130 135 140

Leu Val Gly Asn Pro Phe Thr Cys Ser Cys Asp Ile Met Trp Ile Lys
145 150 155 160

Thr Leu Gln Glu Ala Lys Ser Ser Pro Asp Thr Gln Asp Leu Tyr Cys
165 170 175

Leu Asn Glu Ser Ser Lys Asn Ile Pro Leu Ala Asn Leu Gln Ile Pro
180 185 190

Asn Cys Gly Leu Pro Ser Ala Asn Leu Ala Ala Pro Asn Leu Thr Val
195 200 205

Glu Glu Gly Lys Ser Ile Thr Leu Ser Cys Ser Val Ala Gly Asp Pro
210 215 220

Val Pro Asn Met Tyr Trp Asp Val Gly Asn Leu Val Ser Lys His Met
225 230 235 240

Asn Glu Thr Ser His Thr Gln Gly Ser Leu Arg Ile Thr Asn Ile Ser
245 250 255

Ser Asp Asp Ser Gly Lys Gln Ile Ser Cys Val Ala Glu Asn Leu Val
260 265 270

Gly Glu Asp Gln Asp Ser Val Asn Leu Thr Val His Phe Ala Pro Thr
275 280 285

Ile Thr Phe Leu Glu Ser Pro Thr Ser Asp His His Trp Cys Ile Pro
290 295 300

Phe Thr Val Lys Gly Asn Pro Lys Pro Ala Leu Gln Trp Phe Tyr Asn
305 310 315 320

Gly Ala Ile Leu Asn Glu Ser Lys Tyr Ile Cys Thr Lys Ile His Val
325 330 335

Thr Asn His Thr Glu Tyr His Gly Cys Leu Gln Leu Asp Asn Pro Thr
340 345 350

His Met Asn Asn Gly Asp Tyr Thr Leu Ile Ala Lys Asn Glu Tyr Gly
355 360 365

Lys Asp Glu Lys Gln Ile Ser Ala His Phe Met Gly Trp Pro Gly Ile
370 375 380

Asp Asp Gly Ala Asn Pro Asn Tyr Pro Asp Val Ile Tyr Glu Asp Tyr

385 390 395 400
 Gly Thr Ala Ala Asn Asp Ile Gly Asp Thr Thr Asn Arg Ser Asn Glu
 405 410 415

 Ile Pro Ser Thr Asp Val Thr Asp Lys Thr Gly Arg Glu His Leu Ser
 420 425 430
 Val Tyr Ala Val Val Val Ile Ala Ser Val Val Gly Phe Cys Leu Leu
 435 440 445
 Val Met Leu Leu Leu Leu Lys Leu Ala Arg His Ser Lys Phe Gly Met
 450 455 460
 Lys Gly Pro Ala Ser Val Ile Ser Asn Asp Asp Asp Ser Ala Ser Pro
 465 470 475 480

 Leu His His Ile Ser Asn Gly Ser Asn Thr Pro Ser Ser Ser Glu Gly
 485 490 495
 Gly Pro Asp Ala Val Ile Ile Gly Met Thr Lys Ile Pro Val Ile Glu
 500 505 510
 Asn Pro Gln Tyr Phe Gly Ile Thr Asn Ser Gln Leu Lys Pro Asp Thr
 515 520 525
 Phe Val Gln His Ile Lys Arg His Asn Ile Val Leu Lys Arg Glu Leu
 530 535 540

 Gly Glu Gly Ala Phe Gly Lys Val Phe Leu Ala Glu Cys Tyr Asn Leu
 545 550 555 560
 Cys Pro Glu Gln Asp Lys Ile Leu Val Ala Val Lys Thr Leu Lys Asp
 565 570 575
 Ala Ser Asp Asn Ala Arg Lys Asp Phe His Arg Glu Ala Glu Leu Leu
 580 585 590
 Thr Asn Leu Gln His Glu His Ile Val Lys Phe Tyr Gly Val Cys Val
 595 600 605

 Glu Gly Asp Pro Leu Ile Met Val Phe Glu Tyr Met Lys His Gly Asp
 610 615 620
 Leu Asn Lys Phe Leu Arg Ala His Gly Pro Asp Ala Val Leu Met Ala
 625 630 635 640

Glu Gly Asn Pro Pro Thr Glu Leu Thr Gln Ser Gln Met Leu His Ile
645 650 655

Ala Gln Gln Ile Ala Ala Gly Met Val Tyr Leu Ala Ser Gln His Phe
660 665 670

Val His Arg Asp Leu Ala Thr Arg Asn Cys Leu Val Gly Glu Asn Leu
675 680 685

Leu Val Lys Ile Gly Asp Phe Gly Met Ser Arg Asp Val Tyr Ser Thr
690 695 700

Asp Tyr Tyr Arg Val Gly Gly His Thr Met Leu Pro Ile Arg Trp Met
705 710 715 720

Pro Pro Glu Ser Ile Met Tyr Arg Lys Phe Thr Thr Glu Ser Asp Val
725 730 735

Trp Ser Leu Gly Val Val Leu Trp Glu Ile Phe Thr Tyr Gly Lys Gln
740 745 750

Pro Trp Tyr Gln Leu Ser Asn Asn Glu Val Ile Glu Cys Ile Thr Gln
755 760 765

Gly Arg Val Leu Gln Arg Pro Arg Thr Cys Pro Gln Glu Val Tyr Glu
770 775 780

Leu Met Leu Gly Cys Trp Gln Arg Glu Pro His Thr Arg Lys Asn Ile
785 790 795 800

Lys Asn Ile His Thr Leu Leu Gln Asn Leu Ala Lys Ala Ser Pro Val
805 810 815

Tyr Leu Asp Ile Leu Gly
820

<210> 6

<211> 8744

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 6

gtctggagggtgctatgcta tgcgtgtgtg cgtgtgtgtg cgcgcgcgcg tgtgtgagcg 60

tgtgtgtttt tggatttcat actaattttc tggagtttct gccctgctc tgcgtcagcc 120

ctcacgtcac ttgccagca gtagcagagg cggcggcggc ggcgccgcc ggtagagcc 180

cagtcgctgc ttacagctgct gttgctgctt ctgcagcgct ctgctccctg cgcttgctac 240

gggaggccgg ggaagccgcg cggacagtcc tcggtggcct gggccggcac tgtcctgcta 300

ccgcagttgc tccccagccc tgaggtgcmc accgatatcg atattcgtgc cggtttagcg 360

gttctgcgac ccaaagagtc caggagatc caccgagtgg tgcctggcgt ataggactat 420

gcagccgctt tgttgctcgg agcagcggcc cgcgatgtcc cagccactgt gaaccatttg 480

gtcagcgcca acctgctcag cccagcacc gacaggtcga gcctctggta cgctccactc 540

cgcgggaggc caccagcacc aagcagcaag agggcgagg gaaggcctcc cccctccggc 600

gggggacgcc tggctcagcg tagggacacg cactccgact gactggcact ggcagctcgg 660

gatgtcgccc tggctgaagt ggcatggacc cgccatggcg cggctctggg gcttatgcct 720

gctggctctg ggcttctgga gggcctctct cgctgcccg acgtcctgca aatgcagttc 780

cgctaggatt tgggtgactg agccttctcc aggcacgtg gcattcccga ggttggaaac 840

taacagcgtt gaccgggaga acatcacgga aattctcatt gcaaaccaga aaaggctaga 900

aatcatcaat gaagatgacg ttgaagctta cgtggggctg agaaacctta caattgtgga 960

ttccgcttta aagtttggg cttacaaagc gtttctgaaa aacagcaacc tgcggcacat 1020

aaatttcaca cgaacaagc tgacgagttt gtccaggaga catttccgcc accttgactt 1080

gtctgacctg atcctgacgg gtaatccgtt cacgtgctcc tgcgacatca tgtggctcaa 1140

gactctccag gagactaaat ccagccccga cactcaggat ttgtactgcc tcaatgagag 1200

cagcaagaac atgccccctg cgaacctgca gataccaat tgtgtgtctg catctgcacg 1260

tctggctgct cctaacctca ccgtggagga aggaaagtct gtgaccttt cctgcagtgt 1320

gggggggtgac cactcccca ccttgtactg ggacgttggg aatttggttt ccaagcacat 1380

gaatgaaca agccacacac agggctcctt aaggataacg aacatttcat ctgatgacag 1440

tggaaagcaa atctcttggt tggcagaaaa cctttagga gaagatcaag attctgtgaa 1500

cctcactgtg cattttgcmc caactatcac gtttctcgag tctccaacct cagatcacca 1560

ctggtgcatt ccattcactg tgagaggcaa cccaagcct gcgcttcagt ggttctacaa 1620

tggggccata ctgaatgagt ccaagtacat ctgtactaag atccacgtca ccaatcacac 1680

ggagtacat ggctgcctcc agctggataa cccactcat atgaataacg gagactacac 1740

cctgatggcc aagaacgagt atgggaagga tgagagacag atctccgctc acttcatggg 1800

ccggcctgga gtcgactacg agacaaacc aaattaccct gaagtcctct atgaagactg 1860

gaccacgcca actgacattg gggatactac gaacaaaagt aatgaaatcc cctccacgga 1920

tggtgtgac caaagcaatc gggagcatct ctcggtctat gccgtggtgg tgattgcatc	1980
tggtgtggga ttctgcctgc tggatgatgt gctcctgctc aagttggcga gacattccaa	2040
gtttggcatg aaaggcccag ctctgggtcat cagcaacgac gatgactctg ccagccccct	2100
ccaccacatc tccaatggga gtaacactcc atcttcttcg gagggcggtc ccgacgtgt	2160
cattattgga atgaccaaga ttctgttat tgaaaacccc cagtactttg gcatcaccaa	2220
cagtcagctc aagccagaca catttgttca gcatatcaag agacacaaca tcgtttcgaa	2280
gagggaaactt ggggaaggag ccttcgggaa agttttcctt gccgagtgt acaacctctg	2340
cccagagcag gataagatcc tgggtggtgt gaagacgtg aaggacgcca gcgacaatgc	2400
acgcaaggac ttcatcggg aagctgagct gctgaccaac ctccagcagc agcacattgt	2460
caagtcttac gggtctctg tggagggcga cccactcatc atggtctttg agtacatgaa	2520
gcacggggac ctcaacaagt tcttagggc acacggggcc gacgcagtgc tgatggcaga	2580
gggtaacccg cccacagagc tgacgcagtc gcagatgctg cacatcgctc agcaaatcgc	2640
agcaggtatg gtctacctgg cgtcccaaca ctttgtgcac cgtgacctgg ccacccggaa	2700
ctgcctggtg ggagagaacc tgctggtgaa aattggggac tttgggatgt cccgagatgt	2760
gtacagcacc gactactatc gggtcggtgg ccacacaatg ttgcccatcc gatggatgcc	2820
tccagagagc atcatgtaca ggaaattcac caccgagagc gacgtctgga gcctgggcgt	2880
tggtttgtgg gagatcttca cctacggcaa gcagccctgg tatcagctat cgaacaatga	2940
ggtgatagag tgcatcacc aggggaagat ccttcagcgg cctcgaacgt gtccccagga	3000
ggtgtatgag ctcatgcttg gatgtggca gcgggaacca cacacccgga agaacaatcaa	3060
gagcatccac accctccttc agaacttggc caaggcatct cccgtctacc tggatatcct	3120
aggctagggt cctccttctg cccagaccgt ccttccaag gccctcctca gactggccta	3180
cacgaagaac ctcttgactg ccgtgacgt catgaccttg ctgtccttcg ctctgacagt	3240
gttgacagga ccaggagcgg ctctttgggg gaggcagtgt gtgcttctcc atccacagac	3300
agtattaaact cgcttctggc attgtctctt tctctccctt gggtttgttt ctttcttttg	3360
ccccctcccc ttttatcatt atttatcat ttatttattt tctggtcttc accgcttcac	3420
ggccctcagt ctctccttga ccaatctggc ttctgcattc ctattaaactg tacatagaca	3480
aaggccttaa caaacctaatt ttgttatatc agcagacact ccagtttgcc caccacaact	3540
aacaatgcct tgttgtattc ctgcctttga cgtggatgaa aaaaaggga aaaaaaatca	3600
aacatctgac ttaagctgtc acttccgatg tacagacgtg gggcgtttct atggattcac	3660
ttctatttat tatttattaa ttatttattt tatcactctt cttattgttt tctggtggtt	3720
ttaacctatg tgtgagaagg aaaagtgtg tacaatctgg gaaaacttta tcagtgggaa	3780

atgaaaacga gagcgagcaa gcgagcaaga gagggagaga gagagagaag cgttaccata	3840
aaccacggca tgagcgagac agagacaagc catgggatca gtcgggagtc cgttgtgctt	3900
aggaaaaccc agcagccatt agctggggga gcatgttcgg ctctgtcccc caagcacctt	3960
tctgaggagg acacaggatg ttgaactctg cttcacgggc agagcttcta atgacagata	4020
ctggcttgca ctggaaagac agttcccacg ggacctggac ggacaacaca tcctacattc	4080
agacattgtg gtcgggcacg gtgacagagt tgatccgttt ctcaagtgtt atctaccaag	4140
cttttgtgaa gtcccatcga aggaggtaga ttcttgctca gatataattt caggaaaacc	4200
cgagtcttg acaaagacag gagacgctct caatttggag gcaagtttct cttaccttga	4260
actttttcag acagcaactc cgcccagccc ccatcttcca ctctcacctg tcttgtaact	4320
gtgcaaaaa aagtgtgcat ggtctttgtc aattgatacc tatgtgcacg tgtgcagaaa	4380
ctgttgttcc agctgggggtg tctgattagg agggcagatc cataaaaggt ctaacctagg	4440
caacttcggg aaaggagacc agatcagtag ctggaggcac tctccagtag gcggtgaggg	4500
gtttactgag taggcatgct gaagcccga tattcaccca tctcaaacce cccgggctgc	4560
aggacaggca caggccatcc ctgaggagaa ggggagccct tttgggatac cacctgaggt	4620
tatgttcagt gtgctctggt caagtccctt gctcggggct ctgtttgggg agagtggttt	4680
cattccaagg tactcattat tagtatgctg tttgtttaa tatactccat taaaaagtta	4740
aaaaaaaaa gaattaagcc ttgacactgt atggctgaca ggaggctgtg cccagactga	4800
gcctggagat ttgcgccgc acatggtcat tggttttccg aaaagagagg gtaaatattat	4860
atagaaattt acaggtattt gggtagtcat ttagaccgag ggagaccagt gtttcattt	4920
ctctgcgcc cctctgtgag gggaagtctg atacactga cacctttata aacggagcca	4980
gataggaagg gagtgactta attcacctta gaacatttca tttggtgttt atttctgaag	5040
gtgcaagagc tctgtgtagg ttctatttgt gcccgagcat ttctggagca ctgtgttttc	5100
tagcagaaac tccgagagcc agttctcaca atgaaacttt aaaacctgtg taaattgaca	5160
gagagcagaa ggcgatccaa gagggccact caagtgagtg gtggcacgag gcacatgcgg	5220
tggccctttc tgttgtgctg gcccatgaga gatgggagct attttgtcct cttcgtccat	5280
taaaacaaac cctccagaa tacctatagt aatataatga aagccataac tctgtgatct	5340
ataccgtcag gtatagatca ttaaaggacc catggtactg tcaggcactg tggaaccgtg	5400
aggcagcgga aaggcaaggg cacatttgta catgttctc tagcttccgc cagccgtgac	5460
ctatgaactc acataggccg gttgtctcta gtctgacggg ctgccctggg aggaaaagct	5520
gcaagatgct cagcagagag caaaggagag gatagtcttg gaaaaggcca aggttgggga	5580
tgccatacag gattacacca aagggtgtga ctgagaatgt gggagcattc cattccaggt	5640

ttgtattttc ctcagcaaga aaaaagagca gatagaaggg cagaggagga tagagaggaa	5700
gagaaaggag agggagaaga gagcagagaa gagagagaga gagagagaga gagagaatct	5760
ttatactttt tggcaagtcc tcgaaggtct caaaatgaaa gtgtctatgc aagtgcaaat	5820
ttttacagtt atttatacta attattatta ttgttattaa ttattattat tactagtctg	5880
ttgtctcaag aatatgtgca gatttcagag cattaaagag tatttggttt cttttaagtt	5940
agttgggtga gccaaaggaca ccttaaaata attgtcactg ttcactctgt atcgcccttc	6000
tcatggtatt ttaagtttta gaaaagaaac attcttgttc taaaacatat ccctctccat	6060
agatgacaaa aaaaaatggt gttagcaaac cgaaacctcc cccgattcct gtctgacatc	6120
cgatccattt ctcaactgct tgatgatttc cgagcgcttt ttgcataatgt tgtcaaaata	6180
ttcatattat ttgggtgagg gaatggagac tcagaaactc agaggacaaa cataagcttc	6240
accgaagtct gtctgccaga tacaacttaa catacaaaaca agacagccgg gaaggaaatg	6300
tgctggtagc gtgtctgtgg agcagggtgg gggttagaac agaaggagac ctgggcagtg	6360
cacgcagaag agatgttaca tcatgtgctt ctgtctctgg cttctgtga ctcccaactt	6420
tgcgtcagc ctcatctaga aaacgcttca aacactgctc ttcagggttc tgtcagaact	6480
cacacacacg tgctcacacc agccccgctt gtgacgtttt tatgtacttc tatataaata	6540
tatacataat atatgttata aacacttgat ttatacatat acaaatgcac acatgtagtg	6600
tgtttgtgtg tttatgtata aacatatagg ctcatggtaa tagaataatt ataagtaggg	6660
tgcaatatga ataatttctt taatatctgc taagtaacca aaactttcca acgtcatgtg	6720
gcagttcata ttccactct cagtgtgggt aaggatgggc tacaccacac tticagctct	6780
gtgcagccct tggatggaag atgtgttgaa aaaaaaatca catcttcctt gaaacaactg	6840
actgaaagcc atcctctaca ttgaatctgt tctctggctc ttgcaaagg agaaatgcag	6900
acaaatggtc tcttctgtgc ccagtcctgg gaaggagaag tgggttttct cttcttgac	6960
atttgggccg tgctcacctt tcttggtctt atgcccttta cactgggctc agagatgaag	7020
cagtctagac ccaagctgca gggctgtagg gaggcaaatg tcttcgaggc tgatagcaaa	7080
gcatccaaaa atctatagca agatgcgag cttgaagtca ctctcatcc acacggcaag	7140
caagagccag ggcagtgcgt gctgtccatc tctaggactg ggcagtgggg tccccgtca	7200
agggcagtct ttccctaage ctctcttttt gcaaatggca ctgccagcag tacctggcat	7260
taagtcacga aaaatttcta aaatggcagc acagaccgt gtgccctcat tgctctgccc	7320
ccacatgcct catcattaga gggctccagt ttcaaaactt gactttccat ttggccctgt	7380

atcgtggtta aaggaaatct caacagaggg atggccaatt gacctaaatc cccagatgtc 7440
caagtttgca gtgaaagcca gttcttccca aatgtataac tggaatgtag ggactcaggt 7500
tgtgatactt catacaggaa tctcagatgt tatgttaaag aactgggttg ggagggattc 7560
atcactaagc caacaataat gcaggagggc gtggctgata gttaaagcaa tagtagtgca 7620
ggagggcgtg gctgctgtga gggctggaat ccatctctgc tgctaaagt cagggttctc 7680
aactcttttc agctgttgca gcccttcaat tctttccctt cggcgttatt tatttgtgta 7740
tttatttatt tatttattta tttatctatc tatctatcaa cttttgggcc attcatcacc 7800

aacataaagc aaaaacaatt tttacatat atgtaaatgt gttgcaagt aaacactgtg 7860
aatctcacia ccacctcta gcaactatgc tgccatcttg acgtgcgtct caggagtcca 7920
gacgggaaaa gacgaggacg tcatittgca gcctacgcat tctgggccag gtccgtgttc 7980
gttttatttc tttagtctgt gagttaagaa aacaatccga gtggagggtg acggatgttc 8040
ggcaagtctg gtgaagcagc acgagctctt tgcagctata ggctcgagca agaagaaaaa 8100
ccatgggaga tggagaaggg aaatttgatg gaggggtggg gtggggtggg ggctctgtct 8160
tacagctcgt gtagcttact gttgcttaaa aatgtatata acagctggaa atgttttcaa 8220

cacaaggat ttgaaataaa tgtgaatctt aaatatgtac tcccttaagg aatgaacata 8280
ttatggtgaa atattgtcc cccgcgtccc ctacaaatct gcctagagat gtggatacct 8340
acatttgctt aagcatcaga ccagtgtttg tatatacccg ggccatacac actcatctcg 8400
acgtctctct gcggatgtat tcccccttca ctggtgacct ggtattttaga actccgtctt 8460
ttcagtttgt tttttccct ttaatgtgat gtctctgtgc cgattattac cggttcttac 8520
ttgtttttgc aatccgtttt gaggtccagt gttttactga gactcattgc atcttggtcg 8580
atttcaaagt gacacccgaa tacagtgttt aaaaaaaaag tttgtttgta aatcatgtga 8640

ccagcttctc tcacctgac atggaatgtc tcttgtacta cagtgtattt aataataaaa 8700
gaaaaaatg atgtcttaca ataaataaca tcttcacaa gagg 8744

<210> 7
<211> 4750
<212> DNA
<213> Rattus norvegicus
<400> 7

tgtgcgtgcg tgcgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg 60
tgagcgtgtg tgtttttgga ttccatacta attttctgga gtttctgccc ctgctctgcg 120
tcagccctca cgtcacttcg ccagcagtag cagaggcggc ggcgccgcc ggtagagcc 180

cagtcgctgc ttacagctgct gttgctgcct ctgcggcgct ctgctccctg cgctggctac 240

gggaggccgg gggagccgcg ccgacagtcc tctgtggcca gggccggcac tgtcctgcta 300

ccgcagttgc tccccagccc tgaggtgctc accgatatcg atatccgtgc cggtttagcg 360

gttctgcgac ccaaagagtc caggagagc caccgagtgg cgcctggcgt ataggacat 420

gcagccgctt tttggcttgg agcagcggcc cgtgatgttc cagccactgt gaaccatttg 480

gtcagcgcca acctgtcag cccagcacc gacaggtca gcctctggta cgctcctctc 540

ggcgggaggc catcagcacc aagcagcaag agggctcagg gaaggcctcc cccctccggc 600

gggggacgcc tggctcagcg tagggacacg cactctgact gactggcact ggcagctcgg 660

gatgtcgccc tggccgaggt ggcatggacc cgccatggcg cggctctggg gcttatgctt 720

gctggctctt ggcttctgga gggcttctct tgctgcccc atgtcctgca aatgcagcac 780

cactaggatt tgggtgtacc agccttctcc tggcatcgtg gcatttccga ggttggaaac 840

taacagcatt gaccagaga acatcacga aattctcatt gcaaaccaga aaaggttaga 900

aatcatcaat gaagatgatg tcgaagctta cgtggggctg aaaaacctta caattgtgga 960

ttccggctta aagtttggg cttacaaggc gtttctgaag aacggcaacc tgcggcacat 1020

caatttact cgaacaagc tgacgagttt gtccaggaga catttccgcc accttgactt 1080

gtctgacctg atcctgacgg gtaatccgtt cacgtgttcc tgtgacatca tgtggctcaa 1140

gactctccag gagacgaaat ccagccccga cactcaggat ttgtattgcc tcaatgagag 1200

cagcaagaat acccctctgg cgaacctgca gattcccaat tgtggtctgc cgtctgcacg 1260

tctggccgct cctaacctca cggaggagga aggaagtct gtgaccattt cctgcagcgt 1320

cgggggtgac ccgtcctcca cttgtactg ggacgttggg aatttggttt ccaaacacat 1380

gaatgaaca agccacacac agggctcctt aaggataaca aacatttcat cggatgacag 1440

tgggaacaa atctcttggt tggcagaaaa cctcgttggga gaagatcaag actctgtgaa 1500

cctcactgtg cattttgac caaccatcac atttctgaa tctccaacct cagaccacca 1560

ctggtgcatc ccatttactg tgagaggcaa cccaagcca gcatttctgt ggttctacaa 1620

cggagccata ctgaatgaat ccaagtacat ctgtacaaa atacacgtca ccaatcacac 1680

ggagtaccac ggctgcctcc agctggataa cccactcat atgaataatg gagactacac 1740

cctaattggc aagaatgaat atgggaagga cgagagacag atttctgtc acttcatggg 1800

ccggcctgga gttagctatg agacaaacc aaattaccct gaagtcctct atgaagactg 1860

gaccagcca actgacatcg gggatactac aaacaaaagt aatgagatcc cctccacgga 1920

tggtgtgac caaaccaatc gggagcatct ctcggtctat gccgtggtgg tgattgcctc	1980
tggtgtagga ttctgcctgc tggatgatgct gcttctgctc aagttggcga gacattccaa	2040
gtttggcatg aaaggccag cttccgtcat cagcaacgac gatgactctg ccagccctct	2100
ccaccacatc tccaacggga gcaacactcc gtcttcttcg gagggcgggc ccgatgctgt	2160
catcattggg atgaccaaga tcctgtcat tgaaaacccc cagtacttcg gtatcacaa	2220
cagccagctc aagccggaca catttgttca gcacatcaag agacacaaca tcgttctgaa	2280
gagggagctt ggagaaggag cctttgggaa agttttccta gcggagtgtc ataacctctg	2340
ccccgagcag gataagatcc tggtagccgt gaagacgctg aaggacgcca gcgacaatgc	2400
tcgcaaggac ttcatcgcg aagccgagct gctgaccaac ctccagcagc agcacattgt	2460
caagtcttac ggtgtctgtg tggagggcga cccactcatc atggtctttg agtacatgaa	2520
gcacggggac ctcaacaagt tccttagggc acacgggcca gatgcagtgc tgatggcaga	2580
gggtaacccg cccaccgagc tgacgcagtc gcagatgctg cacatcgctc agcaaatcg	2640
agcaggcatg gtctacctgg cateccaaca ctctgtgcac cgagacctgg ccaccggaa	2700
ctgcttggtg ggagagaacc tgctggtgaa aattggggac ttcgggatgt cccgggatgt	2760
atacagcacc gactactacc gggttggtgg ccacacaatg ttgcccatcc gatggatgcc	2820
tccagagagc atcatgtaca ggaaattcac caccgagagt gacgtctgga gcctgggagt	2880
tgtgttggtg gagatcttca cctacggcaa gcagccctgg tatcagctat caaacaacga	2940
ggtgatagaa tgcatcacc agggcagagt ccttcagcgg cctcgacgt gtccccagga	3000
ggtgtacgag ctgatgtgg gatgtctgca gcgggaacca cacacaagga agaacatcaa	3060
gaacatccac acactccttc agaacttggc gaaggcgtcg cccgtctacc tggacatcct	3120
aggctagact cctcttctc ccagacggcc ctcccaagg caccctcag acctctaac	3180
tgccgtgat gtcaccacct tgctgtcctt cgtctgaca gtgttaacaa gacaaggagc	3240
ggctctccgg ggtgaggcag tgcgcacttc cccatccaca gacagtatcg actcgttct	3300
ggctttgtcg ctttctctcc ctttggtttg tttctttctt ttgccattc tccatttatt	3360
tatttattta tttatttatt tatttattha tttatctatc tatctatcta tetatctatc	3420
tatttattha tttattggtc ttactgtct catggtcttc ggctctctc cttgaccgat	3480
ctggcttctg tactctatt cactgtacat agacaaaggc cttaacaaac ctgatttgtt	3540
atatcagcag acactccagt ttgccacca caactaacia tgccttgttg tattcctgcc	3600
tttgatgtgg atgaaaaaaaa gggaaaaaaaa aataatcaaa catctgactt aaaccgtcac	3660
ttccgatgta cagacacggg gcgtttctat ggattcactt ctatctatct atttatatt	3720
ttatctatth atttatthct cttctttgtt gttttccggt ggtttttagcc tgtgtatgag	3780

aagggaaagt catgtacagt ctgggaaaac tttatctgtg ggaaatggaa accagaaagg 3840
gaaagaagct ttaccataaa gcacagcagg agtgagacac agaaaagcca ttggatcagc 3900
cagagtcctt cctgcatagg aaaaccacag agccatcagg ctggaggatc atgttcggca 3960
ctgacccccg aggacccttc tgaggaggac acagaatgtt aaactctgca tcatggacac 4020

agtttccgat cacagatact ggccttcaat ggaaaaaaa aaaaaccag atagtcttg 4080
tgagacctgg acagcacgtc caacatccag acattgtggt cgggcacagt gacagagttg 4140
atgcatttct cacgggttat tctacagagc ttttgtcaag tccaatggaa ggaggtagat 4200
tcttgttcag atatgatttc gggaaaaacc gagtcctga caaagacagg agacaccctc 4260
agttgggagg caagtttctc ttaccttgga ctttctcaca cagcaattct cacccccacc 4320
ccctccactc tcacctgtct tgtaactgtg caaacaaaag tgtgcatggt ctttgtcagt 4380
tgataccttt gtgcacctct gtgcagaaac tgctgtctgt cccggctgtg gtaccgatc 4440

agtgggtag atccacgaaa ggtctcattt taggccgtt tggaaggta accagatcgg 4500
tagctggaag cactctccag taggtggcga aggtgagtg ggtctgtga agcctgcata 4560
tcttcacca cctcaaacc accgggctgc acaggggaca ggcacaggcc acccctgagg 4620
gacaggaag ctctcttggg ataccacctg agtttacatt cagtgtgctc aggtcaagtc 4680
tctcgtcgg ggtctgttt cggggagaat ggtttcattc caacgcactc attatcagga 4740
ttctgttttc 4750

<210> 8
<211> 4057
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 8

gggagcagga gcctcgtgg ctgcttcgt cgcgtctac gcgtcagtc cccggcggta 60
gcaggagcct ggaccaggc gccggcggcg ggcgtgaggc gccggagccc ggcctcgagg 120
tgcataccgg accccattc gcatetaaca aggaatctgc gcccagaga gtcccgagc 180
ccgccggtcg gtccccggcg cgccgggcca tgacgcagc gccgccgagg agctccgagc 240
agcggtagcg cccctctgta aagcggttcg ctatgccggg accactgtga accctgccgc 300
ctgccgaac acitctcgt cccgaccagc tcagcctctg ataagctgga ctccgcacgc 360
ccgaacaag caccgaggag ttaagagagc cgcaagcga gggaaggcct cccgcacgg 420

gtgggggaaa ggcgcgggtg cagcgcgggg acaggcactc gggtggcac tggctgctag 480
ggatgtcgtc ctggataagg tggcatggac ccgcatggc gcggctctgg ggcttctgt 540

ggctggttgt gggcttctgg agggccgcctt tcgcctgtcc cacgtcctgc aaatgcagtg	600
cctctcggat ctggtgcagc gacccttctc ctggcatcgt ggcatttccg agattggagc	660
ctaacagtgt agatcctgag aacatcacccg aaattttcat cgcaaaccag aaaaggttag	720
aaatcatcaa cgaagatgat gttgaagcctt atgtgggact gagaaatctg acaattgtgg	780
attctggatt aaaatttgtg gctcataaag cttttctgaa aaacagcaac ctgcagcaca	840
tcaattttac ccgaaacaaa ctgacgagtt tgtctaggaa acatttccgt caccttgact	900
tgtctgaact gatcctgggtg ggcaatccat ttacatgctc ctgtgacatt atgtggatca	960
agactctcca agaggctaaa tccagtccag acactcagga tttgtactgc ctgaatgaaa	1020
gcagcaagaa tattcccttg gcaaacctgc agatacccaa ttgtggtttg ccatctgcaa	1080
atctggccgc acctaacctc actgtggagg aaggaaagtc tatcacatta tctgtagtg	1140
tggcagtgta tccggttcct aatatgtatt gggatgttgg taacctggtt tccaaacata	1200
tgaatgaaac aagccacaca cagggtcctt taaggataac taacatttca tccgatgaca	1260
gtgggaagca gatctcttgt gtggcggaac atctttagg agaagatcaa gattctgtca	1320
acctcactgt gcattttgca ccaactatca cttttctga atctccaacc tcagaccacc	1380
actggtgcat tccattcact gtgaaaggca accccaaacc agcgcttcag tggttctata	1440
acggggcaat attgaatgag tccaaataca tctgtactaa aatacatgtt accaatcaca	1500
cggagtacca cggtgcctc cagctggata atccactca catgaacaat ggggactaca	1560
ctctaatagc caagaatgag tatgggaagg atgagaaaca gatttctgct cacttcatgg	1620
gctggcctgg aattgacgat ggtgcaaacc caaattatcc tgatgtaatt tatgaagatt	1680
atggaactgc agcgaatgac atcggggaca ccacgaacag aagtaatgaa atcccttcca	1740
cagacgtcac tgataaaacc ggtcgggaac atctctcggc ctatgctgtg gtggtgattg	1800
cgtctgtggt gggattttgc ctttttggtaa tgtgttttct gcttaagttg gcaagacact	1860
ccaagtttgg catgaaagat ttctcatggt ttggatttgg gaaagtataa tcaagacaag	1920
gtgttggccc agcctccgtt atcagcaatg atgatgactc tgccagccca ctccatcaca	1980
tctccaatgg gtagtaacct ccatcttctt cggaaggtgg cccagatgct gtcattattg	2040
gaatgaccaa gatccctgtc attgaaaatc cccagtactt tggcatcacc aacagtcagc	2100
tcaagccaga cacatttgtt cagcacatca agcgacataa cattgttctg aaaagggagc	2160
taggcgaagg agccttttga aaagtgttcc tagctgaatg ctataacctc tgtcctgagc	2220
aggacaagat cttggtggca gtgaagacct tgaaggatgc cagtgacaat gcacgcaagg	2280
acttccaccg tgaggccgag ctcttgacca acctccagca tgagcacatc gtcaagttct	2340
atggcgtctg cgtggagggc gacccctca tcatggtctt tgaglacatg aagcatgggg	2400

acctcaacaa gticcctcagg gcacacggcc ctgatgccgt gctgatggct gagggcaacc 2460
cgcccacgga actgacgcag tcgcagatgc tgcataatagc ccagcagatc gccgcgggca 2520

tggtctacct ggcgteccag cacttcgtgc accgcgattt ggccaccagg aactgcctgg 2580
tcggggagaa ctigctgggtg aaaatcgggg actttgggat gtcccgggac gtgtacagca 2640
ctgactacta cagggtcggg ggccacacaa tgcctgcccatt tcgctggatg cctccagaga 2700
gcatcatgta caggaaattc acgacggaaa gcgacgtctg gagcctgggg gtcgtgttgt 2760
gggagatttt cacctatggc aaacagccct ggtaccagct gtcaacaat gaggtgatag 2820
agtgtatcac tcagggccga gtctctgcagc gaccccgac gtgccccag gaggtgtatg 2880
agctgatgct ggggtgctgg cagcgagagc cccacatgag gaagaacatc aagggcattcc 2940

ataccctcct tcagaacttg gccaaaggcat ctccggtcta cctggacatt ctaggctagg 3000
gcccttttcc ccagaccgat ccttcccaac gtactcctca gacgggctga gaggatgaac 3060
atcttttaac tgcgcgtgga ggccaccaag ctgctctcct tcactctgac agtattaaca 3120
tcaaagactc cgagaagctc tcgaggggaag cagtgtgtac ttcttcatcc atagacacag 3180
tattgacttc tttttggcat tatctctttc tctctttcca tctcccttgg ttgttctttt 3240
ttcttttttt aaattttctt tttcttcttt ttttctgtct tccctgcttc acgattctta 3300
ccctttcttt tgaatcaatc tggcttctgc attactatta actctgcata gacaaaggcc 3360

ttaacaaacg taatttgta tatcagcaga cactccagtt tgcccaccac aactaacaat 3420
gccttgttgt attcctgcct ttgatgtgga tgaaaaaag ggaacacaaa tatttcactt 3480
aaactttgtc acttctgctg tacagataatc gagagtctt atggattcac ttctatttat 3540
ttattattat tactgttctt attgtttttg gatggcttaa gccigtgtat aaaaaagaaa 3600
acttgtgttc aatctgtgaa gcccttatct atgggagatt aaaaccagag agaaagaaga 3660
tttattatga accgcaatat gggaggaaca aagacaacca ctgggatcag ctggtgtcag 3720
tccctactta ggaaatactc agcaactgtt agctgggaag aatgtattcg gcaccttccc 3780

ctgaggacct ttctgaggag taaaaagact actggcctct gtgccatgga tgattctttt 3840
cccatcacca gaaatgatag cgtgcagtag agagcaaaga tggcttccgt gagacacaag 3900
atggcgcata gtgtgctcgg acacagtttt gtcttcgtag gttgtgatga tagcactggt 3960
ttgtttctca agcgtatcc acagaacctt tgcacttc agttgaaaag aggtggattc 4020
atgtccagag ctcatctcgg ggtcaggtgg gaaagcc 4057

<210> 9

<211> 2466

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(93)

<223> Signal Peptide

<220><221> misc_feature

<222> (94)..(1287)

<223> Extracellular Domain

<220><221> misc_feature

<222> (1288)..(1359)

<223> Transmembrane Domain

<220><221> misc_feature

<222> (1360)..(2463)

<223> Cytoplasmic Domain

<400> 9

atgtcgcct ggctgaagtg gcatggacc gccatggcgc ggctctgggg cttatgcctg	60
ctggctttgg gcttctggag ggcctctctc gcctgccga cgtcctgcaa atgcagttcc	120
gctaggattt ggtgtactga gccttctcca ggcatcgtgg cattcccag gtiggaaact	180
aacagcgttg acccgagaa catcacggaa attctcattg caaaccagaa aaggctagaa	240

atcatcaatg aagatgacgt tgaagcttac gtgggctga gaaaccttac aattgtggat	300
tccggcttaa agtttgtggc ttacaaagcg tttctgaaaa acagcaacct gcggcacata	360
aatttcacac gaaacaagct gacgagtttg tccaggagac atttccgcca cttgacttg	420
tctgacctga tctgacggg taatccgttc acgtgctcct gcgacatcat gtggctcaag	480
actctccagg agactaaatc cagccccgac actcaggatt tgtactgcct caatgagagc	540
agcaagaaca tgccctggc gaacctgcag ataccaatt gtggtctgcc atctgcacgt	600
ctggctgctc ctaacctcac cgtggaggaa ggaaagtctg tgacctttc ctgcagtgtg	660

gggggtgacc cactccccac cttgtactgg gacgttggga atttggtttc caagcacatg	720
aatgaaacaa gccacacaca gggctcctta aggataacga acatttcac tgatgacagt	780
ggaaagcaaa tcctttgtgt ggcagaaaac cttgtaggag aagatcaaga ttctgtgaac	840
ctcactgtgc attttgcgcc aactatcacg tttctcgagt ctccaacctc agatcaccac	900
tggtgcattc cattcactgt gagaggcaac cccaagcctg cgcttcagtg gttctacaat	960
ggggccatac tgaatgagtc caagtacatc tgtactaaga tccacgtcac caatcacacg	1020

gagtaccatg gctgcctcca gctggataac cccactcata tgaataacgg agactacacc 1080

ctgatggcca agaacgagta tgggaaggat gagagacaga tctccgctca cttcatgggc 1140

cggcctggag tcgactacga gacaaacca aattaccctg aagtcctcta tgaagactgg 1200

accacgcaa ctgacattgg ggatactacg aacaaaagta atgaaatccc ctccacggat 1260

gttgctgacc aaagcaatcg ggagcatctc tcggtctatg ccgtgggtgt gattgcatct 1320

gtggtgggat tctgcctgct ggtgatgttg ctctgctca agttggcgag acattccaag 1380

tttggcatga aaggcccagc ttcggtcatc agcaacgacg atgactctgc cagccccctc 1440

caccacatct ccaatgggag taacactcca tcttcttcgg agggcgggtcc cgacgtgtc 1500

attattggaa tgaccaagat tcctgttatt gaaaaccccc agtactttgg catcaccaac 1560

agtcagctca agccagacac atttgttcag catatcaaga gacacaacat cgttctgaag 1620

agggaacttg gggaaggagc cttcgggaaa gttttccttg ccgagtgtca caacctctgc 1680

ccagagcagg ataagatcct ggtggctgtg aagacgtga aggacgccag cgacaatgca 1740

cgcaaggact ttcacggga agctgagctg ctgaccaacc tccagcacga gcacattgtc 1800

aagttctacg gtgtctgtgt ggagggcgac ccactcatca tggcttttga gtacatgaag 1860

cacggggacc tcaacaagtt ccttagggca cacgggcccg acgcagtgtc gatggcagag 1920

ggtaaccgc ccacagagct gacgcagtcg cagatgtgc acatcgctca gcaaactgca 1980

gcaggtatgg tctacctggc gtcccaacac tttgtgcacc gtgacctggc caccggaac 2040

tgcttggtgg gagagaacct gctggtgaaa attggggact ttgggatgtc ccgagatgtg 2100

tacagaccg actactatcg ggtcgggtggc cacacaatgt tgccatccg atggatgcct 2160

ccagagagca tcatgtacg gaaattcacc accgagagcg acgtctggag cctgggcgtt 2220

gtgttggtgg agatcttcac ctacggcaag cagccctggt atcagctatc gaacaatgag 2280

gtgatagagt gcatcacca gggaagagtc cttcagcggc ctgaaactg tccccaggag 2340

gigtatgagc tcatgcttgg atgctggcag cggaaccac acaccggaa gaacatcaag 2400

agcatccaca cctccttca gaacttgcc aaggcatctc ccgtctacct ggatatccta 2460

ggctag 2466

<210> 10

<211> 2466

<212> DNA

<213> Rattus norvegicus

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(93)

<223> Signal Peptide

<220><221> misc_feature

<222> (94)..(1287)

<223> Extracellular Domain

<220><221> misc_feature

<222> (1288)..(1359)

<223> Transmembrane Domain

<220><221> misc_feature

<222> (1360)..(2463)

<223> Cytoplasmic Domain

<400> 10

atgtcgccct ggccgaggtg gcatggaccc gccatggcgc ggctctgggg cttatgcttg	60
ctggtcttgg gcttctggag ggcttctctt gcctgcccc tgtctgcaa atgcagcacc	120
actaggattt ggtgtaccga gccttctcct ggcatcgtgg catttccgag gttggaacct	180
aacagcattg acccagagaa catcaccgaa attctcattg caaaccagaa aaggtttagaa	240
atcatcaatg aagatgatgt cgaagcttac gtggggctga aaaaccttac aattgtggat	300
tccggcttaa agtttgtggc ttacaaggcg tttctgaaga acggcaacct gcggcacatc	360
aatttcactc gaaacaagct gacgagtttg tccaggagac atttccgcca ccttgacttg	420
tctgacctga tctgacggg taatccgttc acgtgttctt gtgacatcat gtggctcaag	480
actctccagg agacgaaatc cagccccgac actcaggatt tgtattgcct caatgagagc	540
agcaagaata cccctctggc gaacctgcag attcccaatt gtggctctgcc gtctgcacgt	600
ctggccgctc ctaacctcac ggtggaggaa gggaagtctg tgaccatttc ctgcagcgtc	660
gggggtgacc cgctccccac cttgtactgg gacgttggga atttggtttc caaacacatg	720
aatgaacaa gccacacaca gggctcctta aggataacaa acatttcac ggatgacagt	780
gggaaacaaa tctcttgtgt ggcagaaaac ctggttggag aagatcaaga ctctgtgaac	840
ctcactgtgc attttgcacc aaccatcaca tttctcgaat ctccaacctc agaccaccac	900
tggtgcattc cattcactgt gagaggcaac cccaagccag cacttcagtg gttctacaac	960
ggagccatac tgaatgaatc caagtacatc tgtacaaaa tacacgtcac caatcacacg	1020
gagtaccacg gctgcctcca gctggataac cccactcata tgaataatgg agactacacc	1080
ctaattggcca agaataaata tgggaaggac gagagacaga tttctgctca cttcatgggc	1140
cggcctggag ttgactatga gacaaacca aattaccctg aagtcctcta tgaagactgg	1200

accacgcaa ctgacatcgg ggatactaca aacaaaagta atgagatccc ctccacggat 1260
gttgcctgacc aaaccaatcg ggagcatctc tcggtctatg ccgtgggtgt gattgcctct 1320
gtggtaggat tctgcctgct ggtgatgctg cttctgctca agttggcgag acattccaag 1380
tttggcatga aaggcccagc ttccgtcatc agcaacgacg atgactctgc cagccctctc 1440
caccacatct ccaacgggag caacactccg tcttcttcgg agggcgggcc cgatgctgtc 1500
atcattggga tgaccaagat ccctgtcatt gaaaaccccc agtacttcgg tatcaccaac 1560
agccagctca agccggacac atttgttcag cacatcaaga gacacaacat cgttctgaag 1620

agggagcttg gagaaggagc ctttgggaaa gttttcctag cggagtgtca taacctctgc 1680
cccagacagg ataagatcct ggtggccgtg aagacgtga aggacgccag cgacaatgct 1740
cgcaaggact ttcatcgca agccgagctg ctgaccaacc tccagcacga gcacattgtc 1800
aagttctacg gtgtctgtgt ggagggcgac ccactcatca tggcttttga gtacatgaag 1860
cacggggacc tcaacaagtt ccttagggca cacgggccag atgcagtgtc gatggcagag 1920
ggtaaccgcg ccaccgagct gacgcagtcg cagatgctgc acatcgctca gcaaactgca 1980
gcaggcatgg tctacctggc atcccaacac ttcgtgcacc gagacctggc caccgggaac 2040

tgcttggttag gagagaacct gctggtgaaa attggggact tcgggatgtc ccgggatgta 2100
tacagaccg actactaccg ggttggtggc cacacaatgt tgcccatccg atggatgcct 2160
ccagagagca tcatgtacag gaaattcacc accgagagtg acgtctggag cctgggagtt 2220
gtgttggtgg agatcttcac ctacggcaag cagccctggg atcagctatc aaacaacgag 2280
gtgatagaat gcatcaccca gggcagagtc cttcagcggc ctgcacgtg tccccaggag 2340
gtgtacgagc tgatgctggg atgctggcag cgggaaccac acacaaggaa gaacatcaag 2400
aacatccaca cactccttca gaacttggcg aaggcgtgc ccgtctacct ggacatccta 2460

ggctag 2466

<210> 11
<211> 2517
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<220><221> misc_feature
<222> (1)..(93)
<223> Signal Peptide
<220><221> misc_feature
<222> (94)..(1290)
<223> Extracellular Domain

<220><221> misc_feature
 <222> (1291)..(1362)
 <223> Transmembrane Domain
 <220><221> misc_feature
 <222> (1363)..(2514)
 <223> Cytoplasmic Domain
 <400> 11
 atgtcgtcct ggataagggtg gcatggaccc gccatggcgc ggctctgggg cttctgctgg 60

 ctggttggtg gcttctggag ggccgctttc gctgtccca cgtcctgcaa atgcagtgcc 120
 tctcggatct gggtcagcga cccttctcct ggcatcgtgg catttccgag attggagcct 180
 aacagtgtag atcctgagaa catcaccgaa attttcatcg caaaccagaa aaggtagtaa 240
 atcatcaacg aagatgatgt tgaagcttat gtgggactga gaaatctgac aattgtggat 300
 tctggattaa aatttgtggc tcataaagca tttctgaaaa acagcaacct gcagcacatc 360
 aattttaccg gaaacaaact gacgagtttg tctaggaaac atttccgtca ccttgacttg 420
 tctgaactga tcttgggtgg caatccattt acatgctcct gtgacattat gtggatcaag 480

 actctccaag aggctaaatc cagtccagac actcaggatt tgtactgcct gaatgaaagc 540
 agcaagaata ttcccttgcc aaacctgcag ataccaatt gtggtttgcc atctgcaaat 600
 ctggccgcac ctaacctcac tgtggaggaa ggaaagtcta tcacattatc ctgtagtgtg 660
 gcaggtgatc cggttcctaa tatgtattgg gatgttggtg acctggttcc caaacatatg 720
 aatgaaacaa gccacacaca gggctcctta aggataacta acatttcac ccatgacagt 780
 gggaagcaga tctcttgtgt ggcggaaaat cttgtaggag aagatcaaga ttctgtcaac 840
 ctactgtgc attttgacc aactatcaca tttctcgaat ctccaacctc agaccaccac 900

 tgggtgcattc cattcactgt gaaaggcaac cccaaaccag cgcttcagtg gttctataac 960
 ggggcaatat tgaatgagtc caaatacatc tgtactaaaa tacatgttac caatcacacg 1020
 gagtaccacg gctgcctcca gctggataat cccactcaca tgaacaatgg ggactacact 1080
 ctaatagcca agaattgagta tgggaaggat gagaaacaga tttctgctca cttcatgggc 1140
 tggcctggaa ttgacgatgg tgcaaaccca aattatcctg atgtaattta tgaagattat 1200
 ggaactgcag cgaatgacat cggggacacc acgaacagaa gtaatgaaat cccttcacac 1260
 gacgtcactg ataaaaccgg tcgggaacat ctctcggctc atgctgtggt ggtgattgctg 1320

 tctgtggtgg gatattgcct ttgtgtaatg ctgtttctgc ttaagtgggc aagacactcc 1380
 aagtttggca tgaagatttt ctcatggttt ggatttggga aagtaaaatc aagacaaggt 1440

gttggcccag cctccgttat cagcaatgat gatgactctg ccagcccact ccatcacatc 1500
tccaatggga gtaacactcc atcttcttcg gaaggtggcc cagatgctgt cattattgga 1560
atgaccaaga tcctgtcat tgaatatccc cagtactttg gcatcaccaa cagtcagctc 1620
aagccagaca catttgttca gcacatcaag cgacataaca ttgttctgaa aagggagcta 1680
ggcgaaggag cctttggaaa agtgttccta gctgaatgct ataacctctg tcctgagcag 1740

gacaagatct tgggtggcagt gaagaccctg aaggatgcca gtgacaatgc acgcaaggac 1800
ttccaccgtg aggccgagct cctgaccaac ctccagcatg agcacatcgt caagtcttat 1860
ggcgtctgcg tggagggcga cccctcatc atggtctttg agtacatgaa gcatggggac 1920
ctcaacaagt tcctcagggc acacggccct gatgccgtgc tgatggctga gggcaacccg 1980
cccacggaac tgacgcagtc gcagatgctg catatagccc agcagatcgc cgcgggcatg 2040
gtctacctgg cgtcccagca cttcgtgcac cgcgatttgg ccaccaggaa ctgcctggtc 2100
ggggagaact tgctggtgaa aatcggggac tttgggatgt cccgggacgt gtacagcact 2160

gactactaca gggtcggtgg ccacacaatg ctgccattc gctggatgcc tccagagagc 2220
atcatgtaca ggaaattcac gacggaaagc gacgtctgga gcctgggggt cgtgttgttg 2280
gagattttca cctatggcaa acagccctgg taccagctgt caaacaatga ggtgatagag 2340
tgtatcactc agggccgagt cctgcagcga ccccgacgt gccccagga ggtgtatgag 2400
ctgatgctgg ggtgctggca gcgagagccc cacatgagga agaacaatcaa gggcatccat 2460
accctcttc agaacttggc caaggcatct ccggtctacc tggacattct aggctag 2517

<210> 12

<211> 2469

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(93)

<223> Signal Peptide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(93)

<223> Mouse Sequence

<220><221> misc_feature

<222> (94)..(1290)

<223> Extracellular Domain

<220><221> misc_feature

<222> (94)..(1296)

<223> Human Sequence

<220><221> misc_feature

<222> (1291)..(1362)

<223> Transmembrane Domain

<220><221> misc_feature

<222> (1297)..(2466)

<223> Mouse Sequence

<220><221> misc_feature

<222> (1363)..(2466)

<223> Cytoplasmic Domain

<400> 12

atgtcgccct ggctgaagtg gcatggaccc gccatggcgc ggctctgggg cttatgcctg 60

ctggtcttgg gcttctggag ggcctctctc gcctgtccca cgtcctgcaa atgcagtgcc 120

tctcggatct ggtgcagcga cccctctcct ggcatcgtgg catttccgag attggagcct 180

aacagtgtag atcctgagaa catcaccgaa attttcatcg caaaccagaa aaggttagaa 240

atcatcaacg aagatgatgt tgaagcttat gtgggactga gaaatctgac aattgtggat 300

tctggattaa aatttgtggc tcataaagca tttctgaaaa acagcaacct gcagcacatc 360

aattttaccc gaaacaaact gacgagtttg tctaggaaac atttccgtca ccttgacttg 420

tctgaactga tcttggtggg caatccattt acatgctcct gtgacattat gtggatcaag 480

actctccaag aggctaaatc cagtccagac actcaggatt tgtactgcct gaatgaaagc 540

agcaagaata ttcccctggc aaacctgcag atacccaatt gtggtttggc atctgcaaat 600

ctggccgcac ctaacctcac tgtggaggaa ggaaagtcta tcacattatc ctgtagtgtg 660

gcaggatgatc cggttcctaa tatgtattgg gatgttggta acctggttgc caaacatatg 720

aatgaaacaa gccacacaca gggctcctta aggataacta acatttcac ccatgacagt 780

gggaagcaga tctcttgtgt ggcggaaaat ctgtaggag aagatcaaga ttctgtcaac 840

ctcactgtgc attttgcacc aactatcaca tttctcgaat ctccaacctc agaccaccac 900

tgggtgattc cattcactgt gaaaggcaac cccaaaccag cgcttcagtg gttctataac 960

ggggcaatat tgaatgagtc caaatacatc tgtactaaaa tacatgttac caatcacacg 1020

gagtaccacg gctgcctcca gctggataat cccactcaca tgaacaatgg ggactacact 1080

ctaatagcc aagaatgagta tgggaaggat gagaaacaga tttctgctca cttcatgggc 1140

tggcctggaa ttgacgatgg tgcaaaccga aattatcctg atgtaattta tgaagattat 1200
 ggaactgcag cgaatgacat cggggacacc acgaacagaa gtaatgaaat cccttcacaa 1260

 gacgtcactg ataaaaccgg tcgggaacat ctctcggtct atgccgtggt ggtgattgca 1320
 tctgtggtgg gattctgcct gctggtgatg ttgctcctgc tcaagtggc gagacattcc 1380
 aagtttggca tgaaggccc agcttcggtc atcagcaacg acgatgactc tgccagcccc 1440
 ctccaccaca tctccaatgg gagtaacact ccatcttctt cggagggcgg tcccagcgt 1500
 gtcattattg gaatgacaa gattcctgtt attgaaaacc ccagtaactt tggcatcacc 1560
 aacagtcagc tcaagccaga cacatttgtt cagcatatca agagacacaa catcgttctg 1620
 aagagggaac ttggggaagg agccttcggg aaagttttcc ttgccgagtg ctacaacctc 1680

 tgcccagagc aggataagat cctggtggct gtgaagacgc tgaaggacgc cagcgacaat 1740
 gcacgcaagg actttcatcg ggaagctgag ctgctgacca acctccagca cgagcacatt 1800
 gtcaagttct acggtgtctg tgtggagggc gaccactca tcatggtctt tgagtacatg 1860
 aagcacgggg acctcaacaa gtctcttagg gcacacgggc ccgacgcagt gctgatggca 1920
 gagggtaacc cgcccacaga gctgacgcag tcgcagatgc tgcacatcgc tcagcaaatc 1980
 gcagcaggta tggctctact ggcgtcccaa cactttgtgc accgtgacct ggccaccggg 2040
 aactgcctgg tgggagagaa cctgctggtg aaaattgggg actttgggat gtcccagat 2100

 gtgtacagca ccgactacta tcgggtcggg ggccacacaa tgttgcccat ccgatggatg 2160
 cctccagaga gcatcatgta caggaaattc accaccgaga gcgacgtctg gacgtgggc 2220
 gttgtgtgt gggagatctt cacctacggc aagcagccct ggtatcagct atcgaaacat 2280
 gaggtgatag agtgcacac ccagggaaga gtccttcagc ggcctcgaac gtgtccccag 2340
 gaggtgatg agtcatgct tggatgctgg cagcggaac cacacaccg gaagaacatc 2400
 aagagcatcc acacctcct tcagaacttg gccaaagcat ctccgtcta cctggatata 2460
 ctaggctag 2469

<210> 13

<211> 2469

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(93)

<223> Signal Peptide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(93)

<223> Rat Sequence

<220><221> misc_feature

<222> (94)..(1290)

<223> Extracellular Domain

<220><221> misc_feature

<222> (94)..(1296)

<223> Human Sequence

<220><221> misc_feature

<222> (1291)..(1362)

<223> Transmembrane Domain

<220><221> misc_feature

<222> (1297)..(2466)

<223> Rat Sequence

<220><221> misc_feature

<222> (1363)..(2466)

<223> Cytoplasmic Domain

<400> 13

atgtcgccct ggccgaggtg gcatggaccc gccatggcgc ggctctgggg cttatgcttg 60

ctggctcttg gcttctggag ggcttctctt gcctgtccca cgtcctgcaa atgcagtgcc 120

tctcgatct ggtgcagcga ccttctcct ggcatcgtgg catttccgag attggagcct 180

aacagtgtag atcctgagaa catcacgaa attttcatcg caaaccagaa aaggttagaa 240

atcatcaacg aagatgatgt tgaagcttat gtgggactga gaaatctgac aattgtggat 300

tctggattaa aatttgtggc tcataaagca tttctgaaaa acagcaacct gcagcacatc 360

aattttaccg gaaacaaact gacgagtttg tctaggaac atttccgtca ccttgacttg 420

tctgaactga tcttggtggg caatccattt acatgctcct gtgacattat gtggatcaag 480

acttccaag aggctaaatc cagtccagac actcaggatt tgtactgcct gaatgaaagc 540

agcaagaata ttccccctggc aaacctgcag ataccaatt gtggtttgcc atctgcaaat 600

ctggccgcac ctaacctcac tgtggaggaa ggaaagtcta tcacattatc ctgtagtgtg 660

gcaggatgatc cggttccata tatgtattgg gatgttggta acctggtttc caaacatatg 720

aatgaaacaa gccacacaca gggctcctta aggataacta acatttcac ccatgacagt 780

gggaagcaga tcctttgtgt ggcggaaaat cttgtaggag aagatcaaga ttctgtcaac 840
ctcactgtgc attttgacc aactatcaca ttctcgaat ctccaacctc agaccaccac 900
tggtgcattc cattcactgt gaaaggcaac cccaaaccag cgcttcagtgt gtctctataac 960
ggggcaatat tgaatgagtc caaatacatc tgtactaaaa tacatgttac caatcacacg 1020
gagtaccacg gctgcctcca gctggataat cccactcaca tgaacaatgg ggactacact 1080
ctaatagcc aagaatgagta tgggaaggat gagaaacaga ttctgtctca cttcattgggc 1140
tggcctggaa ttgacgatgg tgcaaaccce aattatcctg atgtaattta tgaagattat 1200

ggaactgcag cgaatgacat cggggacacc acgaacagaa gtaatgaaat cccttcacac 1260
gacgtcactg ataaaaccgg tgggaacat ctctcggtct atgccgtggt ggtgattgcc 1320
tctgtggtag gattctgcct gctggtgatg ctgcttctgc tcaagttggc gagacattcc 1380
aagtttggca tgaaggccc agcttccgtc atcagcaacg acgatgactc tgccagccct 1440
ctccaccaca tctccaacgg gagcaacact ccgtcttctt cggagggcgg gcccgatgct 1500
gtcatcattg ggatgaccaa gatccctgtc attgaaaacc cccagtactt cggatcacc 1560
aacagccagc tcaagccgga cacatttgtt cagcacatca agagacacaa catcgttctg 1620

aagagggagc ttggagaagg agcctttggg aaagtittcc tagcggagtgt ctataacctc 1680
tgccccgagc aggataagat cctggtggcc gtgaagacgc tgaaggacgc cagcgacaat 1740
gtctgcaagg actttcatcg cgaagccgag ctgctgacca acctccagca cgagcacatt 1800
gtcaagttct acggtgtctg tgtggagggc gaccactca tcatggtctt tgagtacatg 1860
aagcacgggg acctcaacaa gtctcttagg gcacacgggc cagatgcagt gctgatggca 1920
gagggttaac cgcccaccga gctgacgcag tcgcagatgc tgcacatcgc tcagcaaatc 1980
gcagcaggca tggctctacct ggcaccccaa cacttcgtgc accgagacct ggccaccggg 2040

aactgcttgg taggagagaa cctgctggtg aaaattgggg acttcgggat gtccccggat 2100
gtatacagca ccgactacta ccgggttggg ggccacacaa tgttgccat ccgatggatg 2160
cctccagaga gcatcatgta caggaaattc accaccgaga gtgacgtctg gacgctggga 2220
gttgtgttgt gggagatctt cacctacggc aagcagccct ggatcagct atcaaacac 2280
gaggtgatag aatgcatcac ccagggcaga gtccttcagc ggcctcgac gtgtccccag 2340
gaggtgtacg agctgatgct gggatgctgg cagcgggaac cacacacaag gaagaacatc 2400
aagaacatcc acacactcct tcagaacttg gcgaaggcgt cgcccgctta cctggacatc 2460

ctaggctag 2469

<210> 14

<211> 22

<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 14	
aggtgggtag gtcctggaag tg	22
<210> 15	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 15	
aatgctgtcc caagagtggg	20
<210> 16	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 16	
gtcctgcac cctgtcttt g	21
<210> 17	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 17	
atgtgggcgt tgtcagtc c	21
<210> 18	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 18	
cgctgcagtg cattgaactc agca	24
<210> 19	

<211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220><223> Synthetic
 <400> 19
 ctgtggaggg acgtgaccag 20
 <210> 20
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic
 <400> 20
 tccgctagga ttggtgtac tg 22
 <210> 21
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic
 <400> 21
 agccttctcc aggcacgtg gcat 24
 <210> 22
 <211> 19
 <212> DNA
 <213>
 Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic
 <400> 22
 tccgggtcaa cgctgtag 19
 <210> 23
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic
 <400> 23

tcctgcgagg gttctgac	18
<210> 24	
<211> 29	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 24	
tgggtgctca tatgccagag aaattgtca	29
<210> 25	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 25	
cgatctgtga tggcctgctt ac	22
<210> 26	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 26	
gggctcaggc aggtatatgt tg	22
<210> 27	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 27	
acagatgctg tcccaaacat agcaaga	27
<210> 28	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> Synthetic

<400> 28

ccaaccctaa gccagtgaag cag 23

<210> 29

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 29

gtgctggaga ccaggagact 20

<210> 30

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 30

tgccatactc agtttatacg gtgctgac 28

<210> 31

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 31

gcctggtggc tcagtcaatg 20

<210> 32

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 32

gcagacactg gatgggtca 19

<210> 33

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 33	
ccatttcgca gttatgagaa gctgca	26
<210> 34	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 34	
acagggttag ctggtgaatg ga	22
<210> 35	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 35	
tcggagcaca ggactacag	19
<210> 36	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 36	
caagaggaac tgtgtccagg aaagc	25
<210> 37	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 37	
agcgtgcctc acctaacctc ta	22
<210> 38	

<211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic
 <400> 38
 gcacagcact gtaaaggca 19
 <210> 39
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic
 <400> 39
 acggaactcg aaggaattgg tattgttgt 29

 <210> 40
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic
 <400> 40
 acacagctat gggagaaaga ctg 23
 <210> 41
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic
 <400> 41
 ccggttggcg agtgcgcatg cac 23
 <210> 42
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic
 <400> 42

ccttccggtt ggcgagtgcg cat	23
<210> 43	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 43	
ccaagggtgc gttgatggat cta	23
<210> 44	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 44	
gaatgcccaag ggtgcgttga tgg	23
<210> 45	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 45	
ctgggtgatt gggactgaga aag	23
<210> 46	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 46	
cagccttgaa agtatggctt gggc	24
<210> 47	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> Synthetic

<400> 47

gcactcgcca accggaag

18

<210> 48

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 48

gaccagctca cccttactta tgg

23

<210> 49

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 49

actgaatgcc aagggtgcgt tga

23

<210> 50

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 50

tcttggaat ccgctgaaga gtt

23

<210> 51

<211> 31

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 51

Met Ser Pro Trp Leu Lys Trp His Gly Pro Ala Met Ala Arg Leu Trp

1

5

10

15

Gly Leu Cys Leu Leu Val Leu Gly Phe Trp Arg Ala Ser Leu Ala

20

25

30

<210> 52

<211> 398

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 52

Cys Pro Thr Ser Cys Lys Cys Ser Ser Ala Arg Ile Trp Cys Thr Glu

1 5 10 15

Pro Ser Pro Gly Ile Val Ala Phe Pro Arg Leu Glu Pro Asn Ser Val

20 25 30

Asp Pro Glu Asn Ile Thr Glu Ile Leu Ile Ala Asn Gln Lys Arg Leu

35 40 45

Glu Ile Ile Asn Glu Asp Asp Val Glu Ala Tyr Val Gly Leu Arg Asn

50 55 60

Leu Thr Ile Val Asp Ser Gly Leu Lys Phe Val Ala Tyr Lys Ala Phe

65 70 75 80

Leu Lys Asn Ser Asn Leu Arg His Ile Asn Phe Thr Arg Asn Lys Leu

85 90 95

Thr Ser Leu Ser Arg Arg His Phe Arg His Leu Asp Leu Ser Asp Leu

100 105 110

Ile Leu Thr Gly Asn Pro Phe Thr Cys Ser Cys Asp Ile Met Trp Leu

115 120 125

Lys Thr Leu Gln Glu Thr Lys Ser Ser Pro Asp Thr Gln Asp Leu Tyr

130 135 140

Cys Leu Asn Glu Ser Ser Lys Asn Met Pro Leu Ala Asn Leu Gln Ile

145 150 155 160

Pro Asn Cys Gly Leu Pro Ser Ala Arg Leu Ala Ala Pro Asn Leu Thr

165 170 175

Val Glu Glu Gly Lys Ser Val Thr Leu Ser Cys Ser Val Gly Gly Asp

180 185 190

Pro Leu Pro Thr Leu Tyr Trp Asp Val Gly Asn Leu Val Ser Lys His

195 200 205

Met Asn Glu Thr Ser His Thr Gln Gly Ser Leu Arg Ile Thr Asn Ile

210 215 220
Ser Ser Asp Asp Ser Gly Lys Gln Ile Ser Cys Val Ala Glu Asn Leu

225 230 235 240
Val Gly Glu Asp Gln Asp Ser Val Asn Leu Thr Val His Phe Ala Pro

245 250 255
Thr Ile Thr Phe Leu Glu Ser Pro Thr Ser Asp His His Trp Cys Ile

260 265 270
Pro Phe Thr Val Arg Gly Asn Pro Lys Pro Ala Leu Gln Trp Phe Tyr

275 280 285
Asn Gly Ala Ile Leu Asn Glu Ser Lys Tyr Ile Cys Thr Lys Ile His

290 295 300
Val Thr Asn His Thr Glu Tyr His Gly Cys Leu Gln Leu Asp Asn Pro

305 310 315 320
Thr His Met Asn Asn Gly Asp Tyr Thr Leu Met Ala Lys Asn Glu Tyr

325 330 335
Gly Lys Asp Glu Arg Gln Ile Ser Ala His Phe Met Gly Arg Pro Gly

340 345 350
Val Asp Tyr Glu Thr Asn Pro Asn Tyr Pro Glu Val Leu Tyr Glu Asp

355 360 365
Trp Thr Thr Pro Thr Asp Ile Gly Asp Thr Thr Asn Lys Ser Asn Glu

370 375 380
Ile Pro Ser Thr Asp Val Ala Asp Gln Ser Asn Arg Glu His

385 390 395

<210> 53

<211> 24

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 53

Leu Ser Val Tyr Ala Val Val Val Ile Ala Ser Val Val Gly Phe Cys

1 5 10 15

Leu Leu Val Met Leu Leu Leu Leu

20

<210> 54

<211> 368

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 54

Lys Leu Ala Arg His Ser Lys Phe Gly Met Lys Gly Pro Ala Ser Val

1 5 10 15

Ile Ser Asn Asp Asp Asp Ser Ala Ser Pro Leu His His Ile Ser Asn

20 25 30

Gly Ser Asn Thr Pro Ser Ser Ser Glu Gly Gly Pro Asp Ala Val Ile

35 40 45

Ile Gly Met Thr Lys Ile Pro Val Ile Glu Asn Pro Gln Tyr Phe Gly

50 55 60

Ile Thr Asn Ser Gln Leu Lys Pro Asp Thr Phe Val Gln His Ile Lys

65 70 75 80

Arg His Asn Ile Val Leu Lys Arg Glu Leu Gly Glu Gly Ala Phe Gly

85 90 95

Lys Val Phe Leu Ala Glu Cys Tyr Asn Leu Cys Pro Glu Gln Asp Lys

100 105 110

Ile Leu Val Ala Val Lys Thr Leu Lys Asp Ala Ser Asp Asn Ala Arg

115 120 125

Lys Asp Phe His Arg Glu Ala Glu Leu Leu Thr Asn Leu Gln His Glu

130 135 140

His Ile Val Lys Phe Tyr Gly Val Cys Val Glu Gly Asp Pro Leu Ile

145 150 155 160

Met Val Phe Glu Tyr Met Lys His Gly Asp Leu Asn Lys Phe Leu Arg

165 170 175

Ala His Gly Pro Asp Ala Val Leu Met Ala Glu Gly Asn Pro Pro Thr

180 185 190

Glu Leu Thr Gln Ser Gln Met Leu His Ile Ala Gln Gln Ile Ala Ala

195 200 205

Gly Met Val Tyr Leu Ala Ser Gln His Phe Val His Arg Asp Leu Ala
 210 215 220
 Thr Arg Asn Cys Leu Val Gly Glu Asn Leu Leu Val Lys Ile Gly Asp
 225 230 235 240

Phe Gly Met Ser Arg Asp Val Tyr Ser Thr Asp Tyr Tyr Arg Val Gly
 245 250 255
 Gly His Thr Met Leu Pro Ile Arg Trp Met Pro Pro Glu Ser Ile Met
 260 265 270
 Tyr Arg Lys Phe Thr Thr Glu Ser Asp Val Trp Ser Leu Gly Val Val
 275 280 285
 Leu Trp Glu Ile Phe Thr Tyr Gly Lys Gln Pro Trp Tyr Gln Leu Ser
 290 295 300

Asn Asn Glu Val Ile Glu Cys Ile Thr Gln Gly Arg Val Leu Gln Arg
 305 310 315 320
 Pro Arg Thr Cys Pro Gln Glu Val Tyr Glu Leu Met Leu Gly Cys Trp
 325 330 335
 Gln Arg Glu Pro His Thr Arg Lys Asn Ile Lys Ser Ile His Thr Leu
 340 345 350
 Leu Gln Asn Leu Ala Lys Ala Ser Pro Val Tyr Leu Asp Ile Leu Gly
 355 360 365

<210> 55

<211> 31

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 55

Met Ser Pro Trp Pro Arg Trp His Gly Pro Ala Met Ala Arg Leu Trp
 1 5 10 15
 Gly Leu Cys Leu Leu Val Leu Gly Phe Trp Arg Ala Ser Leu Ala
 20 25 30

<210> 56

<211> 398

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 56

Cys Pro Met Ser Cys Lys Cys Ser Thr Thr Arg Ile Trp Cys Thr Glu
1 5 10 15

Pro Ser Pro Gly Ile Val Ala Phe Pro Arg Leu Glu Pro Asn Ser Ile
20 25 30

Asp Pro Glu Asn Ile Thr Glu Ile Leu Ile Ala Asn Gln Lys Arg Leu
35 40 45

Glu Ile Ile Asn Glu Asp Asp Val Glu Ala Tyr Val Gly Leu Lys Asn
50 55 60

Leu Thr Ile Val Asp Ser Gly Leu Lys Phe Val Ala Tyr Lys Ala Phe
65 70 75 80

Leu Lys Asn Gly Asn Leu Arg His Ile Asn Phe Thr Arg Asn Lys Leu
85 90 95

Thr Ser Leu Ser Arg Arg His Phe Arg His Leu Asp Leu Ser Asp Leu
100 105 110

Ile Leu Thr Gly Asn Pro Phe Thr Cys Ser Cys Asp Ile Met Trp Leu
115 120 125

Lys Thr Leu Gln Glu Thr Lys Ser Ser Pro Asp Thr Gln Asp Leu Tyr
130 135 140

Cys Leu Asn Glu Ser Ser Lys Asn Thr Pro Leu Ala Asn Leu Gln Ile
145 150 155 160

Pro Asn Cys Gly Leu Pro Ser Ala Arg Leu Ala Ala Pro Asn Leu Thr
165 170 175

Val Glu Glu Gly Lys Ser Val Thr Ile Ser Cys Ser Val Gly Gly Asp
180 185 190

Pro Leu Pro Thr Leu Tyr Trp Asp Val Gly Asn Leu Val Ser Lys His
195 200 205

Met Asn Glu Thr Ser His Thr Gln Gly Ser Leu Arg Ile Thr Asn Ile
210 215 220

Ser Ser Asp Asp Ser Gly Lys Gln Ile Ser Cys Val Ala Glu Asn Leu

225 230 235 240
 Val Gly Glu Asp Gln Asp Ser Val Asn Leu Thr Val His Phe Ala Pro
 245 250 255
 Thr Ile Thr Phe Leu Glu Ser Pro Thr Ser Asp His His Trp Cys Ile
 260 265 270

 Pro Phe Thr Val Arg Gly Asn Pro Lys Pro Ala Leu Gln Trp Phe Tyr
 275 280 285
 Asn Gly Ala Ile Leu Asn Glu Ser Lys Tyr Ile Cys Thr Lys Ile His
 290 295 300
 Val Thr Asn His Thr Glu Tyr His Gly Cys Leu Gln Leu Asp Asn Pro
 305 310 315 320
 Thr His Met Asn Asn Gly Asp Tyr Thr Leu Met Ala Lys Asn Glu Tyr
 325 330 335

 Gly Lys Asp Glu Arg Gln Ile Ser Ala His Phe Met Gly Arg Pro Gly
 340 345 350
 Val Asp Tyr Glu Thr Asn Pro Asn Tyr Pro Glu Val Leu Tyr Glu Asp
 355 360 365
 Trp Thr Thr Pro Thr Asp Ile Gly Asp Thr Thr Asn Lys Ser Asn Glu
 370 375 380
 Ile Pro Ser Thr Asp Val Ala Asp Gln Thr Asn Arg Glu His
 385 390 395

<210> 57

<211> 24

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 57

Leu Ser Val Tyr Ala Val Val Val Ile Ala Ser Val Val Gly Phe Cys
 1 5 10 15
 Leu Leu Val Met Leu Leu Leu Leu
 20

<210> 58

<211> 368

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 58

Lys Leu Ala Arg His Ser Lys Phe Gly Met Lys Gly Pro Ala Ser Val

1 5 10 15

Ile Ser Asn Asp Asp Asp Ser Ala Ser Pro Leu His His Ile Ser Asn

20 25 30

Gly Ser Asn Thr Pro Ser Ser Ser Glu Gly Gly Pro Asp Ala Val Ile

35 40 45

Ile Gly Met Thr Lys Ile Pro Val Ile Glu Asn Pro Gln Tyr Phe Gly

50 55 60

Ile Thr Asn Ser Gln Leu Lys Pro Asp Thr Phe Val Gln His Ile Lys

65 70 75 80

Arg His Asn Ile Val Leu Lys Arg Glu Leu Gly Glu Gly Ala Phe Gly

85 90 95

Lys Val Phe Leu Ala Glu Cys Tyr Asn Leu Cys Pro Glu Gln Asp Lys

100 105 110

Ile Leu Val Ala Val Lys Thr Leu Lys Asp Ala Ser Asp Asn Ala Arg

115 120 125

Lys Asp Phe His Arg Glu Ala Glu Leu Leu Thr Asn Leu Gln His Glu

130 135 140

His Ile Val Lys Phe Tyr Gly Val Cys Val Glu Gly Asp Pro Leu Ile

145 150 155 160

Met Val Phe Glu Tyr Met Lys His Gly Asp Leu Asn Lys Phe Leu Arg

165 170 175

Ala His Gly Pro Asp Ala Val Leu Met Ala Glu Gly Asn Pro Pro Thr

180 185 190

Glu Leu Thr Gln Ser Gln Met Leu His Ile Ala Gln Gln Ile Ala Ala

195 200 205

Gly Met Val Tyr Leu Ala Ser Gln His Phe Val His Arg Asp Leu Ala

210 215 220

Thr Arg Asn Cys Leu Val Gly Glu Asn Leu Leu Val Lys Ile Gly Asp
 225 230 235 240
 Phe Gly Met Ser Arg Asp Val Tyr Ser Thr Asp Tyr Tyr Arg Val Gly
 245 250 255
 Gly His Thr Met Leu Pro Ile Arg Trp Met Pro Pro Glu Ser Ile Met
 260 265 270
 Tyr Arg Lys Phe Thr Thr Glu Ser Asp Val Trp Ser Leu Gly Val Val
 275 280 285
 Leu Trp Glu Ile Phe Thr Tyr Gly Lys Gln Pro Trp Tyr Gln Leu Ser
 290 295 300
 Asn Asn Glu Val Ile Glu Cys Ile Thr Gln Gly Arg Val Leu Gln Arg
 305 310 315 320
 Pro Arg Thr Cys Pro Gln Glu Val Tyr Glu Leu Met Leu Gly Cys Trp
 325 330 335
 Gln Arg Glu Pro His Thr Arg Lys Asn Ile Lys Asn Ile His Thr Leu
 340 345 350
 Leu Gln Asn Leu Ala Lys Ala Ser Pro Val Tyr Leu Asp Ile Leu Gly
 355 360 365
 <210> 59
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 59
 Met Ser Ser Trp Ile Arg Trp His Gly Pro Ala Met Ala Arg Leu Trp
 1 5 10 15
 Gly Phe Cys Trp Leu Val Val Gly Phe Trp Arg Ala Ala Phe Ala
 20 25 30
 <210> 60
 <211> 399
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 60

Cys Pro Thr Ser Cys Lys Cys Ser Ala Ser Arg Ile Trp Cys Ser Asp
 1 5 10 15
 Pro Ser Pro Gly Ile Val Ala Phe Pro Arg Leu Glu Pro Asn Ser Val
 20 25 30
 Asp Pro Glu Asn Ile Thr Glu Ile Phe Ile Ala Asn Gln Lys Arg Leu
 35 40 45
 Glu Ile Ile Asn Glu Asp Asp Val Glu Ala Tyr Val Gly Leu Arg Asn

 50 55 60
 Leu Thr Ile Val Asp Ser Gly Leu Lys Phe Val Ala His Lys Ala Phe
 65 70 75 80
 Leu Lys Asn Ser Asn Leu Gln His Ile Asn Phe Thr Arg Asn Lys Leu
 85 90 95
 Thr Ser Leu Ser Arg Lys His Phe Arg His Leu Asp Leu Ser Glu Leu
 100 105 110
 Ile Leu Val Gly Asn Pro Phe Thr Cys Ser Cys Asp Ile Met Trp Ile

 115 120 125
 Lys Thr Leu Gln Glu Ala Lys Ser Ser Pro Asp Thr Gln Asp Leu Tyr
 130 135 140
 Cys Leu Asn Glu Ser Ser Lys Asn Ile Pro Leu Ala Asn Leu Gln Ile
 145 150 155 160
 Pro Asn Cys Gly Leu Pro Ser Ala Asn Leu Ala Ala Pro Asn Leu Thr
 165 170 175
 Val Glu Glu Gly Lys Ser Ile Thr Leu Ser Cys Ser Val Ala Gly Asp

 180 185 190
 Pro Val Pro Asn Met Tyr Trp Asp Val Gly Asn Leu Val Ser Lys His
 195 200 205
 Met Asn Glu Thr Ser His Thr Gln Gly Ser Leu Arg Ile Thr Asn Ile
 210 215 220
 Ser Ser Asp Asp Ser Gly Lys Gln Ile Ser Cys Val Ala Glu Asn Leu
 225 230 235 240
 Val Gly Glu Asp Gln Asp Ser Val Asn Leu Thr Val His Phe Ala Pro

245 250 255
 Thr Ile Thr Phe Leu Glu Ser Pro Thr Ser Asp His His Trp Cys Ile
 260 265 270
 Pro Phe Thr Val Lys Gly Asn Pro Lys Pro Ala Leu Gln Trp Phe Tyr
 275 280 285
 Asn Gly Ala Ile Leu Asn Glu Ser Lys Tyr Ile Cys Thr Lys Ile His
 290 295 300
 Val Thr Asn His Thr Glu Tyr His Gly Cys Leu Gln Leu Asp Asn Pro

305 310 315 320
 Thr His Met Asn Asn Gly Asp Tyr Thr Leu Ile Ala Lys Asn Glu Tyr
 325 330 335
 Gly Lys Asp Glu Lys Gln Ile Ser Ala His Phe Met Gly Trp Pro Gly
 340 345 350
 Ile Asp Asp Gly Ala Asn Pro Asn Tyr Pro Asp Val Ile Tyr Glu Asp
 355 360 365
 Tyr Gly Thr Ala Ala Asn Asp Ile Gly Asp Thr Thr Asn Arg Ser Asn

370 375 380
 Glu Ile Pro Ser Thr Asp Val Thr Asp Lys Thr Gly Arg Glu His

385 390 395

<210> 61

<211> 24

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 61

Leu Ser Val Tyr Ala Val Val Val Ile Ala Ser Val Val Gly Phe Cys

1 5 10 15

Leu Leu Val Met Leu Phe Leu Leu

20

<210> 62

<211> 384

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 62

Lys Leu Ala Arg His Ser Lys Phe Gly Met Lys Asp Phe Ser Trp Phe

1 5 10 15

Gly Phe Gly Lys Val Lys Ser Arg Gln Gly Val Gly Pro Ala Ser Val

20 25 30

Ile Ser Asn Asp Asp Asp Ser Ala Ser Pro Leu His His Ile Ser Asn

35 40 45

Gly Ser Asn Thr Pro Ser Ser Ser Glu Gly Gly Pro Asp Ala Val Ile

50 55 60

Ile Gly Met Thr Lys Ile Pro Val Ile Glu Asn Pro Gln Tyr Phe Gly

65 70 75 80

Ile Thr Asn Ser Gln Leu Lys Pro Asp Thr Phe Val Gln His Ile Lys

85 90 95

Arg His Asn Ile Val Leu Lys Arg Glu Leu Gly Glu Gly Ala Phe Gly

100 105 110

Lys Val Phe Leu Ala Glu Cys Tyr Asn Leu Cys Pro Glu Gln Asp Lys

115 120 125

Ile Leu Val Ala Val Lys Thr Leu Lys Asp Ala Ser Asp Asn Ala Arg

130 135 140

Lys Asp Phe His Arg Glu Ala Glu Leu Leu Thr Asn Leu Gln His Glu

145 150 155 160

His Ile Val Lys Phe Tyr Gly Val Cys Val Glu Gly Asp Pro Leu Ile

165 170 175

Met Val Phe Glu Tyr Met Lys His Gly Asp Leu Asn Lys Phe Leu Arg

180 185 190

Ala His Gly Pro Asp Ala Val Leu Met Ala Glu Gly Asn Pro Pro Thr

195 200 205

Glu Leu Thr Gln Ser Gln Met Leu His Ile Ala Gln Gln Ile Ala Ala

210 215 220

Gly Met Val Tyr Leu Ala Ser Gln His Phe Val His Arg Asp Leu Ala

225 230 235 240

Thr Arg Asn Cys Leu Val Gly Glu Asn Leu Leu Val Lys Ile Gly Asp

	245	250	255	
Phe Gly Met Ser Arg Asp Val Tyr Ser Thr Asp Tyr Tyr Arg Val Gly				
	260	265	270	
Gly His Thr Met Leu Pro Ile Arg Trp Met Pro Pro Glu Ser Ile Met				
	275	280	285	
Tyr Arg Lys Phe Thr Thr Glu Ser Asp Val Trp Ser Leu Gly Val Val				
	290	295	300	
Leu Trp Glu Ile Phe Thr Tyr Gly Lys Gln Pro Trp Tyr Gln Leu Ser				
305	310	315	320	
Asn Asn Glu Val Ile Glu Cys Ile Thr Gln Gly Arg Val Leu Gln Arg				
	325	330	335	
Pro Arg Thr Cys Pro Gln Glu Val Tyr Glu Leu Met Leu Gly Cys Trp				
	340	345	350	
Gln Arg Glu Pro His Met Arg Lys Asn Ile Lys Gly Ile His Thr Leu				
	355	360	365	
Leu Gln Asn Leu Ala Lys Ala Ser Pro Val Tyr Leu Asp Ile Leu Gly				
	370	375	380	
<210> 63				
<211> 93				
<212> DNA				
<213> Mus musculus				
<400> 63				
atgtcgccct ggctgaagtg gcatggaccc gccatggcgc ggctctgggg cttatgcctg				60
ctggtcttgg gcttctggag ggcctctctc gcc				93
<210> 64				
<211> 1194				
<212> DNA				
<213> Mus musculus				
<400> 64				
tgcccgacgt cctgcaaatg cagttccgct aggatttgggt gtactgagcc ttctccaggc				60
atcgtggcat tcccgaggtt ggaacctaac agcgttgacc cggagaacat cacggaaatt				120

ctcattgcaa accagaaaag gctagaaatc atcaatgaag atgacgttga agcttacgtg 180

gggctgagaa accttacaat tgttgattcc ggcttaaagt ttgtggctta caaagcgttt 240

ctgaaaaaca gcaacctgcg gcacataaat ttcacacgaa acaagctgac gagtttgtec 300

aggagacatt tccgccacct tgacttgtct gacctgatcc tgacgggtaa tccgttcacg 360

tgctcctgcg acatcatgtg gctcaagact ctccaggaga ctaaateccag ccccgacact 420

caggatttgt actgcctcaa tgagagcagc aagaacatgc ccctggcgaa cctgcagata 480

cccaattgtg gtctgccatc tgcacgtctg gctgctccta acctcaccgt ggaggaagga 540

aagtctgtga ccccttcctg cagtgtgggg ggtgacccac tccccacctt gtactgggac 600

gttgggaatt tggtttccaa gcacatgaat gaaacaagcc acacacaggg ctcttaagg 660

ataacgaaca ttcatctga tgacagtga aagcaaatct cttgtgtggc agaaaacctt 720

gtaggagaag atcaagattc tgtgaacctc actgtgcatt ttgcgccaac tatcacgttt 780

ctcgagtctc caacctcaga tcaccactgg tgcatccat tcaactgtgag aggcaacccc 840

aagcctgcgc ttcagtgggt ctacaatggg gccatactga atgagtcaa gtacatctgt 900

actaagatcc acgtcaccaa tcacacggag taccatggct gcctccagct ggataacccc 960

actcatatga ataacggaga ctacacctg atggccaaga acgagtatgg gaaggatgag 1020

agacagatct ccgtcactt catgggccgg cctggagtgc actacgagac aaacccaaat 1080

tacctgaag tcctctatga agactggacc acgccaactg acattgggga tactacgaac 1140

aaaagtaatg aaatccctc cacggatgtt gctgaccaa gcaatcgga gcat 1194

<210> 65

<211> 72

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 65

ctctcgtct atgccgtgg ggtgattgca tctgtgtgg gattctgcct gctggtgatg 60

ttgtcctgc tc 72

<210> 66

<211> 1104

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 66

aagttggcga gacattcaa gtttggcatg aaaggcccag cttcggatcat cagcaacgac 60

gatgactctg ccagccccct ccaccacatc tccaatggga gtaacactcc atcttcttcg	120
gagggcggtc ccgacgtgt cattattgga atgaccaaga ttcctgttat tgaaaacccc	180
cagtactttg gcatcaccaa cagtcagctc aagccagaca catttgttca gcataatcaag	240
agacacaaca tcgttctgaa gaggggaactt ggggaaggag ccttcgggaa agttttcctt	300
gccgagtgt acaacctctg cccagagcag gataagatcc tgggtggtgt gaagacgtg	360
aaggacgcca gcgacaatgc acgcaaggac tttcatcggg aagctgagct gctgaccaac	420
ctccagcacg agcacattgt caagtctac ggtgtctgtg tggagggcga cccactcatc	480
atggtctttg agtacaatga gcacggggac ctcaacaagt tccttagggc acacggggcc	540
gacgcagtgc tgatggcaga gggtaacccg cccacagagc tgacgcagtc gcagatgctg	600
cacatcgctc agcaaatcgc agcaggtatg gtctacctgg cgtccaaca ctttgtcac	660
cgtgacctgg ccacccggaa ctgcctggtg ggagagaacc tgctggtgaa aattggggac	720
tttgggatgt cccgagatgt gtacagcacc gactactatc gggtcggtgg ccacacaatg	780
ttgccatcc gatggatgcc tccagagagc atcatgtaca ggaaattcac caccgagagc	840
gacgtctgga gcctgggctg tgtgttgtgg gagatcttca cctacggcaa gcagccctgg	900
tatcagctat cgaacaatga ggtgatagag tgcatcacc agggaagagt ccttcagcgg	960
cctcgaacgt gtccccagga ggtgtatgag ctcatgcttg gatgctggca gcgggaacca	1020
cacacccgga agaacaatca gagcatccac accctcttc agaacttggc caaggcatct	1080
cccgtctacc tggatatcct aggc	1104
<210> 67	
<211> 93	
<212> DNA	
<213> Rattus norvegicus	
<400> 67	
atgtcgccct ggccgaggtg gcatggacc gccatggcgc ggctctgggg cttatgcttg	60
ctggtcttgg gcttctggag ggcttctctt gcc	93
<210> 68	
<211> 1194	
<212> DNA	
<213> Rattus norvegicus	
<400> 68	
tgccccatgt cctgcaaatg cagcaccact aggatttggg gtaccgagcc ttctcctggc	60
atcgtggcat ttccgaggtt ggaacctaac agcattgacc cagagaacat caccgaaatt	120

ctcattgcaa accagaaaag gttagaaatc atcaatgaag atgatgtcga agcttacgtg	180
gggctgaaaa accttacaat tgtggattcc ggcttaaagt ttgtggctta caaggcgttt	240
ctgaagaacg gcaacctgcg gcacatcaat ttcactcgaa acaagctgac gagtttgtcc	300
aggagacatt tccgccacct tgacttgtct gacctgatcc tgacgggtaa tccgttcacg	360
tgttcctgtg acatcatgtg gctcaagact ctccaggaga cgaaatccag ccccgacact	420
caggatttgt attgcctcaa tgagagcagc aagaataccc ctctggcgaa cctgcagatt	480
cccaattgtg gtctgccgtc tgcacgtctg gccgctccta acctcacggt ggaggaaggg	540
aagtctgtga ccatttcctg cagcgctggg ggtgaccgcg tccccacctt gtactgggac	600
gttgggaatt tggtttccaa acacatgaat gaaacaagcc acacacaggg ctcttaagg	660
ataacaaaca ttcatcgga tgacagtggg aaacaaatct cttgtgtggc agaaaacctc	720
gttggagaag atcaagactc tgtgaacctc actgtgcatt ttgcaccaac catcacattt	780
ctcgaatctc caacctcaga ccaccactgg tgcattccat tcaactgtgag aggcaacccc	840
aagccagcac ttcagtgggt ctacaacgga gccatactga atgaatcaa gtacatctgt	900
accaaaaatac acgtcaccaa tcacacggag taccacggct gcctccagct ggataacccc	960
actcatatga ataattggaga ctacacctta atggccaaga atgaatatgg gaaggacgag	1020
agacagattt ctgctcactt catgggccgg cctggagttg actatgagac aaacccaaat	1080
tacctgaag tctctatga agactggacc acgccaactg acatcgggga tactacaaac	1140
aaaagtaatg agatcccctc cacggatgtt gctgaccaa ccaatcgga gcat	1194
<210> 69	
<211> 72	
<212> DNA	
<213> Rattus norvegicus	
<400> 69	
ctctcgtct atgccgtgg ggtgattgcc tctgtgtag gattctgcct gctggatg	60
ctgcttctgc tc	72
<210> 70	
<211> 1104	
<212> DNA	
<213> Rattus norvegicus	
<400> 70	
aagttggcga gacattccaa gtttggcatg aaaggcccag cttccgtcat cagcaacgac	60

gatgactctg ccagccctct ccaccacatc tccaacggga gcaacactcc gtctttctcg 120

gagggcgggc ccgatgctgt catcattggg atgaccaaga tccctgtcat tgaaaacccc 180

cagtacttcg gtatcaccaa cagccagctc aagccggaca catttgttca gcacatcaag 240

agacacaaca tcgttctgaa gagggagctt ggagaaggag cctttgggaa agttttccta 300

gcggagtgtc ataacctctg ccccgagcag gataagatcc tggtagccgt gaagacgctg 360

aaggacgcca gcgacaatgc tcgcaaggac ttcatcgcg aagccgagct gctgaccaac 420

ctccagcagc agcacattgt caagtctac ggtgtctgtg tggagggcga cccactcatc 480

atggtctttg agtacatgaa gcacggggac ctcaacaagt tccttagggc acacgggcca 540

gatgcagtgc tgatggcaga gggtaacccg cccaccgagc tgacgcagtc gcagatgctg 600

cacatcgctc agcaaatgc agcaggcatg gtctacctgg catccaaca cttcgtgcac 660

cgagacctgg ccacccggaa ctgcttggta ggagagaacc tgctggtgaa aattggggac 720

ttcgggatgt cccgggatgt atacagcacc gactactacc gggttggtgg ccacacaatg 780

ttgcccatcc gatggatgcc tccagagagc atcatgtaca ggaaattcac caccgagagt 840

gacgtctgga gcctgggagt tgtgttgtgg gagatcttca cctacggcaa gcagccctgg 900

tatcagctat caaacaacga ggtgatagaa tgcatacccc agggcagagt cttcagcgg 960

cctcgacagt gtccccagga ggtgtacgag ctgatgctgg gatgctggca gcgggaacca 1020

cacacaagga agaacatcaa gaacatccac acactccttc agaacttggc gaaggcgtcg 1080

cccgtctacc tggacatcct aggc 1104

<210> 71

<211> 93

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 71

atgtcgtcct ggataagggtg gcatggaccc gccatggcgc ggctctgggg cttctgctgg 60

ctggttgtgg gcttctggag ggccgctttc gcc 93

<210> 72

<211> 1197

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 72

tgtccacagt cctgcaaatg cagtgcctct cggatctggt gcagcgaccc ttctcctggc 60

atcgtggcat ttcgagatt ggagcctaac agttagatc ctgagaacat caccgaaatt	120
tccatcgcaa accagaaaag gttagaaatc atcaacgaag atgatgttga agcttatgtg	180
ggactgagaa atctgacaat tgtggattct ggattaaaat ttgtggctca taaagcattt	240
ctgaaaaaca gcaacctgca gcacatcaat ttacccgaa acaaaactgac gagtttgtct	300
aggaaacatt tccgtcacct tgacttgtct gaactgatcc tgggtggcaa tccatttaca	360
tgctcctgtg acattatgtg gatcaagact ctccaagagg ctaaatccag tccagacact	420
caggatttgt actgcctgaa tgaaagcagc aagaatattc ccctggcaaa cctgcagata	480
cccaattgtg gtttgccatc tgcaaatctg gccgcaccta acctcactgt ggaggaagga	540
aagtctatca cattatcctg tagtgtggca ggtgatccgg ttcctaatat gtattgggat	600
gttggttaacc tggtttccaa acatatgaat gaaacaagcc acacacaggg ctcttaagg	660
ataactaaca tttcatccga tgacagtggg aagcagatct cttgtgtggc ggaaaatctt	720
gtaggagaag atcaagattc tgtcaacctc actgtgcatt ttgcaccaac tatcacattt	780
ctcgaatctc caacctcaga ccaccactgg tgcattccat tcactgtgaa aggcaacccc	840
aaaccagcgc ttcagtgggt ctataacggg gcaatattga atgagtccaa atacatctgt	900
actaaaatac atgttaccaa tcacacggag taccacggct gcctccagct ggataatccc	960
actcacatga acaatgggga ctacactcta atagccaaga atgagtatgg gaaggatgag	1020
aaacagattt ctgtcactt catgggctgg cctggaattg acgatggtgc aaacccaaat	1080
tatcctgatg taatttatga agattatgga actgcagcga atgacatcgg ggacaccacg	1140
aacagaagta atgaaatccc ttccacagac gtcactgata aaaccggtcg ggaacat	1197
<210> 73	
<211> 72	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 73	
ctctcggctc atgctgtggt ggtgattgcg tctgtggtgg gattttgcct ttggtaatg	60
ctgtttctgc tt	72
<210> 74	
<211> 1152	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 74	
aagttggcaa gacactccaa gtttggcatg aaagatttct catggtttgg atttgggaaa	60

gtaaaatcaa gacaagggtg tggcccagcc tccgttatca gcaatgatga tgactctgcc 120
 agcccactcc atcacatctc caatgggagc aacactccat cttcttcgga aggtggccca 180
 gatgctgtca ttattggaat gaccaagatc cctgtcattg aaaatcccca gtactttggc 240

 atcaccaaca gtcagctcaa gccagacaca ttgtttcagc acatcaagcg acataacatt 300
 gttctgaaaa gggagctagg cgaaggagcc ttggaaaag tgttcctagc tgaatgctat 360
 aacctctgtc ctgagcagga caagatcttg gtggcagtga agaccctgaa ggatgccagt 420
 gacaatgcac gcaaggactt ccaccgtgag gccgagctcc tgaccaacct ccagcatgag 480
 cacatcgtca agttctatgg cgtctgcgtg gagggcgacc ccctcatcat ggtctttgag 540
 tacatgaagc atggggacct caacaagttc ctgaggcac acggccctga tgccgtgctg 600
 atggctgagg gcaacccgcc cacggaactg acgcagtcgc agatgctgca tatagcccag 660

 cagatcgccg cgggcatggt ctacctggcg tcccagcact tcgtgcaccg cgatttggcc 720
 accaggaact gcctgggtcgg ggagaacttg ctggtgaaaa tcggggactt tgggatgtcc 780
 cgggacgtgt acagcactga ctactacagg gtcggtggcc acacaatgct gcccattcgc 840
 tggatgcctc cagagagcat catgtacagg aaattcacga cggaaagcga cgtctggagc 900
 ctgggggtcg tgttgtggga gatthtcacc tatggcaaac agccctggta ccagctgtca 960
 aacaatgagg tgatagagtg tatcactcag ggccgagtcc tgcagcgacc ccgcacgtgc 1020
 ccccaggagg tgtatgagct gatgctgggg tctgggcagc gagagcccca catgaggaag 1080

 aacatcaagg gcatccatac cctccttcag aacttgcca aggcattctc ggtctacctg 1140
 gacattctag gc 1152

 <210> 75
 <211> 822
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(31)
 <223> Signal Peptide
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (32)..(430)
 <223> Extracellular Domain
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (431)..(454)
 <223> Transmembrane Domain

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (455)..(822)

<223> Cytoplasmic Domain

<400> 75

Met Ser Ser Trp Ile Arg Trp His Gly Pro Ala Met Ala Arg Leu Trp

1 5 10 15

Gly Phe Cys Trp Leu Val Val Gly Phe Trp Arg Ala Ala Phe Ala Cys

20 25 30

Pro Thr Ser Cys Lys Cys Ser Ala Ser Arg Ile Trp Cys Ser Asp Pro

35 40 45

Ser Pro Gly Ile Val Ala Phe Pro Arg Leu Glu Pro Asn Ser Val Asp

50 55 60

Pro Glu Asn Ile Thr Glu Ile Phe Ile Ala Asn Gln Lys Arg Leu Glu

65 70 75 80

Ile Ile Asn Glu Asp Asp Val Glu Ala Tyr Val Gly Leu Arg Asn Leu

85 90 95

Thr Ile Val Asp Ser Gly Leu Lys Phe Val Ala His Lys Ala Phe Leu

100 105 110

Lys Asn Ser Asn Leu Gln His Ile Asn Phe Thr Arg Asn Lys Leu Thr

115 120 125

Ser Leu Ser Arg Lys His Phe Arg His Leu Asp Leu Ser Glu Leu Ile

130 135 140

Leu Val Gly Asn Pro Phe Thr Cys Ser Cys Asp Ile Met Trp Ile Lys

145 150 155 160

Thr Leu Gln Glu Ala Lys Ser Ser Pro Asp Thr Gln Asp Leu Tyr Cys

165 170 175

Leu Asn Glu Ser Ser Lys Asn Ile Pro Leu Ala Asn Leu Gln Ile Pro

180 185 190

Asn Cys Gly Leu Pro Ser Ala Asn Leu Ala Ala Pro Asn Leu Thr Val

195 200 205

Glu Glu Gly Lys Ser Ile Thr Leu Ser Cys Ser Val Ala Gly Asp Pro

210	215	220	
Val Pro Asn Met Tyr Trp Asp Val Gly Asn Leu Val Ser Lys His Met			
225	230	235	240
Asn Glu Thr Ser His Thr Gln Gly Ser Leu Arg Ile Thr Asn Ile Ser			
245	250	255	
Ser Asp Asp Ser Gly Lys Gln Ile Ser Cys Val Ala Glu Asn Leu Val			
260	265	270	
Gly Glu Asp Gln Asp Ser Val Asn Leu Thr Val His Phe Ala Pro Thr			
275	280	285	
Ile Thr Phe Leu Glu Ser Pro Thr Ser Asp His His Trp Cys Ile Pro			
290	295	300	
Phe Thr Val Lys Gly Asn Pro Lys Pro Ala Leu Gln Trp Phe Tyr Asn			
305	310	315	320
Gly Ala Ile Leu Asn Glu Ser Lys Tyr Ile Cys Thr Lys Ile His Val			
325	330	335	
Thr Asn His Thr Glu Tyr His Gly Cys Leu Gln Leu Asp Asn Pro Thr			
340	345	350	
His Met Asn Asn Gly Asp Tyr Thr Leu Ile Ala Lys Asn Glu Tyr Gly			
355	360	365	
Lys Asp Glu Lys Gln Ile Ser Ala His Phe Met Gly Trp Pro Gly Ile			
370	375	380	
Asp Asp Gly Ala Asn Pro Asn Tyr Pro Asp Val Ile Tyr Glu Asp Tyr			
385	390	395	400
Gly Thr Ala Ala Asn Asp Ile Gly Asp Thr Thr Asn Arg Ser Asn Glu			
405	410	415	
Ile Pro Ser Thr Asp Val Thr Asp Lys Thr Gly Arg Glu His Leu Ser			
420	425	430	
Val Tyr Ala Val Val Val Ile Ala Ser Val Val Gly Phe Cys Leu Leu			
435	440	445	
Val Met Leu Phe Leu Leu Lys Leu Ala Arg His Ser Lys Phe Gly Met			
450	455	460	

Lys Gly Pro Ala Ser Val Ile Ser Asn Asp Asp Asp Ser Ala Ser Pro
 465 470 475 480
 Leu His His Ile Ser Asn Gly Ser Asn Thr Pro Ser Ser Ser Glu Gly
 485 490 495
 Gly Pro Asp Ala Val Ile Ile Gly Met Thr Lys Ile Pro Val Ile Glu
 500 505 510

 Asn Pro Gln Tyr Phe Gly Ile Thr Asn Ser Gln Leu Lys Pro Asp Thr
 515 520 525
 Phe Val Gln His Ile Lys Arg His Asn Ile Val Leu Lys Arg Glu Leu
 530 535 540
 Gly Glu Gly Ala Phe Gly Lys Val Phe Leu Ala Glu Cys Tyr Asn Leu
 545 550 555 560
 Cys Pro Glu Gln Asp Lys Ile Leu Val Ala Val Lys Thr Leu Lys Asp
 565 570 575

 Ala Ser Asp Asn Ala Arg Lys Asp Phe His Arg Glu Ala Glu Leu Leu
 580 585 590
 Thr Asn Leu Gln His Glu His Ile Val Lys Phe Tyr Gly Val Cys Val
 595 600 605
 Glu Gly Asp Pro Leu Ile Met Val Phe Glu Tyr Met Lys His Gly Asp
 610 615 620
 Leu Asn Lys Phe Leu Arg Ala His Gly Pro Asp Ala Val Leu Met Ala
 625 630 635 640

 Glu Gly Asn Pro Pro Thr Glu Leu Thr Gln Ser Gln Met Leu His Ile
 645 650 655
 Ala Gln Gln Ile Ala Ala Gly Met Val Tyr Leu Ala Ser Gln His Phe
 660 665 670
 Val His Arg Asp Leu Ala Thr Arg Asn Cys Leu Val Gly Glu Asn Leu
 675 680 685
 Leu Val Lys Ile Gly Asp Phe Gly Met Ser Arg Asp Val Tyr Ser Thr
 690 695 700

 Asp Tyr Tyr Arg Val Gly Gly His Thr Met Leu Pro Ile Arg Trp Met

705 710 715 720
Pro Pro Glu Ser Ile Met Tyr Arg Lys Phe Thr Thr Glu Ser Asp Val
 725 730 735
Trp Ser Leu Gly Val Val Leu Trp Glu Ile Phe Thr Tyr Gly Lys Gln
 740 745 750
Pro Trp Tyr Gln Leu Ser Asn Asn Glu Val Ile Glu Cys Ile Thr Gln
 755 760 765

Gly Arg Val Leu Gln Arg Pro Arg Thr Cys Pro Gln Glu Val Tyr Glu
 770 775 780
Leu Met Leu Gly Cys Trp Gln Arg Glu Pro His Met Arg Lys Asn Ile
785 790 795 800
Lys Gly Ile His Thr Leu Leu Gln Asn Leu Ala Lys Ala Ser Pro Val
 805 810 815
Tyr Leu Asp Ile Leu Gly
 820

<210> 76

<211> 8498

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<

400> 76

cctcgaggtg cataccggac ccccatcgc atctaacaag gaatctgcgc cccagagagt	60
cccgggagcg ccgccggtcg gtgcccggcg cgcggggcca tgcagcgacg gccgccgagg	120
agctccgagc agcggtagcg cccccctgta aagcgggttcg ctatgccggg gccactgtga	180
accctgccgc ctgccggaac actcttcgct ccggaccagc tcagcctctg ataagctgga	240
ctcggcacgc ccgcaacaag caccgaggag ttaagagagc cgcaagcgca gggaaggcct	300
ccccgcacgg gtgggggaaa gcggccggtg cagcgcgggg acaggcactc gggctggcac	360
tggctgctag ggatgtcgtc ctggataagg tggcatggac ccgcatggc gcggctctgg	420
ggcttctgct ggetggttgt gggcttcttg agggccgctt tcgcctgtcc cacgtcctgc	480
aaatgcagtg cctctcgat ctggtgcagc gacccttctc ctggcatcgt ggcatttccg	540
agattggagc ctaacagtgt agatctgag aacatcacg aaattttcat cgcaaaccag	600
aaaaggttag aaatcatcaa cgaagatgat gttgaagctt atgtgggact gagaaatctg	660
acaattgtgg attctggatt aaaatttgtg gtcataaag catttctgaa aaacagcaac	720

ctgcagcaca tcaattttac ccgaaacaaa ctgacgagtt tgtctaggaa acatttccgt	780
caccttgact tgtctgaact gatcctgggtg ggcaatccat ttacatgctc ctgtgacatt	840
atgtggatca agactctcca agaggctaaa tccagtccag aactcagga tttgtactgc	900
ctgaatgaaa gcagcaagaa tattccccctg gcaaacctgc agatacccaa ttgtggtttg	960
ccatctgcaa atctggccgc acctaacctc actgtggagg aaggaaagtc tatcacatta	1020
tcctgtagtg tggcagggtga tccggttccct aatatgtatt gggatgttgg taacctggtt	1080
tccaaacata tgaatgaaac aagccacaca cagggtcctc taaggataac taacatttca	1140
tccgatgaca gtgggaagca gatctcttgt gtggcggaaa atctttagg agaagatcaa	1200
gattctgtca acctcactgt gcattttgca ccaactatca catttctcga atctccaacc	1260
tcagaccacc actggtgcat tccattcact gtgaaaggca accccaaacc agcgcttcag	1320
tggttctata acggggcaat attgaatgag tccaaatata tctgtactaa aatacatgtt	1380
accaatcaca cggagtacca cggctgcctc cagctggata atcccactca catgaacaat	1440
ggggactaca ctctaatagc caagaatgag tatgggaagg atgagaaaaca gatttctgct	1500
cacttcatgg gctggcctgg aattgacgat ggtgcaaacc caaattatcc tgatgtaatt	1560
tatgaagatt atggaactgc agcgaatgac atcggggaca ccacgaacag aagtaatgaa	1620
atcccttcca cagacgtcac tgataaaacc ggtcgggaac atctctcggt ctatgctgtg	1680
gtggtgattg cgictgtggt gggattttgc cttttggtaa tgctgtttct gcttaagttg	1740
gcaagacact ccaagtttgg catgaaaggc ccagcctccg ttatcagcaa tgatgatgac	1800
tctgccagcc cactccatca catctccaat gggagtaaca ctccatcttc ttcggaaggt	1860
ggcccagatg ctgtcattat tggaatgacc aagatccctg tcattgaaaa tccccagtac	1920
tttggtcatca ccaacagtca gctcaagcca gacacatttg ttcagcacat caagcgacat	1980
aacattgttc tgaaaaggga gctaggcgaa ggagcctttg gaaaagtgtt cctagctgaa	2040
tgctataacc tcigtctga gcaggacaag atcttgggtg cagtgaagac cctgaaggat	2100
gccagtgaca atgcacgcaa ggacttccac cgtgaggccg agtcctgac caacctccag	2160
catgagcaca tcgtcaagtt ctatggcgtc tgcgtggagg gcgacccct catcatggtc	2220
tttgagtaca tgaagcatgg ggacctcaac aagtctctca gggcacacgg ccctgatgcc	2280
gtgctgatgg ctgagggcaa cccgccacg gaactgacgc agtcgcagat gctgcatata	2340
gcccagcaga tcgccgctgg catggtctac ctggcgtccc agcacttcgt gcaccgcgat	2400
ttggccacca ggaactgcct ggtcggggag aacttgctgg tgaaaatcgg ggactttggg	2460

atgtcccgga acgtgtacag cactgactac tacagggtcg gtggccacac aatgctgccc	2520
attcgttgga tgcctccaga gagcatcatg tacaggaaat tcacgacgga aagcgacgtc	2580
tggagcctgg gggctcgtgtt gtgggagatt ttcacctatg gcaaacagcc ctggtaccag	2640
ctgtcaaaca atgaggtgat agagtgtatc actcagggcc gagtcttgca gcgaccccg	2700
acgtgcccc aggaggtgta tgagctgatg ctgggggtgct ggccagcgaga gccccacatg	2760
aggaagaaca tcaagggtcat ccataccctc cttcagaact tggccaaggc atctccggtc	2820
tacctggaca ttctaggcta gggccctttt cccagaccg atccttcca acgtactcct	2880
cagacgggct gagaggatga acatctttta actgccgtg gaggccacca agctgctctc	2940
cttactctg acagtattaa catcaaagac tccgagaagc tctcgaggga agcagtggt	3000
acttcttcat ccatagacac agtatgtact tctttttggc attatctctt tctctcttc	3060
catctccctt ggttggttctt tttctttttt ttaaatcttc ttttctttt tttttctgc	3120
ttccctgctt cagattctt accctttctt ttgaatcaat ctggcttctg cattactatt	3180
aactctgcat agacaaaggc cttacaaac gtaatttgtt atatcagcag aactccagt	3240
ttgccacca caactaaca tgccttggtt tattctgccc ttgatgtgg atgaaaaaa	3300
gggaaaaca atatttctact taaactttgt cacttctgct gtacagatat cgagagtctc	3360
tatggattca cttctattta ttattatta ttactgttct tattgtttt ggatggctta	3420
agcctgtgta taaaaagaa aacttgtgtt caatctgtga agcctttatc tatgggagat	3480
taaaaccaga gagaaagaa atttattatg aaccgcaata tgggagggaac aaagacaacc	3540
actgggatca gctgggtgca gtccctactt aggaataact cagcaactgt tagctgggaa	3600
gaatgtattc ggcaccttcc cctgaggacc tttctgagga gtaaaaagac tactggcctc	3660
tgtgccatgg atgattctt tcccatcacc agaaatgata gcgtgcagta gagagcaaag	3720
atggcttccg tgagacaca gatggcgcat agtgtgctcg gacacagttt tgtcttcgta	3780
ggttgtgatg atagcactgg tttgtttctc aagcgctatc cacagaacct ttgtcaactt	3840
cagttgaaaa gaggtggatt catgtccaga gctcatttcg gggtcaggtg ggaaagccaa	3900
gaacttgga aagataagac aagctataaa ttcggaggca agtttctttt acaatgaact	3960
tttcagatct cacttccctc cgaccctaa cttccatgcc caccgtcct tttaactgtg	4020
caagcaaat tgtgcatggt cttcgtcgat taataccttg tgtgcagaca ctactgtcc	4080
agacgtcgtt tccctgatag gtaggcaga tccataaaaa ggtatgactt atacaattag	4140
gggaagctaa tggagtttat tagctgagta tcaatgtctc tgcgttgtag ggtgggtgatg	4200

ggttttaatg aatatggacc ctgaagcctg gaaatcctca tccacgtcga acccacagga 4260
 ctgtgggaag ggcagaatca atccctaagg gaaaggaaac ctccacctga gggcatcaca 4320
 tgcactcatg ttcagtgtac acaggtcaag tcccttgctc tgggctctag ttgggagagt 4380
 ggtttcattc caagtgtact ccatgttcag tatgtgtttt ttgtttcctt cactccattc 4440
 aaaaagtcaa aatacaaaat ttggcacagc atgccaacgg gaggtgtgc ccagaccaag 4500
 cactggaagt gtgtttctag gcatagtcat tggttttgca aaaagagggc tcaaatttaa 4560
 atagaaatth acagctatth gaatggtcag atataccaag aaagaaaaat atttctgttc 4620

 ctcaagaaaa cttgtaccc tctgtgaggg gaattttgct aaacttgaca tctttataac 4680
 atgagccaga ttgaaaggga gtgattttca ttcactcttag gtcagtgtat ttcataattg 4740
 tttctgaagg tgcgatatgt ctgttttagg ttttgcttgc gcctgttaat tactggaaca 4800
 ccttattttt cattaaagcc ttgaaagcc aattctcaaa aattcaaaag tgcaaattaa 4860
 cagaacaaaa ggaaatccag tagcaactgc agtcaagcga gggagttagc aagataaacc 4920
 ttacgtccat tcaagttata tgctggccta tgagagatga gagttgggtc gtttgttctc 4980
 ttgtttgatg attttaaaa aacctcttag aatacacata ataacataat gaaagccata 5040

 tctccatgat atatatgtgc acatatatat acatacatgt gcatgtatgt atcatattaa 5100
 ggacccatgg tactcttaaa aactgtaga actctgtgac gcagtaagga aggggcagat 5160
 ttgtacaaaa acttttctag attccatcag caaaaaccaa cacaggtttg tcacgttgca 5220
 tgtctggcca gctaactctg ggggaaaagc tacaagtat ttattttatt ttaagagaat 5280
 aaagtaggta ataatttaag ggatcaaatt caaggaggaa tgtgcaattt tagagcaaag 5340
 atttgtttta ggcaaatgag actttgggag catcccatc cagttttgtc tttttttct 5400
 ctgaaagaaa aaagcaaaaa ataaaataaa attccactta taccttctga caagtccta 5460

 aaggtcttga aataaaaggt tctatgcaag tgcaaagttt tatagttatt tttattgctg 5520
 attattacta ttactatctc tgttgtctta agagtatgtg ctgatttcag agacatctca 5580
 aattgaaaga atatcagatt gcttttaag tagctgaacg agccacagaa tatctgaaat 5640
 tattcattgt tgttctcca ccacccctt tctcatggtc tgatttttag aagagtggca 5700
 tctctgttct aaaatgtaat gatcaccaaa tacggccttc catcaaattt gtgaaaacta 5760
 caacagtata acagtacaa acctaatctc ctageccaaa cctggtctga caatcatttc 5820
 catttagaag tcattgaata gttttccaaa cactttccat gtgtgttagc aaattattcc 5880

 tattttgtgt agataggac gttgagactc agagacattc agaggcacgc tagaggctc 5940
 cagcctagct tccagacca ttgggactga atccaagtac tctcactctg aacttcgtgg 6000
 ttctgtccac tagagactct aatatgcaaa caagcagttc aggaaagaaa gcatgctaac 6060

acattcatga agcagtatat gaagttagaa gaacaaaagg aaatacagga gatgacaagc 6120

aactgagata ttgtgatata taatcatgct cttagcttca gctaaattca gctaaattct 6180

tgtacactga accaatgtca taatcaggct tatitagaaa acactttgaa ctatgctata 6240

aaagattata tcagaattca tattatacat gtgttcacat cagcgctacc tgtgatgttt 6300

tcattgtattt atgtatgtgt tataaatact tgattttatac atatacaaat gcacatacgt 6360

agtgtgtttg tgtgtttatg tataaattta taggcacaca ataataagg taattataag 6420

taggatgcgg tatgaataat ttgcttaaaa tatgctaaat aaccaaact gtttaacgtc 6480

atgttgctgt tagtgcttcc atactccacg tgggtaggac tacatcacac ttttcaactc 6540

tgtgcagtac tgcattgggtg gaagacatat ttaagataat gtgcttccca aaacaactga 6600

ataaaagcca tcccactaca ttgagtgcct tctctggctc cttgcaaaga aagatacttt 6660

ttgtaatggt ccaggaaagg aacattgctt tctttttgtc tttcagcaca tttgtattat 6720

gctcaccttg tctctgtctc actgtgaccc ctttacactt gagttcagag ttcaagcatt 6780

ccaaatataa attggaatgt tggcagccca gtggcttgaa ggccaatgat gagcagtcga 6840

agacccca gcgagatgag caactcttag gaattccac atcctagagt gaatgcacca 6900

actaacagta tagaatgctg tctttttcaa agcgtcctaa cagcaggatt acctgggtcaa 6960

gtatggactt tctttgaatc tttcttttca caaattggac tgcctgtaat accaataaca 7020

ttgttgtatc taactaaata aatgactgca tatacacaca tacctcaat tctcttgctt 7080

ccccatttc tttttcatcc cctgtctcag gacttttatt ttcaatgttg acctttggtt 7140

tggccatata tcaactgttat aggaaatctc atgagaggaa tggttagtga cccaactctc 7200

caaatgtcta agttagtagt tacagctgat tttttatgat gcataattgg aatgtggagc 7260

ctctgaggtt gtatagctt gtacatgaat ttcaaatgtc attctaaaga atgaggggtg 7320

ggagggattt atagttagaa acgacagtgc aggaaggggt attttcttgt tgtcagggtc 7380

ggaatgaatc actgctgctc aagtcaaagg ttcttgaata tccttagttt ttgcatttcc 7440

cctccttttc ctttgacctt tttttattta attatgtatt tttttattta tttatatact 7500

tttgctccat tcagcacaaa cacaagcaa agcaaaaaaa aaaatatata tatatatatc 7560

tgtatatgtg ttgtaggcaa aacactgtga atttcacaac aaccaccacc aagcaactat 7620

tttgccatct taacatacat ctcaggagac gaaatgagaa aagatgggga tgtcattttt 7680

tagtctatgc gtttgaggcc aggtccatgt ttattttattt ctttagtcta tgcattaatg 7740

aaaatgatcc tgagtggagg ttagctgaac gttcaatgta ctggagcaag catcataaaa 7800

gtgctagta gccatgtgtt tgaacaggaa aaatattaca gaaaatgaaa tgtaaaggcc 7860

tatatcttgc agcttgtata tcttactatt gcttaaaaaa tgtataaagc agctggaaat 7920

gttttaata caaggtcttt gaattaaatg tggattttta atatgtaatc ccttgacaaa 7980

tgaccaaatt atggagaact attgtccct gcgttctttg atcattacct atgacttaca 8040

aatctgcctg gagatgtgga cattctgcat ttgcttctgt atctggagag atgtttgtat 8100

atatccaggc cgtatacaca cacatttcca tatctctcta cagatatatt tccccitcaa 8160

tcgtgacctg gtatttggaa ctctcctttt catttggett atcttctttt taatgtgatg 8220

tctctgtgct aatacttacc agttcttgtt ttgcaatctg ttttgaggtc cattgcttta 8280

ctaagaccca ctgcatcttg gctgatttca aagtgcacc tgaatacagt gtttaaaaaa 8340

aaaaaagttt tgtttgtaaa tcatgtgacc agcttctctc aacctgacat ggaaagtctc 8400

ttgtactaca gtgtatttaa taaaaatgat gtcttacaat aaataacata ctccaaaaga 8460

gagactaaaa atgaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaa 8498

<210> 77

<211> 2469

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(93)

<223> Signal Peptide

<220><221> misc_feature

<222> (94)..(1290)

<223> Extracellular Domain

<220><221> misc_feature

<222> (1291)..(1362)

<223> Transmembrane Domain

<220><221> misc_feature

<222> (1363)..(2466)

<223> Cytoplasmic Domain

<400> 77

atgtcgtcct ggataagggt gcatggacc gccatggcgc ggctctgggg cttctgctgg 60

ctggttgtgg gcttctggag ggccgctttc gcctgtccca cgtcctgcaa atgcagtgcc 120

tctcggtatc ggtgcagcga ccttctcct ggcatcgtgg catttccgag attggagcct 180

aacagtgtag atcctgagaa catcaccgaa attttcatcg caaaccagaa aaggtttagaa 240

atcatcaacg aagatgatgt tgaagcttat gtgggactga gaaatctgac aattgtggat 300

tctggattaa aatttgtggc tcataaagca ttcttgaaaa acagcaacct gcagcacatc	360
aattttaccg gaaacaaact gacgagtttg tctaggaac atttccgtca ccttgacttg	420
tctgaactga tcttgggtggg caatccattt acatgctcct gtgacattat gtggatcaag	480
actctccaag aggctaaatc cagtccagac actcaggatt tgtactgcct gaatgaaagc	540
agcaagaata ttccctggc aaacctgcag ataccaatt gtggtttgcc atctgcaaat	600
ctggccgcac ctaacctcac tgtggaggaa ggaaagtcta tcacattatc ctgtagtgtg	660
gcaggatgatc cggttcctaa tatgtattgg gatgttggtt acctggtttc caaacatatg	720
aatgaaacaa gccacacaca gggctcctta aggataacta acatttcac cgtgacagc	780
gggaagcaga tcctttgtgt ggcggaaaat cttgtaggag aagatcaaga ttctgtcaac	840
ctcactgtgc attttgacc aactatcaca ttctcgaat ctccaacctc agaccaccac	900
tggtgcattc cattcactgt gaaaggcaac cccaaaccag cgcttcagtg gttctataac	960
ggggcaatat tgaatgagtc caaatacatc tgtactaaaa tacatgttac caatcacacg	1020
gagtaccacg gctgcctcca gctggataat cccactcaca tgaacaatgg ggactacact	1080
ctaatagcc aagaatgagta tgggaaggat gagaaacaga ttctgtctca cttcatgggc	1140
tggcctggaa ttgacgatgg tgcaaaccca aattatcctg atgtaattta tgaagattat	1200
ggaactgcag cgaatgacat cggggacacc acgaacagaa gtaatgaaat cccttcaca	1260
gacgtcactg ataaaaccgg tcgggaacat ctctcggtct atgctgtggt ggtgattgcg	1320
tctgtggtgg gattttgcct ttgtgtaatg ctgtttctgc ttaagttggc aagacactcc	1380
aagtttggca tgaaggccc agcctccgtt atcagcaatg atgatgactc tgccagccca	1440
ctccatcaca tcaccaatgg gagtaacact ccattcttct cggaaggtgg cccagatgct	1500
gtcattattg gaatgaccaa gatccctgtc attgaaaac cccagtactt tggcatcacc	1560
aacagtcagc tcaagccaga cacatttgtt cagcacatca agcgacataa cattgttctg	1620
aaaaggggagc taggcgaagg agcctttgga aaagtgttcc tagctgaatg ctataacctc	1680
tgctctgagc aggacaagat cttggtggca gtgaagaccc tgaaggatgc cagtgacaat	1740
gcacgcaagg acttccaccg tgaggccgag ctctgacca acctccagca tgagcacatc	1800
gtcaagtctt atggcgtctg cgtggagggc gacccctca tcatggtctt tgagtacatg	1860
aagcatgggg acctcaacaa gtctctcagg gcacacggcc ctgatgccgt gctgatggct	1920
gagggcaacc cgccacgga actgacgcag tcgcagatgc tgcatatagc ccagcagatc	1980
gccgcgggca tggcttacct ggcgtcccag cacttcgtgc accgcgattt ggccaccagg	2040

aactgcctgg tcggggagaa ctgtctggtg aaaatcgggg actttgggat gtccccgggac 2100

gigtacagca ctgactacta cagggtcggg ggccacacaa tgctgcccat tcgctggatg 2160

cctccagaga gcatcatgta caggaaattc acgacggaaa ggcacgtctg gagcctgggg 2220

gtcgtgttgt gggagatatt cacctatggc aaacagccct ggtaccagct gtcaacaat 2280

gaggtgatag agtgtatcac tcagggccga gtctctgcagc gaccccgac gtgccccag 2340

gaggtgtatg agctgatgct ggggtgctgg cagcgagagc cccacatgag gaagaacatc 2400

aagggcattc atacctcct tcagaacttg gccaaaggcat ctccggtcta cctggacatt 2460

ctaggctag 2469

<210> 78

<211> 354

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 78

caggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctctggatt cagcttcagt agctttggca tgactgggt ccgccaggct 120

ccaggcaagg gactggagtg ggtgtcagtt atatcatatg atggaattaa tacatactat 180

acagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240

ctgcaaatga acggcctgag agctgaggac acggtctttt attactgtgt gcaagggtca 300

attggaaccg tttttgaata ctggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc ctca 354

<210> 79

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 79

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser Ser Phe

20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ile Asn Thr Tyr Tyr Thr Asp Ser Val

50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Gly Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95
Val Gln Gly Ser Ile Gly Thr Val Phe Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110
Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 80

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 80

ggattcagct tcagtagctt tggc

24

<210> 81

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 81

Gly Phe Ser Phe Ser Ser Phe Gly

1 5

<210> 82

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 82

atatcatatg atggaattaa taca

24

<210> 83

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 83

Ile Ser Tyr Asp Gly Ile Asn Thr

1 5

<210> 84

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 84

gtgcaagggt caattggaac cgtttttgaa tac 33

<210> 85

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 85

Val Gln Gly Ser Ile Gly Thr Val Phe Glu Tyr

1 5 10

<210> 86

<211> 321

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 86

gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60

atcacttgcc gggcgagtc gggcattagc aattatttag cctggtatca gcagaaacca 120

gggaaagtgc ctaaactcct gatctatgct gcatccactt tacaatcagg ggtcccatct 180

cggttcggtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240

gaagatgttg caacttatta ctgtcaaaag tataccagtg cccattcac tticggccct 300

gggaccaaag tggatatcaa a

321

<210> 87

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 87

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Tyr

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Gly Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Lys Tyr Thr Ser Ala Pro Phe

85 90 95

Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys

100 105

<210> 88

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 88

cagggcatta gcaattat

18

<210> 89

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 89

Gln Gly Ile Ser Asn Tyr

1 5

<210> 90

<211> 9

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 90

gctgcatcc

9

<210> 91

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400>

> 91

Ala Ala Ser

1

<210> 92

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 92

caaaagtata ccagtgcgcc attcact

27

<210> 93

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 93

Gln Lys Tyr Thr Ser Ala Pro Phe Thr

1 5

<210> 94

<211> 366

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 94

gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtccagc ctggggggtc cctaaaactc 60

tcctgtacag cctctgggtt caccttcagt ggctctgtta ttactgggt ccgccaggct 120

tccgggaaag ggctggagtg gattggccgt attagaaaca aggctaacag ttacgcgaca 180

gcatatgggtg cgtcggtgac aggcagggtt accatctcca gagatgattc aaagaacacg 240

gcgtatctgc aaatgaacag cctgaaaacc gaggacacgg ccgtttatta ctgtactttc 300

ccgggtgtag tgggacgagg aggttttgac tactggggcc agggcaccct ggtcacgcgc 360

tcctca 366

<210> 95

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 95

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Ser

20 25 30

Val Ile His Trp Val Arg Gln Ala Ser Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Arg Ile Arg Asn Lys Ala Asn Ser Tyr Ala Thr Ala Tyr Gly Ala

50 55 60

Ser Val Thr Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr

65 70 75 80

Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr

85 90 95

Tyr Cys Thr Phe Pro Gly Val Val Gly Arg Gly Gly Phe Asp Tyr Trp

	100	105	110
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser			
	115	120	
<210> 96			
<211> 24			
<212>			
DNA			
<213> Artificial Sequence			
<220><223> Synthetic			
<400> 96			
gggttcacct tcagtggctc tggt			24
<210> 97			
<211> 8			
<212> PRT			
<213> Artificial Sequence			
<220><223> Synthetic			
<400> 97			
Gly Phe Thr Phe Ser Gly Ser Val			
1 5			
<210> 98			
<211> 30			
<212> DNA			
<213> Artificial Sequence			
<220><223> Synthetic			
<400> 98			
attagaaaca aggctaacag ttacgcgaca			30
<210> 99			
<211>			
> 10			
<212> PRT			
<213> Artificial Sequence			
<220><223> Synthetic			
<400> 99			
Ile Arg Asn Lys Ala Asn Ser Tyr Ala Thr			
1 5 10			

<210> 100

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 100

actttcccggtgtgtagtggtggtacgaggaggttttgactac 39

<210> 101

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 101

Thr Phe Pro Gly Val Val Gly Arg Gly Gly Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 102

<211> 339

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 102

gacatcgtgatgacccagtc tccagactcc ctggctgtgt ctctgggcga gggggccacc 60

atcaactgca tgtccagcca gagtggtttta ttcagctcca acaataagaa ctacttagct 120

tggtagcaac agaaaccagg acagctcct aagttgctct tttactgggc atctaccgg 180

gaatccgggg tccctgaccg attcgggtggc agcgggtctg ggacagattt ctctctcacc 240

atcaacagcc tgcagactga agatgtggca gtttattact gtctccaata ttatagtatt 300

ccgtggacgt tcggccaagg gaccaaggtg gaaatcaaa 339

<210> 103

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 103

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Glu Gly Ala Thr Ile Asn Cys Met Ser Ser Gln Ser Val Leu Phe Ser
 20 25 30
 Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45
 Pro Pro Lys Leu Leu Phe Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val

 50 55 60
 Pro Asp Arg Phe Gly Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Thr
 65 70 75 80
 Ile Asn Ser Leu Gln Thr Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Leu Gln
 85 90 95
 Tyr Tyr Ser Ile Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
 100 105 110
 Lys

<210> 104

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 104

cagagtgttt tattcagctc caacaataag aactac

36

<210> 105

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 105

Gln Ser Val Leu Phe Ser Ser Asn Asn Lys Asn Tyr

1 5 10

<210> 106

<211> 9

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 106

tgggcatct

9

<210> 107

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 107

Trp Ala Ser

1

<210> 108

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 108

ctccaatatt atagtattcc gtggacg

27

<210> 109

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 109

Leu Gln Tyr Tyr Ser Ile Pro Trp Thr

1

5

<210> 110

<211> 381

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 110

gaggtgcagc tggtaggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggagggtc cctgacactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt caatttcctg gattatgaaa tgatctgggt ccgccagact 120
 ccaggaagg ggctggagtg gatttcatac attagtaata gtggttatac catatactac 180
 gcagactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaggaa ctcaatatat 240
 ctgcaagtga acagcctgag agccgaggac acggctgttt attactgttc gagacgtact 300
 actatgattc ggggcattag ggcgtactac tattacggtc tggacgtctg gggccaaggg 360

accacgtca ccgtctcctc a 381

<210> 111

<211> 127

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 111

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Thr Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Phe Arg Asp Tyr

20 25 30

Glu Met Ile Trp Val Arg Gln Thr Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Ser Tyr Ile Ser Asn Ser Gly Tyr Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Arg Asn Ser Ile Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Val Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ser Arg Arg Thr Thr Met Ile Arg Gly Ile Arg Ala Tyr Tyr Tyr Tyr

100 105 110

Gly Leu Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120 125

<210> 112

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 112

ggattcaatt tccgtgatta tgaa

24

<210> 113

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 113

Gly Phe Asn Phe Arg Asp Tyr Glu

1 5

<210> 114

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 114

attagtaata gtggttatac cata

24

<210> 115

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 115

Ile Ser Asn Ser Gly Tyr Thr Ile

1 5

<210> 116

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 116

tcgagacgta ctactatgat tcggggcatt agggcgtact actattacgg tctggacgtc 60

<210> 117

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 117

Ser Arg Arg Thr Thr Met Ile Arg Gly Ile Arg Ala Tyr Tyr Tyr Tyr

1 5 10 15

Gly Leu Asp Val

20

<210> 118

<211> 324

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 118

gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60

atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctatttaa attggtatca gcagaaacca 120

gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccgtca 180

aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagcag tctgcaacct 240

gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagta cccctccgat caccttcggc 300

caagggacac gactggagat taaa 324

<210> 119

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 119

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Pro
 85 90 95
 Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 120

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 120

cagagcatta gcagctat

18

<210> 121

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 121

Gln Ser Ile Ser Ser Tyr

1 5

<210> 122

<211> 9

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 122

gctgcatcc

9

<210> 123

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 123

Ala Ala Ser

1

<210> 124

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 124

caacagagtt acagtacccc tccgatcacc

30

<210> 125

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 125

Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Pro Ile Thr

1

5

10