

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6730277号
(P6730277)

(45) 発行日 令和2年7月29日(2020.7.29)

(24) 登録日 令和2年7月6日(2020.7.6)

(51) Int.Cl.

F 1

A O 1 K	67/027	(2006.01)
C 1 2 N	15/19	(2006.01)
C 1 2 N	15/09	(2006.01)
C O 7 K	16/28	(2006.01)
C 1 2 N	5/0735	(2010.01)

A O 1 K	67/027	
C 1 2 N	15/19	Z N A
C 1 2 N	15/09	Z
C O 7 K	16/28	
C 1 2 N	5/0735	

請求項の数 16 (全 85 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2017-526681 (P2017-526681)
 (86) (22) 出願日 平成27年11月25日 (2015.11.25)
 (65) 公表番号 特表2018-500012 (P2018-500012A)
 (43) 公表日 平成30年1月11日 (2018.1.11)
 (86) 國際出願番号 PCT/US2015/062614
 (87) 國際公開番号 WO2016/089692
 (87) 國際公開日 平成28年6月9日 (2016.6.9)
 審査請求日 平成30年10月31日 (2018.10.31)
 (31) 優先権主張番号 62/087,992
 (32) 優先日 平成26年12月5日 (2014.12.5)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 米国(US)

(73) 特許権者 597160510
 リジェネロン・ファーマシューティカルズ
 ・インコーポレイテッド
 R E G E N E R O N P H A R M A C E U
 T I C A L S, I N C.
 アメリカ合衆国 10591-6707 ニュ
 ヨーク州タリータウン、オールド・ソ
 ミル・リバー・ロード 777番
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (74) 代理人 100113413
 弁理士 森下 夏樹

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】ヒト化されたCLUSTER OF DIFFERENTIATION 47遺伝子を有する非ヒト動物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

ヒト化CD47遺伝子を備えるゲノムを有する齧歯類であって、
 前記ヒト化CD47遺伝子は、ヒトCD47遺伝子のエクソン2~7および齧歯類CD47遺伝子のエクソン7の下流のエクソンを備え；

前記ヒト化CD47遺伝子は、ヒトCD47ポリペプチドの一部および齧歯類CD47ポリペプチドの細胞内部分を備えるヒト化CD47ポリペプチドをコードし；

前記ヒトCD47ポリペプチドの前記一部は、前記ヒトCD47ポリペプチドの細胞外ドメインおよび膜貫通ドメインを備え、そして、前記ヒトCD47遺伝子のエクソン2~7によってコードされ；

前記齧歯類CD47ポリペプチドの前記細胞内部分が、前記齧歯類CD47遺伝子のエクソン7の下流のエクソンによってコードされており；

前記ヒト化CD47遺伝子は、内因性齧歯類CD47遺伝子座において内因性齧歯類CD47プロモーターに動作可能のように連結されており；そして

前記齧歯類がマウスまたはラットである、齧歯類。

【請求項2】

前記ヒト化CD47遺伝子が、前記齧歯類CD47遺伝子のエクソン1をさらに備える、請求項1に記載の齧歯類。

【請求項3】

前記ヒト化CD47遺伝子が、内因性齧歯類CD47遺伝子座における内因性齧歯類CD47遺伝子

のエクソン2~7を備えるゲノム断片の、前記ヒトCD47遺伝子のエクソン2~7を備えるゲノム断片による置き換えによって形成される、請求項1または請求項2に記載の齧歯類。

【請求項4】

前記齧歯類が、ヒトSIRP ポリペプチドの細胞外部部分と、内因性齧歯類SIRP ポリペプチドの細胞内部分とを備えるSIRP ポリペプチドをコードするSIRP 遺伝子をさらに備え、前記SIRP ポリペプチドはCD47と相互作用する、請求項1~3のいずれか一項に記載の齧歯類。

【請求項5】

前記SIRP 遺伝子が内因性齧歯類SIRP 遺伝子のエクソン1、5、6、7および8、ならびにヒトSIRP 遺伝子のエクソン2~4を備えている、請求項4に記載の齧歯類。

10

【請求項6】

ヒト化CD47遺伝子を備えるゲノムを有する単離された齧歯類細胞または組織であって、前記ヒト化CD47遺伝子は、ヒトCD47遺伝子のエクソン2~7および齧歯類CD47遺伝子のエクソン7の下流のエクソンを備え；

前記ヒト化CD47遺伝子は、ヒトCD47ポリペプチドの一部および齧歯類CD47ポリペプチドの細胞内部分を備えるヒト化CD47ポリペプチドをコードし；

前記ヒトCD47ポリペプチドの前記一部は、前記ヒトCD47ポリペプチドの細胞外ドメインおよび膜貫通ドメインを備え、そして、前記ヒトCD47遺伝子のエクソン2~7によってコードされ；

前記齧歯類CD47ポリペプチドの前記細胞内部分が、前記齧歯類CD47遺伝子のエクソン7の下流のエクソンによってコードされており；

20

前記ヒト化CD47遺伝子は、内因性齧歯類CD47遺伝子座において内因性齧歯類CD47プロモーターに動作可能なように連結されており；そして

前記単離された齧歯類細胞または組織は、単離されたマウス細胞もしくは組織、または単離されたラット細胞もしくは組織である、単離された齧歯類細胞または組織。

【請求項7】

前記ヒト化CD47遺伝子が、前記齧歯類CD47遺伝子のエクソン1をさらに備える、請求項6に記載の単離された齧歯類細胞または組織。

【請求項8】

前記単離された齧歯類細胞が、単離されたマウス胚性幹細胞または単離されたラット胚性幹細胞である、請求項6または7に記載の単離された齧歯類細胞または組織。

30

【請求項9】

請求項8に記載の単離された胚性幹細胞を含む齧歯類胚。

【請求項10】

齧歯類モデルの作製における、請求項8に記載の胚性幹細胞の使用。

【請求項11】

齧歯類を提供する方法であって、前記方法は、

(i) 齧歯類ゲノムを、改変されたゲノムがヒト化CD47遺伝子を備えるように改変することであって、

前記ヒト化CD47遺伝子は、ヒトCD47遺伝子のエクソン2~7および齧歯類CD47遺伝子のエクソン7の下流のエクソンを備え；

40

前記ヒト化CD47遺伝子は、ヒトCD47ポリペプチドの一部および齧歯類CD47ポリペプチドの細胞内部分を備えるヒト化CD47ポリペプチドをコードし；

前記ヒトCD47ポリペプチドの前記一部は、前記ヒトCD47ポリペプチドの細胞外ドメインおよび膜貫通ドメインを備え、そして、ヒトCD47遺伝子のエクソン2~7によってコードされ；

前記齧歯類CD47ポリペプチドの前記細胞内部分が、前記齧歯類CD47遺伝子のエクソン7の下流のエクソンによってコードされており；そして

前記ヒト化CD47遺伝子は、内因性齧歯類CD47遺伝子座において内因性齧歯類CD47プロモーターに動作可能なように連結されており、

50

前記齧歯類がマウスまたはラットであり

前記改変することが、

(a)齧歯類胚性幹細胞の内因性齧歯類CD47遺伝子座にゲノム断片を挿入することであ
って、前記ゲノム断片はヒトCD47遺伝子のエクソン2~7を備えており、それによりヒト化
CD47遺伝子を前記内因性齧歯類CD47遺伝子座において形成すること、および

(b)(a)のヒト化CD47遺伝子を備える齧歯類胚性幹細胞を得ること
を含む、こと；ならびに

(ii)(i)(b)の齧歯類胚性幹細胞を使用して齧歯類を生成すること
を含む、方法。

【請求項12】

10

前記ヒト化CD47遺伝子が、前記齧歯類CD47遺伝子のエクソン1をさらに備える、請求項1
1に記載の方法。

【請求項13】

ヒト細胞の生着を評価する方法であって、前記方法は、請求項1~5のいずれか一項に記
載の齧歯類におけるヒト細胞の生着を評価することを含む、方法。

【請求項14】

前記ヒト細胞が造血幹細胞である、請求項13に記載の方法。

【請求項15】

ヒト細胞を標的とする薬剤の治療有効性を評価する方法であって、前記方法は、
一つ以上のヒト細胞が移植されている請求項1~5のいずれか一項に記載の齧歯類に薬剤
候補を投与すること、および

20

前記齧歯類中のヒト細胞をモニターし、前記薬剤候補の治療有効性を決定すること
を含む、方法。

【請求項16】

ヒトCD47タンパク質の調節物質候補が赤血球の凝集を誘導するかを評価する方法であ
って、前記方法は、

請求項1~5のいずれか一項に記載の齧歯類から単離された赤血球を、前記調節物質候補
の存在下でインキュベートすること；および

前記調節物質候補が前記赤血球の凝集を誘導するかどうかを評価すること
を含む、方法。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2014年12月5日に出願され、その全体が参照により本明細書に援用される米
国仮特許出願第62/087,992号明細書の利益を主張するものである。

配列表の参照による組み込み

【0002】

2015年11月23日に作製され、EFS-Webを介して米国特許商標庁に提出された32584_10108
W001_SequenceListing.txtという名称の96.0KBのASCIIテキストファイルの形態をとる配
列表が、参照により本明細書に組み込まれる。

40

【背景技術】

【0003】

癌治療は、4つの主要なカテゴリーに分類することができる：化学療法／放射線療法、
ホルモン療法、標的化療法、そして免疫療法である。医学研究と開発の焦点は標的化療法
に向けられ、顕著な改善がなされてきたが、癌は世界中の患者および医療産業にとって今
なお大きな課題である。この大きな課題は、部分的には、自然免疫系および獲得免疫系の
モニタリング機構をうまく逃れるという癌細胞の能力によるものであり、これは一部には
貪食クリアランスが阻害された結果である。現在のところ、癌細胞の貪食クリアランスを
活性化するよう設計された新たな癌治療に有力な療法を最適に決定するためのインビオ系

50

は存在せず、どのようにして癌細胞がマクロファージと貪食細胞に阻害シグナルを送るかの分子的側面を決定するためのインビボ系も存在しない。かかる系により、インビボで貪食およびマクロファージの機能を分析するための手段が提供され、そして免疫系に貪食促進シグナルを誘導する抗腫瘍環境をもたらすことを標的とした新たな癌療法が特定される。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0004】

本発明は、新たな癌治療を特定および開発するための改善システムを許容する非ヒト動物を設計することが望ましいという認識を包含するものである。本発明はまた、ヒト造血幹細胞の改善された生着を許容する非ヒト動物を設計することが望ましいという認識を包含するものである。さらに、本発明はまた、たとえばCD47の阻害に関連した全身毒性を克服する癌療法の特定および開発における使用のための、ならびに腫瘍細胞貪食のCD47介在性の阻害を克服する癌療法の特定および開発における使用のための、ヒト化CD47遺伝子を有する非ヒト動物、および／またはヒトCD47ポリペプチドもしくはヒト化CD47ポリペプチドを発現する、含有する、または產生する非ヒト動物が望ましいという認識を包含するものであり、およびより広範なヒトの細胞型のホメオスタシスの上昇をもたらす、ヒト造血系幹細胞の生着に対し、より効率的なインビボ系を提供するものである。

10

【0005】

一部の実施形態では、本発明は、二つの異なる種（例えば、ヒトおよび非ヒト）からの遺伝物質を含むCD47遺伝子を備えるゲノムを有する非ヒト動物を提供する。一部の実施形態では、本明細書に記述された非ヒト動物のCD47遺伝子は、ヒトおよび非ヒト部分を含むCD47ポリペプチドをコードしており、この場合において、ヒトおよび非ヒト部分は互いに連結して機能的CD47ポリペプチドを形成する。

20

【0006】

一部の実施形態では、本発明の非ヒト動物は、内因性部分およびヒト部分を備えるCD47遺伝子を備え、この場合において、内因性部分およびヒト部分は内因性プロモーターと動作可能なように連結されている。

【0007】

一部の実施形態では、内因性部分は内因性CD47遺伝子のエクソン1、およびエクソン7の下流のエクソンを備える。一部の特定実施形態では、内因性CD47のエクソン1、およびエクソン7の下流のエクソンは、表3に示されるマウスCD47遺伝子の対応するエクソン1、およびエクソン7の下流のエクソンに対し、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも98%同一である。一部の実施形態では、内因性CD47のエクソン1、およびエクソン7の下流のエクソンは、表3に示されるマウスCD47遺伝子の対応するエクソン1、およびエクソン7の下流のエクソンと同一である。

30

【0008】

一部の実施形態では、ヒト部分は、ヒトCD47ポリペプチドのアミノ酸16～292をコードする。一部の実施形態では、ヒト部分は、ヒトCD47ポリペプチドのアミノ酸19～292をコードする。一部の実施形態では、ヒト部分は、ヒトCD47ポリペプチドのアミノ酸19～141をコードする。一部の実施形態では、ヒト部分は、ヒトCD47ポリペプチドのアミノ酸19～127をコードする。一部の実施形態では、ヒト部分は、ヒトCD47遺伝子のエクソン2～7を備える。

40

【0009】

一部の実施形態では、ヒトCD47遺伝子のエクソン2～7は、表3に示されるヒトCD47遺伝子の対応するエクソン2～7に対し、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも98%同一である。一部の実施形態では、ヒトCD47遺伝子のエクソン2～7は、表3に示されるヒトCD47遺伝子の対応するエクソン2～7と同

50

一である。

【0010】

一部の実施形態では、本発明の非ヒト動物は、ヒトCD47ポリペプチドの細胞外部分および内因性CD47ポリペプチドの細胞内部分を備えるCD47ポリペプチドを発現している。一部の実施形態では、CD47ポリペプチドは、ヒトCD47ポリペプチドの膜貫通部分を備えている。他の実施形態では、CD47ポリペプチドは、非ヒトCD47ポリペプチドの膜貫通部分を備えている。一部の実施形態では、CD47ポリペプチドは、非ヒトシグナルペプチドとともに、非ヒト動物の細胞内で翻訳される。一部の特定実施形態では、非ヒトシグナルペプチドは、齧歯類（例えば、マウスまたはラット）のシグナルペプチドである。

【0011】

一部の実施形態では、本発明のCD47ポリペプチドは、内因性非ヒトCD47遺伝子から発現される。

【0012】

一部の実施形態では、内因性CD47ポリペプチドの細胞内部分は、表3に示されるマウスCD47ポリペプチドの細胞質内尾部に対し、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも98%同一であるアミノ酸配列を有する細胞質内尾部を備えている。一部の実施形態では、内因性CD47ポリペプチドの細胞内部分は、表3に示されるマウスCD47ポリペプチドの細胞質内尾部と同一であるアミノ酸配列を有する細胞質内尾部を備えている。

【0013】

一部の実施形態では、ヒトCD47ポリペプチドの細胞外部分は、ヒトCD47ポリペプチドの19～141残基に相当するアミノ酸を備えている。一部の実施形態では、ヒトCD47ポリペプチドの細胞外部分は、ヒトCD47ポリペプチドの19～127残基に相当するアミノ酸を備えている。一部の実施形態では、ヒトCD47ポリペプチドの細胞外部分は、表3に示されるヒトCD47ポリペプチドの細胞外部分の対応するアミノ酸配列に対し、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも98%同一であるアミノ酸配列を備えている。一部の実施形態では、ヒトCD47ポリペプチドの細胞外部分は、表3に示されるヒトCD47ポリペプチドの細胞外部分の対応するアミノ酸配列と同一であるアミノ酸配列を備えている。

【0014】

一部の実施形態では、本発明は、本明細書に記述された非ヒト動物のCD47遺伝子によりコードされるCD47ポリペプチドを提供する。一部の特定実施形態では、コードされるCD47ポリペプチドは、配列番号17、配列番号18、配列番号19、または配列番号20に対し、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも98%同一であるアミノ酸配列を備えている。一部の特定実施形態では、コードされるCD47ポリペプチドは、配列番号17、配列番号18、配列番号19、または配列番号20と同一であるアミノ酸配列を備えている。

【0015】

一部の実施形態では、本発明は、ヒトCD47遺伝子の一つ以上のエクソンと動作可能なように連結された非ヒトCD47遺伝子の一つ以上のエクソンを備えたヒト化CD47遺伝子を提供する。一部の特定実施形態では、本発明のヒト化CD47遺伝子は、CD47ポリペプチドの細胞内部分をコードする非ヒトのエクソン、およびヒトCD47ポリペプチドの細胞外部分をコードするヒトのエクソンを備えている。一部の実施形態では、ヒト化CD47遺伝子はまた、ヒトCD47ポリペプチドの膜貫通部分をコードするヒトのエクソンを備えている。一部の特定実施形態では、本発明のヒト化CD47遺伝子は、全部または一部のシグナルペプチド、およびCD47ポリペプチドの細胞内部分をコードする非ヒトエクソン、ならびにCD47ポリペプチドの細胞外部分および任意選択で膜貫通部分をコードするヒトのエクソンを備えている。

10

20

30

40

50

【0016】

一部の実施形態では、本発明は、本明細書に記述された非ヒト動物からの単離細胞または組織を提供する。一部の実施形態では、本発明は、本明細書に記述されたCD47遺伝子を備える単離細胞または組織を提供する。一部の実施形態では、細胞は、樹状細胞、リンパ球（例えば、B細胞またはT細胞）、マクロファージ、および単球から選択される。一部の実施形態では、組織は、脂肪、膀胱、脳、乳房、骨髄、目、心臓、腸、腎臓、肝臓、肺、リンパ節、筋肉、臍臓、血漿、血清、皮膚、脾臓、胃、胸腺、精巣、卵子、およびこれらの組み合わせから選択される。

【0017】

一部の実施形態では、本発明は、そのゲノムが本明細書に記述されるCD47遺伝子を備える非ヒト胚性幹細胞を提供する。一部の実施形態では、非ヒト胚性幹細胞はマウスの胚性幹細胞であり、129系、C57BL/6系、またはBALB/c系由来である。一部の実施形態では、非ヒト胚性幹細胞はマウスの胚性幹細胞であり、129系およびC57BL/6系の混合物由来である。

10

【0018】

一部の実施形態では、本発明は、非ヒト動物を作るための本明細書に記述された非ヒト胚性幹細胞の利用法を提供する。一部の特定実施形態では、非ヒト胚性幹細胞はマウスの胚性幹細胞であり、本明細書に記述されるCD47遺伝子を備えるマウスを作製するために使用される。一部の特定実施形態では、非ヒト胚性幹細胞はラットの胚性幹細胞であり、本明細書に記述されるCD47遺伝子を備えるラットを作製するために使用される。

20

【0019】

一部の実施形態では、本発明は、本明細書に記述されるCD47遺伝子を備える非ヒト胚性幹細胞を備える、それから作製される、それから得られる、またはそれから生じる非ヒト胚を提供する。一部の特定実施形態では、非ヒト胚は、齧歯類の胚である。一部の実施形態では、齧歯類の胚は、マウスの胚である。一部の実施形態では、齧歯類の胚は、ラットの胚である。

【0020】

一部の実施形態では、本発明は、内因性CD47遺伝子からCD47ポリペプチドを発現させる非ヒト動物を作製する方法を提供するものであり、この場合において、当該CD47ポリペプチドは、ヒト配列を備えており、当該方法は、非ヒト胚性幹細胞中でゲノム断片を内因性CD47遺伝子に挿入することであって、当該ゲノム断片は全部または一部のヒトCD47ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を備えていること、全部または一部のヒトCD47ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を備えた内因性CD47遺伝子を備えた非ヒト胚性幹細胞を得ること、および全部または一部のヒトCD47ポリペプチドをコードする当該ヌクレオチド配列を備えた非ヒト胚性幹細胞を用いて非ヒト動物を作製すること、を含む。

30

【0021】

一部の実施形態では、ヒト配列はヒトCD47ポリペプチドの19～141（または19～292）残基に相当するアミノ酸を備える。一部の実施形態では、ヒト配列はヒトCD47ポリペプチドの19～127残基に相当するアミノ酸を備える。

【0022】

40

一部の実施形態では、ヌクレオチド配列はヒトCD47遺伝子のエクソン2～7を備える。一部の実施形態では、ヌクレオチド配列は一つ以上の選択マーカーを備える。一部の実施形態では、ヌクレオチド配列は一つ以上の部位特異的組み換え部位を備える。

【0023】

一部の実施形態では、当該方法はさらに、非ヒト胚性幹細胞の内因性SIRP 遺伝子にゲノム断片を挿入する工程であって、当該ゲノム断片は、全部または一部のヒトSIRP ポリペプチドをコードする（たとえばヒトSIRP ポリペプチドの細胞外部分をコードする）ヌクレオチド配列を備えている工程を含む。一部の特定実施形態では、全部または一部のヒトSIRP ポリペプチドをコードする（たとえばヒトSIRP ポリペプチドの細胞外部分をコードする）ヌクレオチド配列を備えたゲノム断片は、内因性CD47遺伝子への挿入の前に、

50

非ヒト胚性幹細胞の内因性SIRP 遺伝子へと挿入される。

【0024】

一部の実施形態では、当該方法はさらに、ヒトCD47ポリペプチドの全部または一部をコードするスクレオチド配列を含む内因性CD47遺伝子を備える非ヒト動物と、第二の非ヒト動物を交配させることであって、当該第二の非ヒト動物は、ヒトSIRP ポリペプチドの細胞外部分（たとえばヒトSIRP ポリペプチドの28～362残基に相当するアミノ酸）と、内因性SIRP ポリペプチドの細胞内部分を備えたSIRP ポリペプチドをコードするSIRP 遺伝子を備えたゲノムを有していることを含む。

【0025】

一部の実施形態では、本発明は、そのゲノムが、内因性CD47ポリペプチドの細胞内部分に連結されているヒトCD47ポリペプチドの細胞外部分をコードするCD47遺伝子を備えている非ヒト動物を提供する方法を提供するものであり、当該方法は、非ヒト動物のゲノムが、内因性CD47ポリペプチドの細胞内部分に連結されたヒトCD47ポリペプチドの細胞外部分をコードするCD47遺伝子を備えるよう、非ヒト動物ゲノムを改変し、それにより当該非ヒト動物を提供することを含む。一部の実施形態では、CD47遺伝子は、内因性非ヒトCD47ポリペプチドの細胞内部分に連結されているヒトCD47ポリペプチドの細胞外部分および膜貫通部分を備えるCD47ポリペプチドをコードしている。他の実施形態では、CD47遺伝子は、内因性非ヒトCD47ポリペプチドの膜貫通部分および細胞内部分に連結されたヒトCD47ポリペプチドの細胞外部分を備えるCD47ポリペプチドをコードしている。

【0026】

一部の実施形態では、非ヒト動物のゲノム改変は、非ヒト胚性幹細胞にて行われる。一部の特定実施形態では、非ヒト胚性幹細胞は齧歯類胚性幹細胞であり、一部の実施形態ではマウス胚性幹細胞、一部の実施形態ではラット胚性幹細胞である。

【0027】

一部の実施形態では、当該方法はさらに、非ヒト動物のゲノムが、内因性SIRP ポリペプチドの細胞内部分に連結されたヒトSIRP ポリペプチドの細胞外部分（たとえばヒトSIRP ポリペプチドの28～362残基に相当するアミノ酸）をコードするSIRP 遺伝子を備えるよう非ヒト動物のゲノムを改変することを含む。一部の特定実施形態では、非ヒト動物のゲノムが、内因性SIRP ポリペプチドの細胞内部分に連結されたヒトSIRP ポリペプチドの細胞外部分（たとえばヒトSIRP ポリペプチドの28～362残基に相当するアミノ酸）をコードするSIRP 遺伝子を備えるよう非ヒト動物のゲノムを改変することは、非ヒト動物のゲノムが、内因性CD47ポリペプチドの細胞内部分に連結されているヒトCD47ポリペプチドの細胞外部分および任意選択で膜貫通部分をコードするCD47遺伝子を備えるよう非ヒト動物のゲノムを改変する前に行われる。

【0028】

一部の実施形態では、当該方法はさらに、そのゲノムが、内因性CD47ポリペプチドの細胞内部分に連結されているヒトCD47ポリペプチドの細胞外部分をコードするCD47遺伝子を備えている非ヒト動物と、第二の非ヒト動物を交配させることであって、当該第二の非ヒト動物は、ヒトSIRP ポリペプチドの細胞外部分（たとえばヒトSIRP ポリペプチドの28～362残基に相当するアミノ酸）、および内因性SIRP ポリペプチドの細胞内部分を備えたSIRP ポリペプチドをコードするSIRP 遺伝子を備えたゲノムを有していること、を含む。

【0029】

一部の実施形態では、本発明は、本明細書に記述された方法によって得られた非ヒト動物を提供する。

【0030】

一部の実施形態では、本発明は、非ヒト動物にヒト細胞を生着させる方法を提供するものであり、当該方法は、そのゲノムが内因性CD47ポリペプチドの細胞内部分に連結されているヒトCD47ポリペプチドの細胞外部分をコードするCD47遺伝子を備えている非ヒト動物を提供する工程と、当該非ヒト動物に一つ以上にヒト細胞を移植すること、を含む。一部

10

20

30

40

50

の特定実施形態では、当該方法はさらに、当該非ヒト動物中の一つ以上ヒト細胞の生着を分析する工程を含む。一部の特定実施形態では、分析工程は、一つ以上の野生型非ヒト動物、またはそのゲノムが内因性CD47ポリペプチドの細胞外部分に連結されているヒトCD47ポリペプチドの細胞外部分をコードするCD47遺伝子を備えていない一つ以上の非ヒト動物における生着に対して、一つ以上のヒト細胞の生着を比較することを含む。

【0031】

一部の実施形態では、ヒト細胞は造血幹細胞である。一部の実施形態では、ヒト細胞は、静脈内に移植される。一部の実施形態では、ヒト細胞は、腹腔内に移植される。一部の実施形態では、ヒト細胞は、皮下に移植される。

【0032】

一部の実施形態では、本発明は、ヒト細胞を標的とする薬剤の治療効果を評価する方法を提供するものであり、当該方法は、そのゲノムが、内因性CD47ポリペプチドの細胞内部分に連結されているヒトCD47ポリペプチドの細胞外部分をコードするCD47遺伝子を備えている非ヒト動物を提供すること、当該非ヒト動物に一つ以上のヒト細胞を移植すること、当該非ヒト動物に薬剤候補を投与すること、および当該薬剤候補の治療効果を決定するために当該非ヒト動物中のヒト細胞をモニターすること、を含む。

【0033】

一部の実施形態では、ヒト細胞は、癌細胞であり、薬剤候補は、抗癌剤候補である。一部の特定実施形態では、薬剤候補は、抗体である。

【0034】

一部の実施形態では、非ヒト動物はさらにヒト免疫細胞を備えている。一部の特定実施形態では、薬剤候補は、ヒトCD47、および移植されたヒト癌細胞上の抗原に結合する二特異性抗体である。

【0035】

一部の実施形態では、本発明は、そのゲノムが、内因性CD47ポリペプチドの細胞内部分に連結されているヒトCD47ポリペプチドの細胞外部分をコードするCD47遺伝子を含む一つ以上の細胞を提供すること、当該一つ以上の細胞を標識基質とともにインキュベートすること、および当該一つ以上の細胞による当該標識基質の貪食を測定すること、を含む方法を提供する。一部の実施形態では、基質は、蛍光標識されている。一部の実施形態では、基質は、抗体で標識されている。一部の実施形態では、基質は、一つ以上の赤血球である。一部の実施形態では、基質は、一つ以上の細菌細胞である。一部の実施形態では、基質は、一つ以上の腫瘍細胞である。

【0036】

一部の実施形態では、本発明は、そのゲノムが、内因性CD47ポリペプチドの細胞内部分に連結されているヒトCD47ポリペプチドの細胞外部分をコードするCD47遺伝子を含んでいる非ヒト動物を提供すること、当該非ヒト動物を抗原に曝露すること、および当該非ヒト動物の一つ以上の細胞による抗原の貪食を測定すること、を含む方法を提供する。一部の実施形態では、当該曝露工程は、蛍光標識された抗原に、当該非ヒト動物を曝露することを含む。一部の実施形態では、当該曝露工程は、抗原を備える一つ以上の細胞に、当該非ヒト動物を曝露することを含む。一部の実施形態では、当該曝露工程は、抗原を備える一つ以上のヒト細胞、または抗原を備える一つ以上の細菌細胞に対し、当該非ヒト動物を曝露することを含む。一部の実施形態では、当該曝露工程は、抗原で形質転換され、当該抗原が一つ以上の形質転換細胞の表面上に発現される、一つ以上の細胞に対し、当該非ヒト動物を曝露することを含む。一部の実施形態では、当該曝露工程は、抗原を備える一つ以上の腫瘍細胞に対し、当該非ヒト動物を曝露することを含む。

【0037】

一部の実施形態では、本発明は薬剤またはワクチンの特定または検証の方法を提供し、当該方法は、そのゲノムが内因性CD47ポリペプチドの細胞内部分に連結されているヒトCD47ポリペプチドの細胞外部分をコードするCD47遺伝子を含む非ヒト動物に対し、薬剤またはワクチンを送達する工程、および当該薬剤もしくはワクチンに対する免疫反応、当該薬

10

20

30

40

50

剤もしくはワクチンの安全性プロファイル、または疾患もしくは状態に対する効果のうちの一つ以上をモニターする工程、を含む。一部の実施形態では、安全性プロファイルのモニタリングには、非ヒト動物が、薬剤またはワクチン送達の結果として副作用または有害反応を呈するかどうかを決定することを含む。一部の実施形態では、副作用または有害反応は、罹患率、死亡率、体重の変化、一つ以上の酵素レベルの変化（例えば、肝臓）、一つ以上の臓器の重量の変化、機能の喪失（例えば、感覚、運動、臓器など）、一つ以上の疾患に対する感受性の増加、非ヒト動物のゲノムの変化、食物摂取および一つ以上の疾患の合併症の増加または減少から選択される。

【0038】

一部の特定実施形態では、本発明は、薬品としての使用など医学で使用するための薬剤またはワクチンの開発での本明細書に記述された非ヒト動物の利用法を提供する。 10

【0039】

一部の実施形態では、本発明は、癌または新生物を治療するための医薬の製造における、本明細書に記述された非ヒト動物の利用法を提供する。

【0040】

一部の実施形態では、本発明は、ヒト細胞を標的とする治療剤の有効性を評価するための、本明細書に記述される非ヒト動物の使用を提供する。さまざまな実施形態で、本発明の非ヒト動物にヒト細胞が移植され、当該ヒト細胞を標的とする薬剤候補が、当該動物に投与される。一部の実施形態では、薬剤の投与後に、当該非ヒト動物中のヒト細胞をモニターすることにより、当該薬剤の有効性が決定される。 20

【0041】

一部の実施形態では、本発明は、治療または診断のための薬剤（例えば、抗体）の開発および/または特定における使用のための、本明細書に記述される非ヒト動物または細胞を提供する。

【0042】

一部の実施形態では、本発明は、癌または新生物の治療、予防、または改善のための薬剤（例えば、抗体）の開発および/または特定における使用のための、本明細書に記述される非ヒト動物または細胞を提供する。

【0043】

一部の実施形態では、本発明は、ヒトCD47を標的とする薬剤の薬物動態を評価する方法を提供するものであり、当該方法は、本明細書に記述される非ヒト動物に薬剤を投与する工程、およびヒトCD47を標的とする薬剤の一つ以上の薬物動態特性を決定するためのアッセイを行う工程、を含む。 30

【0044】

一部の実施形態では、本発明は、ヒトCD47を標的とする薬剤の標的毒性（on-target toxicity）を評価する方法を提供するものであり、当該方法は、本明細書に記述される非ヒト動物に薬剤を投与する工程、および薬剤の標的毒性に関連した一つ以上のパラメーターに関するアッセイを行う工程、を含む。

【0045】

一部の実施形態では、本発明は、ヒトCD47を標的とする薬剤の標的外毒性（off-target toxicity）を評価する方法を提供するものであり、当該方法は、本明細書に記述される非ヒト動物に薬剤を投与する工程、および薬剤の標的外毒性に関連した一つ以上のパラメーターに関するアッセイを行う工程、を含む。 40

【0046】

多くの実施形態では、本明細書に記述される非ヒト動物は、そのゲノムが、内因性CD47ポリペプチドの細胞内部分に連結されているヒトCD47ポリペプチドの細胞外部分をコードするCD47遺伝子を含む齧歯類であり、一部の実施形態では、齧歯類はマウスであり、一部の実施形態では、齧歯類はラットである。

【0047】

一部の実施形態では、ヒトCD47を標的とする薬剤はCD47拮抗薬である。一部の特定実施 50

形態では、CD47拮抗薬は、抗CD47抗体である。一部の実施形態では、ヒトCD47を標的とする薬剤はCD47作動薬である。

【0048】

さまざまな実施形態で、本発明のCD47遺伝子は本明細書に記述されるCD47遺伝子を含む。さまざまな実施形態で、本発明のCD47ポリペプチドは本明細書に記述されるCD47ポリペプチドを含む。

【0049】

さまざまな実施形態で、本発明の非ヒト動物は、全長内因性非ヒトCD47ポリペプチドを検出可能な程度には発現しない。さまざまな実施形態で、本発明の非ヒト動物は、内因性CD47ポリペプチドの細胞外部分を検出可能な程度には発現しない。さまざまな実施形態で、本発明の非ヒト動物は、内因性CD47ポリペプチドおよび内因性SIRP ポリペプチドの両方の細胞外部分を検出可能な程度には発現しない。

10

【0050】

さまざまな実施形態で、ヒトCD47ポリペプチドの細胞外部分は、本明細書に記述されるヒトCD47ポリペプチドの19～141残基に相当するアミノ酸を備えている。

【0051】

さまざまな実施形態で、ヒトCD47ポリペプチドのN末端イムノグロブリンVドメインは、本明細書に記述されるヒトCD47ポリペプチドの19～127残基に相当するアミノ酸を備えている。

20

【0052】

さまざまな実施形態で、本発明の非ヒト動物、細胞、組織、胚性幹細胞、および／または胚は、ヒトSIRP ポリペプチドの細胞外部分（たとえば、ヒトSIRP ポリペプチドの28～362残基に相当するアミノ酸）および内因性SIRP ポリペプチドの細胞内部分を備えるSIRP ポリペプチドをコードするSIRP 遺伝子をさらに備えるゲノムを有している。

【0053】

さまざまな実施形態で、本発明の非ヒト動物は齧歯類であり、一部の実施形態ではマウスであり、一部の実施形態ではラットである。

【0054】

本明細書で使用される場合、「約」および「およそ」という用語は同意義として使用される。約／およその有無に関わらず、本明細書で使用される任意の数字は、当業者によって理解される任意の正常変動を網羅することが意図される。

30

【0055】

本発明のその他の特徴、目的および利益は、以下の詳細な説明において明らかである。しかし、当該詳細な説明は、本発明の実施形態を示しているが、それらは例示の目的で提示されているものであり、限定を目的として提示されていないことを理解されたい。本発明の範囲内のさまざまな変更および修正は、詳細説明から当業者には明らかとなるであろう。

例えば、本発明の実施形態の一部の例が以下に示される。

(項目1)

内因性齧歯類CD47ヌクレオチド配列およびヒトCD47ヌクレオチド配列を備えるCD47遺伝子を備える齧歯類であって、前記CD47遺伝子が内因性齧歯類CD47プロモーターと動作可能なように連結されている、前記齧歯類。

40

(項目2)

前記内因性齧歯類CD47ヌクレオチド配列が、内因性齧歯類CD47遺伝子のエクソン1、およびエクソン7の下流のエクソンを備えている、項目1に記載の齧歯類。

(項目3)

前記内因性齧歯類CD47遺伝子のエクソン1、およびエクソン7の下流のエクソンが、表3に示されるマウスCD47遺伝子の対応するエクソン1、およびエクソン7の下流のエクソンに対し、少なくとも90%、または少なくとも95%同一である、項目2に記載の齧歯類。

(項目4)

50

前記ヒトCDヌクレオチド配列がヒトCD47ポリペプチドのアミノ酸19～127、19～141、または16～292をコードする、項目1～3のいずれか一項に記載の齧歯類。

(項目5)

前記ヒトCDヌクレオチド配列がヒトCD47遺伝子のエクソン2～7を備える、項目1～3のいずれか一項に記載の齧歯類。

(項目12)

前記ヒトCD47遺伝子のエクソン2～7が、表3に示されるヒトCD47遺伝子の対応するエクソン2～7に対し、同一であるか、または少なくとも90%もしくは95%同一である、項目5に記載の齧歯類。

(項目13)

ヒトCD47ポリペプチドの細胞外部分および任意選択で膜貫通部分、ならびに内因性齧歯類CD47ポリペプチドの細胞内部分を備えるCD47ポリペプチドを発現する齧歯類。

10

(項目14)

前記CD47ポリペプチドが齧歯類シグナルペプチドとともに前記齧歯類の細胞において翻訳される、項目13に記載の齧歯類。

(項目21)

前記内因性齧歯類CD47ポリペプチドの細胞内部分が、表3に示されるマウスCD47ポリペプチドの細胞質内尾部と同一であるか、または少なくとも90%もしくは少なくとも95%同一であるアミノ酸を有している細胞質内尾部を備える、項目13に記載の齧歯類。

(項目22)

前記ヒトCD47ポリペプチドの細胞外部分が、ヒトCD47ポリペプチドの19～141残基に相当するアミノ酸を備える、項目13～14および21のいずれか一項に記載の齧歯類。

20

(項目29)

前記ヒトCD47ポリペプチドの細胞外部分が、表3に示されるヒトCD47ポリペプチドの細胞外部分の対応するアミノ酸配列と同一であるか、または少なくとも90%もしくは少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を備える、項目13～14、および21のいずれか一項に記載の齧歯類。

(項目30)

前記齧歯類が、ヒトSIRP ポリペプチドの細胞外部分と、内因性齧歯類SIRP ポリペプチドの細胞内部分を備えるSIRP ポリペプチドをコードするSIRP 遺伝子をさらに備えており、この場合において、前記SIRP 遺伝子が任意選択で内因性齧歯類SIRP 遺伝子のエクソン1、5、6、7および8、ならびにヒトSIRP 遺伝子のエクソン2～4を備えている、先行項目のいずれか一項に記載の齧歯類。

30

(項目31)

前記齧歯類がラットまたはマウスである、先行項目のいずれか一項に記載の齧歯類。

(項目32)

先行項目のいずれか一項に記載の齧歯類の遺伝子によりコードされるCD47ポリペプチド。

(項目33)

前記コードされるポリペプチドが、配列番号17、配列番号18、配列番号19、または配列番号20と同一であるか、または少なくとも90%もしくは少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を備えている、項目32に記載のCD47ポリペプチド。

40

(項目34)

そのゲノムが、内因性齧歯類CD47ポリペプチドの細胞内部分に連結されたヒトCD47ポリペプチドの細胞外部分、および任意選択で膜貫通部分をコードするCD47遺伝子を備える、単離された齧歯類細胞または組織。

(項目35)

前記CD47遺伝子が、齧歯類のCD47プロモーターに動作可能に連結されている、項目34に記載の単離された細胞または組織。

(項目36)

50

前記CD47遺伝子が、ヒトCD47遺伝子のエクソン2～7を備え、ならびに任意選択で内因性齧歯類CD47遺伝子のエクソン1、およびエクソン7の下流のエクソンを備えている、項目34もしくは35に記載の単離された細胞または組織。

(項目37)

前記細胞または組織が、ヒトSIRP ポリペプチドの細胞外部分と、内因性齧歯類SIRP ポリペプチドの細胞内部分を備えたSIRP ポリペプチドをコードするSIRP 遺伝子をさらに備えている、項目34～36のいずれか一項に記載の単離された齧歯類細胞または組織。

(項目38)

前記齧歯類細胞または組織が、マウス細胞もしくはマウス組織、またはラット細胞もしくはラット組織である、項目34～37のいずれか一項に記載の単離された齧歯類細胞または組織。

10

(項目39)

そのゲノムが、内因性齧歯類CD47ポリペプチドの細胞内部分に連結されたヒトCD47ポリペプチドの細胞外部分、および任意選択で膜貫通部分をコードするCD47遺伝子を備えている、齧歯類胚性幹細胞。

(項目40)

前記CD47遺伝子が、内因性齧歯類CD47プロモーターに動作可能に連結された、ヒトCD47遺伝子のエクソン2～7、ならびに任意選択で内因性齧歯類CD47遺伝子のエクソン1、およびエクソン7の下流のエクソンを備えている、項目39に記載の齧歯類胚性幹細胞。

20

(項目43)

前記齧歯類胚性幹細胞のゲノムが、ヒトSIRP ポリペプチドの細胞外部分、および内因性齧歯類SIRP ポリペプチドの細胞内部分を備えるSIRP ポリペプチドをコードするSIRP 遺伝子をさらに備えており、この場合において、前記SIRP 遺伝子は任意選択で内因性齧歯類SIRP 遺伝子のエクソン1、5、6、7および8、ならびにヒトSIRP 遺伝子のエクソン2～4を備えている、項目39～40のいずれか一項に記載の齧歯類胚性幹細胞。

(項目44)

前記齧歯類胚性幹細胞がマウスまたはラットの胚性幹細胞である、項目39、40、または43のいずれか一項に記載の齧歯類胚性幹細胞。

(項目45)

項目39～40および43～44のいずれか一項に記載の胚性幹細胞から生成される齧歯類胚。

30

(項目46)

前記胚は、マウスまたはラットの胚である、項目45に記載の齧歯類胚。

(項目47)

前記改变が、

(a) 齧歯類胚性幹細胞の内因性齧歯類CD47遺伝子座にゲノム断片を挿入することであって、前記ゲノム断片は前記ヒトCD47ポリペプチドの前記細胞外部分および任意選択で前記膜貫通部分をコードするヌクレオチド配列を備えており、それにより前記内因性齧歯類CD47遺伝子座で前記ヒト化CD47遺伝子を形成すること、

(b)(a)のヒト化CD47遺伝子を備える齧歯類胚性幹細胞を得ること、および

(c)(b)の齧歯類胚性幹細胞を使用して齧歯類を作製すること、

40

を含む、項目109に記載の方法。

(項目48)

前記ヒト化CD47ポリペプチドが、ヒトCD47ポリペプチドの19～127、19～141、19～292または16～292残基に相当するアミノ酸を備えている、項目47に記載の方法。

(項目49)

前記ヌクレオチド配列がヒトCD47遺伝子のエクソン2～7を備えている、項目47または48のいずれか一項に記載の方法。

(項目51)

前記ヒト化CD47遺伝子が、齧歯類CD47遺伝子のエクソン1、およびエクソン7の下流のエクソンを備えている、項目47～49および109のいずれか一項に記載の方法。

50

(項目 5 2)

前記方法が、(a)の齧歯類胚性幹細胞の内因性SIRP 遺伝子へゲノム断片を挿入する工程をさらに含み、前記ゲノム断片は、ヒトSIRP ポリペプチドの全部または一部をコードするヌクレオチド配列を備えており、この場合において、任意選択で前記ゲノム断片がヒトSIRP 遺伝子のエクソン2~4を備えている、項目47~49、51および109のいずれか一項に記載の方法。

(項目 5 3)

ヒトSIRP ポリペプチドの全部または一部をコードするヌクレオチド配列を備える前記ゲノム断片が、内因性CD47遺伝子への挿入の前に、(a)の齧歯類胚性幹細胞の内因性SIRP 遺伝子へと挿入される、項目52に記載の方法。

10

(項目 5 4)

前記方法が、第二の齧歯類と(c)の齧歯類を交配させることをさらに含み、前記第二の齧歯類はヒトSIRP ポリペプチドの細胞外部分と内因性齧歯類SIRP ポリペプチドの細胞内部分を備えるSIRP ポリペプチドをコードするSIRP 遺伝子を備えるゲノムを有しており、この場合において、任意選択で前記SIRP 遺伝子が内因性SIRP 遺伝子のエクソン1、5、6、7および8、ならびにヒトSIRP 遺伝子のエクソン2~4を備えている、項目47~49、51および109のいずれか一項に記載の方法。

(項目 5 5)

前記齧歯類がマウスまたはラットである、項目47~49、51~54および109のいずれか一項に記載の方法。

20

(項目 5 6)

項目47~49、51~55および109のいずれか一項に記載の方法から取得可能な齧歯類。

(項目 5 7)

前記齧歯類がマウスまたはラットである、項目56に記載の齧歯類。

(項目 6 9)

ヒト細胞を齧歯類に生着させる方法であって、

(a) 項目1~5、12~14、21~22、および29~31のいずれか一項に記載の齧歯類を提供する工程、および

(b) 1つ以上のヒト細胞を前記齧歯類に移植する工程、
を含む、前記方法。

30

(項目 7 0)

(c) 前記齧歯類における前記1つ以上のヒト細胞の生着を分析する工程、をさらに含む項目69に記載の方法。

(項目 7 2)

前記ヒト細胞が造血幹細胞である、項目69~70のいずれか一項に記載の方法。

(項目 7 3)

前記ヒト細胞が、静脈内、腹腔内、または皮下に移植される、項目69~70、および72のいずれか一項に記載の方法。

(項目 7 6)

ヒト細胞を標的とする薬剤の治療有効性を評価する方法であって、前記方法が、項目1~5、12~14、21~22、および29~31のいずれか一項に記載の齧歯類を提供すること

40

、
前記齧歯類に1つ以上のヒト細胞を移植すること、

前記齧歯類に薬剤候補を投与すること、および

前記齧歯類中のヒト細胞をモニターし、前記薬剤候補の治療有効性を決定すること、
を含む、前記方法。

(項目 7 7)

前記ヒト細胞が、癌細胞であり、前記薬剤候補が、抗癌剤候補である、項目76に記載の方法。

(項目 7 8)

50

前記薬剤候補が、抗体である、項目77に記載の方法。

(項目79)

前記齧歯類が、ヒト免疫細胞をさらに備える、項目78に記載の方法。

(項目80)

前記薬剤候補が、ヒトCD47、および移植されたヒト癌細胞上の抗原に結合する二特異性抗体である、項目79に記載の方法。

(項目81)

(a) そのゲノムが、内因性齧歯類CD47ポリペプチドの細胞内部分に連結されたヒトCD47ポリペプチドの細胞外部分をコードするCD47遺伝子を含み、この場合において前記CD47遺伝子は内因性齧歯類CD47プロモーターに動作可能に連結されている、1つ以上の齧歯類細胞を提供する工程、

(b) 工程(a)の前記1つ以上の齧歯類の細胞と、標識基質をインキュベートする工程、および

(c) 工程(b)の前記1つ以上の齧歯類の細胞による、前記標識基質の貪食を測定する工程、

を含む方法。

(項目83)

前記CD47遺伝子が、ヒトCD47遺伝子のエクソン2~7を備え、ならびに内因性齧歯類CD47遺伝子のエクソン1、およびエクソン7の下流のエクソンを備えている、項目81に記載の方法。

(項目85)

前記基質が、蛍光標識されているか、または抗体で標識されており、および任意選択で前記基質が1つ以上の赤血球、1つ以上の細菌細胞、1つ以上の腫瘍細胞、抗原、または細胞表面上に抗原を発現する1つ以上の細胞である、項目81または83のいずれか一項に記載の方法。

(項目90)

前記工程(a)の1つ以上の齧歯類細胞のゲノムが、ヒトSIRP ポリペプチドの細胞外部、および内因性齧歯類SIRP ポリペプチドの細胞内部分を備えるSIRP ポリペプチドをコードするSIRP 遺伝子をさらに備え、任意選択でこの場合において、前記SIRP 遺伝子がヒトSIRP 遺伝子のエクソン2~4、ならびに内因性齧歯類SIRP 遺伝子のエクソン1およびエクソン5~8を備えている、項目81、83および85のいずれか一項に記載の方法。

(項目92)

前記工程(a)の1つ以上の細胞が、マウスまたはラットの細胞である、項目81、83、85および90のいずれか一項に記載の方法。

(項目99)

ヒトCD47を標的とする薬剤の薬物動態を評価する方法であって、前記方法が、項目1~5、12~14、21~22、および29~31のいずれか一項に記載の齧歯類に前記薬剤を投与する工程、および

ヒトCD47を標的とする前記薬剤の1つ以上の薬物動態特性、薬剤の標的毒性に関連した1つ以上のパラメーター、または薬剤の標的外毒性に関連した1つ以上のパラメーターを決定するためのアッセイを行う工程、

を含む、前記方法。

(項目102)

前記ヒトCD47を標的とする薬剤が、CD47拮抗薬またはCD47作動薬である、項目99に記載の方法。

(項目103)

前記CD47拮抗薬が、抗CD47抗体である、項目102に記載の方法。

(項目105)

前記薬剤が、抗CD47抗体であり、前記アッセイが、前記齧歯類における前記抗体の薬物動態的クリアランスを決定する、項目99に記載の方法。

10

20

30

40

50

(項目106)

(a) 項目1~5、12~14、21~22、および29~31のいずれか一項に記載の齧歯類を提供すること、

(b) 前記齧歯類から赤血球を単離すること、

(c) ヒトCD47タンパク質の調節物質候補の存在下で、前記単離された赤血球をインキュベートすること、および

(d) 前記調節物質候補が前記赤血球の凝集を誘導するかどうかを評価すること、
を含む方法。

(項目107)

前記調節物質候補が抗体である、項目106に記載の方法。

10

(項目108)

前記評価が、前記調節物質候補が前記赤血球に凝集を誘導する濃度を決定することを含む、項目106または107のいずれか一項に記載の方法。

(項目109)

齧歯類を提供する方法であって、前記方法が、内因性CD47ポリペプチドの細胞内部分に連結されたヒトCD47ポリペプチドの細胞外部分、および任意選択で膜貫通部分を備えるヒト化CD47ポリペプチドをコードするヒト化CD47遺伝子を備えるよう、齧歯類のゲノムを改変することを含む、前記方法。

【図面の簡単な説明】

【0056】

20

特許または出願の書類は、色付きで描かれた少なくとも一つの図面を含有する。色付きの図面（複数含む）を伴う本特許または特許出願公開の写しは、要求により、および必要な料金を支払うことにより当局から提供される。

【0057】

以下の図から構成される、本明細書に含まれる図面は、例示のみを目的としており、限定を目的とはしていない。

【0058】

【図1】図1は、非ヒト（例えば、マウス）およびヒトのClouster of Differentiation 47 (CD47) 遺伝子のゲノム構造の、正確な縮尺ではない図を示す。エクソンは、各エクソンの下に番号を付与されている

30

【0059】

【図2】図2は、非ヒトのClouster of Differentiation47 (CD47) 遺伝子のヒト化のための例示的な方法に関する、正確な縮尺ではない図を示す。

【0060】

【図3】図3は、マウスおよびヒトのClouster of Differentiation47 (CD47) 遺伝子のゲノム構造の、正確な縮尺ではない図を示す。実施例1に記述されるアッセイにおいて用いられたプローブの位置が示されている。

【0061】

【図4】図4は、抗CD47抗体により検出されたヒト化CD47マウス由来赤血球中のCD47発現に関する例示的なヒストグラムを示す。Ab A、Ab B、Ab C、Ab DおよびAb E：抗CD47抗体、hIgG4s：エフェクター機能が低下した改変Fc領域を有する、無関係な特異性のヒトIgG4、hIgG4：無関係な特異性のヒトIgG4抗体。

40

【0062】

【図5】図5は、野生型マウス（n=2）およびヒト化CD47マウス（n=2）のマウス赤血球の抗CD47抗体による例示的な血球凝集反応を示す。WT：野生型、HuCD47：ヒト化CD47、Ab A、Ab B、Ab C、Ab DおよびAb E：抗CD47抗体、hIgG4s：エフェクター機能が低下した改変Fc領域を有する、無関係な特異性のヒトIgG4、hIgG4：無関係な特異性のヒトIgG4抗体。

【0063】

【図6】図6は、継時の（x軸、日）な抗体濃度（y軸、g/mL）として表されている、ヒ

50

ト化CD47マウスにおける抗CD47抗体の代表的な薬物動態プロファイルを示す。Ab F、Ab G、Ab H、およびAb I：抗CD47抗体、hIgG4s：エフェクター機能が低下した改変Fc領域を有する、無関係な特異性のヒトIgG4抗体。

【0064】

【図7】図7は、継時的(x 軸、日)な抗体濃度(y 軸、mcg/mL)として表されている、ヒト化CD47/SIRP マウス(CD47 ^{hu/hu}SIRP ^{hu/hu})における抗CD47抗体の代表的な薬物動態プロファイルを示す。Ab J、Ab F、Ab GおよびAb I：抗CD47抗体、hIgG4s：エフェクター機能が低下した改変Fc領域を有する、無関係な特異性のヒトIgG4。

【0065】

【図8】図8は、継時的(x 軸、日)な抗体濃度(y 軸、mcg/mL)として表されている、ヒト化CD47/SIRP マウス(CD47 ^{hu/hu}SIRP ^{hu/hu})における、抗CD47抗体の代表的な薬物動態プロフェイルを示す。Ab J、Ab F、Ab Fs：抗CD47抗体、Ab F_{mono}：一価型Ab F、hIgG4s：エフェクター機能が低下した改変Fc領域を有するAb F、Ab F_{mono}：無関係な特異性のヒトIgG4抗体。

【0066】

【図9】図9は、継時的(x 軸、日)な抗体濃度(y 軸、mcg/mL)として表されている、野生型マウスにおける、抗CD47抗体の代表的な薬物動態プロフェイルを示す。マウス抗ヒト抗体反応(MAHA：mouse anti-human antibody response)を示すマウスは除外した。Ab J、Ab F、Ab IおよびAb G：抗CD47抗体、hIgG4s：エフェクター機能が低下した改変Fc領域を有する、無関係な特異性のヒトIgG4抗体(星：MAHAを理由として、hIgG4s処置群から、15日後のすべての点が除外された)、Ab J F(ab')₂：Ab JのF(ab')₂断片。

【発明を実施するための形態】

【0067】

用語の定義

本発明は本明細書に記述された特定の方法および実験条件に限定されないが、それはこのような方法および条件は変化する場合があるからである。本発明の範囲は請求項によって定義されるので、本明細書に使用される用語は、特定の実施形態のみを記述する目的で使用されており、意図しないことも理解される。

【0068】

別段の定めがない限り、本明細書に使用されるすべての用語および語句は、そうでないことが明確に示されている、または用語または語句が使用されている文脈から明らかに明白な場合を除き、その用語および語句が当技術分野で獲得された意味を含む。本明細書で説明したものと類似または同等な任意の方法および材料も、本発明の実施または試験に使用できるが、特定の方法および材料をこれから説明する。本明細書で言及されたすべての出版物は参照により本明細書に組み込まれる。

【0069】

本明細書で一つ以上の対象の値に適用される場合、「およそ」という用語は指定された参照値と類似の値を指す。特定の実施形態では、「およそ」または「約」という用語は、別段定めがない限り、または文脈からそうでないことが明らかな場合(このような数字が可能な値の100%を超える場合を除く)を除いて、指定された参照値のいずれかの方向に25%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%またはそれ未満以内の範囲の値を指す。

【0070】

「生物学的に活性」という用語は、本明細書において用いられる場合、生物系、インビトロまたはインビボ(例えば、生体内)で活性を有する任意の剤の特徴を指す。例えば、生物内に存在する時、その生物内で生物学的効果を持つ薬剤は生物学的に活性であるとみなされる。特定の実施形態では、タンパク質またはポリペプチドが生物学的に活性な場合、タンパク質またはポリペプチドの少なくとも一つの生物学的活性を共有するそのタンパク質またはポリペプチドの一部は、「生物学的に活性」な部分と一般的に呼ばれる。

10

20

30

40

50

【0071】

「同等」という用語は、本明細書において用いられる場合、お互いに同一ではなくてもよいが、それらの間の比較を許容できるほど十分に類似しており、従って観察された差異または類似性に基づいて合理的に結論を出し得る、二つ以上の剤、実体、状況、状態の集まりなどを指す。当業者であれば、文脈内において、同等とみなされるために二つ以上のこのような薬剤、実体、状況、状況のセットなどに対して、ある所定の状況でどの程度の同一性が必要かを理解するであろう。

【0072】

保存的アミノ酸置換を記述するために本明細書において用いられる場合、「保存的」という用語は、類似の化学特性（例えば、電荷または疎水性）を備える側鎖R基を有する別のアミノ酸残基によるアミノ酸残基の置換を指す。一般的に、保存的アミノ酸置換は、対象のタンパク質の機能特性、例えば、リガンドに結合する受容体の能力などを実質的に変化させない。類似の化学特性を備える側鎖を持つアミノ酸群の例には次が含まれる：グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、およびイソロイシンなどの脂肪族側鎖、セリンおよびスレオニンなどの脂肪族-ヒドロキシル側鎖、アスパラギンおよびグルタミンなどのアミド含有側鎖、フェニルアラニン、チロシン、およびトリプトファンなどの芳香族側鎖、リジン、アルギニン、およびヒスチジンなどの塩基性側鎖、アスパラギン酸およびグルタミン酸などの酸性側鎖、ならびにシステインおよびメチオニンなどの硫黄含有側鎖。保存的アミノ酸置換基には、例えば、バリン/ロイシン/イソロイシン、フェニルアラニン/チロシン、リジン/アルギニン、アラニン/バリン、グルタミン酸/アスパラギン酸、およびアスパラギン/グルタミンが含まれる。一部の実施形態では、保存的アミノ酸置換は、例えばアラニンスキャニング変異誘導などで使用される、アラニンを含むタンパク質の任意の未変性残基の置換である可能性がある。一部の実施形態では、参照により本明細書に援用されるGonnet et al. (1992) *Exhaustive Matching of the Entire Protein Sequence Database*, *Science* 256:1443-45に開示されるPAM250対数尤度マトリクスにおいて正の値を有する保存的置換が行われる。一部の実施形態では、置換は中等度に保存的な置換であり、ここで置換はPAM250対数尤度マトリクスで負でない値を持つ。

【0073】

本明細書において用いられる場合、「対照」という用語は、結果が比較される基準である「対照」という当技術分野の意味を指す。一般的に、対照は、このような変数についての結論を出すために、変数を分離することによって実験の完全性を増加させるために使用される。一部の実施形態では、対照は、コンパレーターを提供するために、試験反応またはアッセイと同時に実施される反応またはアッセイである。本明細書で使用される場合、「対照」とは、「対照動物」を指す場合がある。「対照動物」は本明細書に記述された改変、本明細書に記述されたものとは異なる改変を持つか、または未改変（すなわち、野生型動物）である場合がある。一つの実験では、「試験」（すなわち、試験されている変数）が適用される。第二の実験では、「対照」、試験されている変数は適用されない。一部の実施形態では、対照は歴史的対照（すなわち、以前に実施された試験またはアッセイの、または以前に知られた量または結果）である。一部の実施形態では、対照は印刷されたかまたはそれ以外の方法で保存された記録であるか、またはそれを含む。対照は、陽性対照または陰性対照である場合がある。

【0074】

本明細書において用いられる場合、「破壊」という用語は、（例えば、遺伝子または遺伝子座などの内因性相同配列など）DNA分子との相同組み換え事象の結果を指す。一部の実施形態では、破壊は、DNA配列の挿入、欠失、置換、交換、ミスセンス変異、もしくはフレームシフト、またはこれらの任意の組み合わせを達成または示す場合がある。挿入は、遺伝子全体または遺伝子の断片（例えば、エクソン）の挿入を含む場合があり、これは内因性配列以外の起源のもの（例えば、異種配列）であってもよい。一部の実施形態では、破壊は遺伝子または遺伝子産物の（例えば、遺伝子によってコードされたタンパク質の）発現および/または活性を増加する場合がある。一部の実施形態では、破壊は遺伝子ま

10

20

30

40

50

たは遺伝子産物の発現および／または活性を減少する場合がある。一部の実施形態では、破壊は遺伝子またはコードされた遺伝子産物（例えば、コードされたタンパク質）の配列を変える場合がある。一部の実施形態では、破壊は遺伝子またはコードされた遺伝子産物（例えば、コードされたタンパク質）を切断または断片化する場合がある。一部の実施形態では、破壊は遺伝子またはコードされた遺伝子産物を延長する場合があり、一部の実施形態では、破壊は融合タンパク質の組立てを達成する場合がある。一部の実施形態では、破壊は遺伝子または遺伝子産物のレベルに影響するが活性には影響しない場合がある。一部の実施形態では、破壊は遺伝子または遺伝子産物の活性に影響するがレベルには影響しない場合がある。一部の実施形態では、破壊は遺伝子または遺伝子産物のレベルに対して顕著な効果を持たない場合がある。一部の実施形態では、破壊は遺伝子または遺伝子産物の活性に対して顕著な効果を持たない場合がある。一部の実施形態では、破壊は遺伝子または遺伝子産物のレベルまたは活性のいずれに対しても顕著な効果を持たない場合がある。
。

【0075】

「決定する」、「測定する」、「査定する」、「評価する」、「検査する」および「分析する」という用語は本明細書において、任意の形態の測定を指すために互換的に使用され、要素が存在するかどうかを決定することを含む。これらの用語は、定量的および／または定性的決定の両方を含む。アッセイは相対的または絶対的である場合がある。「の存在をアッセイする」ことは、存在する何かの量を決定するおよび／またはそれが存在するか不在かを決定することである可能性がある。
20

【0076】

本明細書において用いられる場合、「内因性遺伝子座」または「内因性遺伝子」という文言は、本明細書に記述される破壊、欠失、置換、変化、または改変の導入前に、親または基準生物において存在する遺伝子座を指す。一部の実施形態では、内因性遺伝子座は天然で見られる配列を持つ。一部の実施形態では、内因性遺伝子座は野生型遺伝子座である。一部の実施形態では、指標生物は野生型生物である。一部の実施形態では、指標生物は遺伝子操作された生物である。一部の実施形態では、指標生物は実験室で繁殖された生物（野生型または遺伝子操作された）である。
20

【0077】

「内因性プロモーター」という文言は、例えば、野生型の生物において、内因性遺伝子と自然状態で関連するプロモーターを指す。
30

【0078】

「異種」という用語は、本明細書において用いられる場合、異なる起源からの主体または実体を含む。たとえば、特定の細胞もしくは生物に存在するポリペプチド、遺伝子、または遺伝子産物に関連して使用される場合、当該用語は、当該関連ポリペプチド、遺伝子または遺伝子産物が、1)ヒトの手により操作されていること、2)ヒトの手を介して細胞または生物（またはその前駆体）に導入されていること、および／または3)当該関連細胞もしくは生物（たとえば関連細胞型または生物型）中に自然状態では産生されない、または存在しないこと、を明らかにする。
40

【0079】

「宿主細胞」という用語は、本明細書において用いられる場合、その中に異種（例えば、外来性）核酸またはタンパク質が導入された細胞を指す。当業者が本開示を読めば、このような用語が特定の主題細胞を指すだけでなく、このような細胞の子孫を指すためにも使用されることを理解するであろう。特定の改変は突然変異または環境の影響のいずれかにより後続世代にも起こる場合があり、このような子孫は、実際は、親細胞と同一でない場合があるが、それでも本明細書において用いられる場合、それらは「宿主細胞」という用語の範囲内に含まれる。一部の実施形態では、宿主細胞は原核細胞または真核細胞であるかそれを含む。一般的に、宿主細胞は、細胞が指定される種に関わらず、異種核酸またはタンパク質の受け入れおよび／または生産に適した任意の細胞である。例示的細胞には、原核生物および真核生物（単細胞または多細胞）の細胞、細菌細胞（例えば、大腸菌、
50

バチルス属、ストレプトマイセス属などの株)、マイコバクテリア細胞、真菌細胞、酵母細胞(例えば、出芽酵母、分裂酵母、ピヒアメタノリカなど)、植物細胞、昆虫細胞(例えば、SF-9、SF-21、バキュロウイルス感染昆虫細胞、イラクサギンウワバなど)、非ヒト動物細胞、ヒト細胞、または例えば、ハイブリドーマもしくはクアドローマなどの細胞融合を含む。一部の実施形態では、細胞はヒト、サル、類人猿、ハムスター、ラット、またはマウス細胞である。一部の実施形態では、細胞は原核であり以下の細胞から選択される:CHO(例えば、CHO K1、DXB-11 CHO、Veggie-CHO)、COS(例えば、COS-7)、網膜細胞、Vero、CV1、腎臓(例えば、HEK293、293 EBNA、MSR 293、MDCK、HaK、BHK)、HeLa、HepG2、WI38、MRC 5、Colo205、HB 8065、HL-60、(例えば、BHK21)、Jurkat、Daudi、A431(表皮)、CV-1、U937、3T3、L細胞、C127細胞、SP2/0、NS-0、MMT 060562 10、セルトリ細胞、BRL 3A細胞、HT1080細胞、骨髄腫細胞、腫瘍細胞、および前述細胞から派生する細胞株。一部の実施形態では、細胞は一つ以上のウィルス遺伝子、例えば、ウイルス遺伝子を発現する網膜細胞(例えば、PER.C6(商標)細胞)を備える。一部の実施形態では、宿主細胞は単離細胞であるかそれを含む。一部の実施形態では、宿主細胞は組織の一部である。一部の実施形態では、宿主細胞は生物の一部である。

【0080】

「ヒト化」という用語は、本明細書において、その構造(すなわち、ヌクレオチドまたはアミノ酸の配列)が、非ヒト動物に自然に存在する特定の遺伝子またはタンパク質の構造と実質的にまたは全く同一に対応する部分を含み、また、関連する特定の非ヒト遺伝子またはタンパク質において存在するものとは異なり、その代わりに対応するヒト遺伝子またはタンパク質において存在する同等の構造とより近接に対応する部分も含む核酸またはタンパク質を指す。一部の実施形態では、「ヒト化」遺伝子は、実質的にヒトポリペプチドのもののようなアミノ酸配列を持つポリペプチドをコードする遺伝子(例えば、ヒトタンパク質またはその一部、例えば、その特性的部分)である。一例を挙げると、膜受容体の場合、「ヒト化」遺伝子は、ヒトの細胞外部分としてのアミノ酸配列と、非ヒト(例えば、マウス)のポリペプチドとしての残りの配列を有する細胞外部分を有するポリペプチドをコードしてもよい。一部の実施形態では、ヒト化遺伝子は、ヒト遺伝子のDNA配列の少なくとも一部分を備える。一部の実施形態では、ヒト化遺伝子は、ヒト遺伝子のDNA配列全体を備える。一部の実施形態では、ヒト化タンパク質は、ヒトタンパク質に見られる一部分を持つ配列を備える。一部の実施形態では、ヒト化タンパク質は、ヒトタンパク質の配列全体を備え、ヒト遺伝子のホモログまたはオルソログに対応する非ヒト動物の内因性遺伝子座から発現される。 20

【0081】

配列の比較と関連して本明細書において用いられる場合、「同一性」という用語は、ヌクレオチドおよび/またはアミノ酸配列の同一性を測定するために使用できる当技術分野において公知の多くの異なるアルゴリズムによって決定される同一性を指す。一部の実施形態では、本明細書に記述された同一性は、10.0のギャップ開始ペナルティ、0.1のギャップ延長ペナルティを用い、Gonnet類似性マトリックス(MACVECTOR(商標)10.0.2、MacVector Inc.、2008年)を使用したClustalW v. 1.83 (slow) アラインメントを使用して決定される。 30

【0082】

本明細書において用いられる場合、「単離された」という用語は、(1)(天然環境および/または実験環境のいずれかで)最初に生成された時にそれが関連していた成分の少なくとも一部から分離された物質および/もしくは実体、ならびに/または(2)ヒトの手によって設計、生産、調製、および/もしくは製造された物質ならびに/または実体を含む。分離された物質および/または実体は、それらが最初に関連していたその他の成分の約10%、約20%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、または約99%超から分離される場合がある。一部の実施形態では、単離された薬剤は、約80%、約85%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、または約99%を超えて純粋である。本 40

明細書において用いられる場合、物質は、その他の成分が実質的に含まれない場合、「純粹」である。一部の実施形態では、当業者であれば理解するように、例えば、一つ以上の担体または賦形剤（例えば、緩衝剤、溶媒、水など）などの特定のその他の成分と組み合わされた後でも、物質はまだ「単離された」または「純粹」とさえもみなされる場合があり、このような実施形態では、物質の単離または純度のパーセントはこのような担体または賦形剤を含めることなく計算される。一例を挙げると、一部の実施形態では、自然界に存在するポリペプチドまたはポリヌクレオチドなどの生体高分子は、a)導出の起源またはソースが、自然界の天然状態でそれに付随する成分の一部またはすべてと関連していない時、b)それが、自然界でそれを生産する種と同じ種のその他のポリペプチドまたは核酸を実質的に含まない時、またはc)自然界でそれを生産する種ではない細胞またはその他の発現系によって発現されるか、またはそうでなければそれからの成分と関連している時、「単離された」とみなされる。従って、例えば、一部の実施形態では、化学的に合成された、または自然界でそれを生産するものとは異なる細胞系で合成されたポリペプチドは、「単離された」ポリペプチドとみなされる。あるいはまたは追加的に、一部の実施形態では、一つ以上の精製技術を受けたポリペプチドは、それが、a)それが自然界で関連している、および/またはb)最初に生産された時にそれが関連していたその他の成分から分離されている限りは「単離された」ポリペプチドとみなされることができる。
10

【0083】

本明細書で使用される場合、「非ヒト動物」という文言は、ヒトではない任意の脊椎動物を指す。一部の実施形態では、非ヒト動物は、円口類、硬骨魚、軟骨魚（例えば、サメまたはエイ）、両生類、は虫類、哺乳類、または鳥類である。一部の実施形態では、非ヒト哺乳類は、靈長類、ヤギ、ヒツジ、ブタ、イヌ、ウシ、または齧歯類である。一部の実施形態では、非ヒト動物はラットまたはマウスなどの齧歯類である。
20

【0084】

本明細書において用いられる場合、「核酸」という語句は、そのもっとも広い意味で、オリゴヌクレオチド鎖であるか、もしくはオリゴヌクレオチド鎖に組み込まれることができる任意の化合物および/または物質を指す。一部の実施形態では、「核酸」とはオリゴヌクレオチド鎖であるか、またはホスホジエステル結合でオリゴヌクレオチド鎖組み込むことができる化合物および/または物質である。文脈から明らかであるように一部の実施形態では、「核酸」とは個別の核酸残基（例えば、ヌクレオチドおよび/またはヌクレオシド）を指し、一部の実施形態では、「核酸」とは個別の核酸残基を備えるオリゴヌクレオチド鎖を指す。一部の実施形態では、「核酸」はRNAであるかまたはそれを備え、一部の実施形態では、「核酸」はDNAであるかまたはそれを備える。一部の実施形態では、「核酸」は、一つ以上の天然核酸残基を備えるかまたはそれらから成る。一部の実施形態では、「核酸」は、一つ以上の核酸類似体を備えるかまたはそれらから成る。一部の実施形態では、核酸類似体は、ホスホジエステル骨格を利用しないという点で「核酸」とは異なる。例えば、一部の実施形態では、「核酸」は、当技術分野では知られており、骨格にホスホジエステル結合の代わりにペプチド結合を持つ、一つ以上の「ペプチド核酸」であるか、またはそれらを備え、それらは本発明の範囲内であるとみなされる。あるいはまたはさらに、一部の実施形態では、「核酸」は、ホスホジエステル結合ではなく、一つ以上のホスホロチオエートおよび/または5'-N-ホスホラミダイト結合を持つ。一部の実施形態では、「核酸」は一つ以上の天然ヌクレオシド（例えば、アデノシン、チミジン、グアノシン、シチジン、ウリジン、デオキシアデノシン、デオキシチミジン、デオキシグアノシン、およびデオキシシチジン）であるか、または一つ以上の天然ヌクレオシドから成る。一部の実施形態では、「核酸」は、一つ以上のヌクレオシド類似体（例えば、2-アミノアデノシン、2-チオチミジン、イノシン、ピロロ-ピリミジン、3-メチルアデノシン、5-メチルシチジン、C-5 プロピニル-シチジン、C-5 プロピニル-ウリジン、2-アミノアデノシン、C5-プロモウリジン、C5-フルオロウリジン、C5-ヨードウリジン、C5-プロピニル-ウリジン、C5-プロピニル-シチジン、C5-メチルシチジン、2-アミノアデノシン、7-デアザアデノシン、7-デアザグアノシン、8-オキソアデノシン、8-オキソグアノシン、0(6)-
30
40
50

メチルグアニン、2-チオシチジン、メチル化塩基、インターラート塩基、およびそれらの組み合わせ)であるか、またはそれらから成る。一部の実施形態では、「核酸」は、天然核酸のものと比べて、一つ以上の修飾された糖(例えば、2'-フルオロリボース、リボース、2'-デオキシリボース、アラビノース、およびヘキソース)を備える。一部の実施形態では、「核酸」は、RNAまたはタンパク質などの機能的遺伝子産物をコードするヌクレオチド配列を持つ。一部の実施形態では、「核酸」は、一つ以上のイントロンを含む。一部の実施形態では、「核酸」は、天然起源物からの単離、相補的鑄型に基づく重合による酵素合成(インビオまたはインビトロ)、組み換え細胞または系での複製、および化学合成の一つ以上によって調製される。一部の実施形態では、「核酸」は、少なくとも3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、20、225、250、275、300、325、350、375、400、425、450、475、500、600、700、800、900、1000、1500、2000、2500、3000、3500、4000、4500、5000またはそれを超える残基の長さである。一部の実施形態では、「核酸」は一本鎖であり、一部の実施形態では、「核酸」は二重鎖である。一部の実施形態では、「核酸」はポリペプチドをコードするか、またはポリペプチドをコードする配列の補体である少なくとも一つの要素を備えるヌクレオチド配列を持つ。一部の実施形態では、「核酸」は酵素活性を持つ。

【0085】

本明細書において用いられる場合、「動作可能なように連結した」という文言は、記述される構成要素が、それらが意図された様式で機能することができるような関係にある並置を指す。コード配列に「動作可能なように連結した」对照配列は、对照配列に適合する条件下でコード配列の発現が達成されるように結合されている。「動作可能なように連結した」配列には、関心の遺伝子と隣接する発現制御配列および、トランスにまたは距離を置いて作用して対象の遺伝子を制御する発現制御配列の両方を含む。「発現制御配列」という用語は、本明細書において用いられる場合、それらが結合されているコード配列の発現およびプロセッシングを生じさせるために必要なポリヌクレオチド配列を指す。「発現制御配列」には、適切な転写開始、終結、プロモーターおよびエンハンサー配列、スプライシングおよびポリアデニル化シグナルなどの効率的RNAプロセッシングシグナル、細胞質mRNAを安定化する配列、翻訳効率を強化する配列(すなわち、コザック配列)、タンパク質安定性を強化する配列、および望ましい場合、タンパク質分泌を強化する配列を含む。このような制御配列の性質は、宿主生物によって異なる。例えば、原核生物では、このような制御配列は一般的に、プロモーター、リボソーム結合部位、および転写終結配列を含む一方、真核生物では、一般的に、このような制御配列はプロモーターおよび転写終結配列を含む。「制御配列」という用語は、その存在が発現およびプロセッシングのために必須である要素を含むことを意図しており、その存在が有利である追加的要素、例えば、リーダー配列および融合パートナー配列も含むことができる。

【0086】

本明細書において用いられる場合、「ポリペプチド」という用語は、アミノ酸の任意のポリマー鎖を指す。一部の実施形態では、ポリペプチドは、自然界に存在するアミノ酸配列を持つ。一部の実施形態では、ポリペプチドは、自然界に存在しないアミノ酸配列を持つ。一部の実施形態では、ポリペプチドは、お互いに別々に自然界に存在する部分を含むアミノ酸配列を持つ(すなわち、例えば、ヒトおよび非ヒト部分など、二つ以上の異なる生物からのもの)。一部の実施形態では、ポリペプチドは、それが人の手の作用を通して、設計および/または生産されるという点で、遺伝子操作されたアミノ酸配列を持つ。

【0087】

「組み換え」という用語は、本明細書において用いられる場合、組み換え手段によって設計、操作、調製、発現、生成または単離されたポリペプチド(例えば、本明細書に記述されるCD47ポリペプチド)を指すことが意図されており、例えば、宿主細胞中にトランسفェクトされた組み換え発現ベクターを使用して発現されたポリペプチド、組み換えコンビナトリアルヒトポリペプチドライブリから単離されたポリペプチド(Hoogenboom H.

10

20

30

40

50

R., (1997) TIB Tech. 15:62-70; Azzazy H., and Highsmith W. E., (2002) Clin. Biochem. 35:425-445; Gavilondo J. V., and Lerrick J. W. (2002) BioTechniques 29:128-145; Hoogenboom H., and Chames P. (2000) Immunology Today 21:371-378)、ヒト免疫グロブリン遺伝子に対しトランスジェニックである動物（例えば、マウス）から単離された抗体（例えば、Taylor, L. D., et al. (1992) Nucl. Acids Res. 20:6287-6295; Kellermann S-A., and Green L. L. (2002) Current Opinion in Biotechnology 13:593-597; Little M. et al. (2000) Immunology Today 21:364-370; Murphy, A.J., et al. (2014) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 111(14):5153-5158を参照）または選択された配列要素の相互スプライスを伴うその他の任意の手段によって調製、発現、生成または単離されたポリペプチドを指す。一部の実施形態では、このような選択された配列要素の一つ以上は自然界に存在する。一部の実施形態では、このような選択された配列要素の一つ以上はインシリコで設計される。一部の実施形態では、一つ以上のこののような選択配列要素は、例えば、天然または合成起源の既知の配列要素の変異誘導（例えば、インビボまたはインビトロ）から生じる。例えば、一部の実施形態では、組み換えポリペプチドは、対象のソース生物（例えば、ヒト、マウスなど）のゲノムに見られる配列から成る。一部の実施形態では、組み換えポリペプチドは、変異誘導（例えば、非ヒト動物での、インビトロまたはインビボ）から生じるアミノ酸配列を持ち、従って、組み換えポリペプチドのアミノ酸配列は、ポリペプチド配列から由来するが、インビボで非ヒト動物のゲノム内に自然には存在しない場合がある。10

20 【0088】

「置換」という用語は、本明細書において用いられる場合、（例えば、ゲノム中などの宿主遺伝子座に存在する「置換される」核酸配列（例えば、遺伝子など）がその遺伝子座から取り除かれ、別の「置換」核酸がその場所に配置されるプロセスを指す。一部の実施形態では、置換された核酸配列および置換用核酸配列は、例えば、それらがお互いに相同である、および／または対応する要素（例えば、タンパク質コード要素、調節要素など）を含むという点でお互いに同等である。一部の実施形態では、置換された核酸配列には、プロモーター、エンハンサー、スプライス供与部位、スプライス受容部位、イントロン、エクソン、非翻訳領域（UTR）のうち一つ以上を含み、一部の実施形態では、置換用核酸配列には、一つ以上のコード配列を含む。一部の実施形態では、置換用核酸配列は置換された核酸配列のホモログである。一部の実施形態では、置換用核酸配列は置換された配列のオルソログである。一部の実施形態では、置換用核酸配列はヒト核酸配列であるかまたはそれを備える。一部の実施形態では、置換用核酸配列がヒト核酸配列であるかまたはそれを備える場合を含め、置換された核酸配列は齧歯類配列（例えば、マウスまたはラット配列）であるかまたはそれを備える。そのように配置された核酸配列は、そのように配置された配列を得るために使用されるソース核酸配列の一部である一つ以上の調節配列を含む場合がある（例えば、プロモーター、エンハンサー、5'-または3'-非翻訳領域など）。例えば、さまざまな実施形態で、置換は、そのように配置された核酸配列（異種配列を備える）からの遺伝子産物の産生を生じさせる、内因性配列と異種配列との置き換えであるが、内因性配列の発現ではない。置換は、内因性ゲノム配列と、当該内因性配列によってコードされるタンパク質と類似した機能を有するタンパク質をコードする核酸配列との置換である（例えば、内因性ゲノム配列はCD47タンパク質をコードしており、DNA断片は一つ以上のヒトCD47タンパク質をコードしている）。さまざまな実施形態で、内因性遺伝子またはその断片は、対応するヒト遺伝子またはその断片で置換される。対応するヒト遺伝子またはその断片は、置換される内因性遺伝子またはその断片のオルソログである、またはそれと構造および／もしくは機能が実質的に類似しているかもしくは同じヒト遺伝子または断片である。30

40 【0089】

本明細書において用いられる場合、「cluster of differentiation 47タンパク質」または「CD47タンパク質」という文言は、イムノグロブリンスーパーファミリーに属する50

複数回貫通型膜タンパク質を指し、細胞外アミノ末端イムノグロブリンVドメイン、5つの膜貫通ドメイン、および短いカルボキシル末端細胞内尾部を有している。CD47は細胞表面上に発現し、たとえばインテグリン、SIRP、およびトロンボスponジン-1(TSP-1)などの膜表面タンパク質間の相互作用に関与している。CD47は正常組織中において発現され、多くのヒトの癌において上方制御されている。CD47は、たとえばアポトーシス、増殖、付着、および遊走などのいくつかの細胞プロセスに関与していることが示されている。数種の選択的スプライス型CD47アイソフォームがマウスとヒトの間で同定されている。例示として、マウスおよびヒトのCD47遺伝子のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列を表3に提示する。当業者であれば、本開示を読むことで、ゲノム中の一つ以上の内因性CD47遺伝子（またはすべて）が、一つ以上の異種CD47遺伝子（例えば、多型バリエント、サブタイプまたは突然変異体、別の種由来の遺伝子、ヒト化型など）で置換され得ることを認識するであろう。

【0090】

本明細書において用いられる場合、「CD47発現細胞」とは、CD47膜貫通型タンパク質を発現する細胞を指す。一部の実施形態では、CD47発現細胞は、その表面上でCD47膜貫通型タンパク質を発現している。一部の実施形態では、CD47タンパク質は、その細胞表面上に発現されたCD47膜貫通型タンパク質を介した細胞間相互作用を調節するのに十分な量で、細胞表面上に発現される。例示的なCD47発現細胞としては、神経細胞、免疫細胞、角化細胞および循環細胞が挙げられる。CD47発現細胞は、たとえば付着、細胞増殖および/またはアポトーシス、血管新生ならびに炎症などの様々な細胞プロセスを制御するために、免疫細胞と循環細胞の相互作用を制御している。一部の実施形態では、本発明の非ヒト動物は、当該非ヒト動物の一つ以上の細胞表面上に発現されたヒト化CD47タンパク質を介した、（本明細書に記述された）さまざまな細胞プロセスの制御を示している。

【0091】

「参照」という用語は、本明細書において、対象の剤、動物、コホート、個人、集団、サンプル、配列または値が比較される、標準または対照の剤、コホート、個人、集団、サンプル、配列または値を記述するために用いられる。一部の実施形態では、参照薬剤、コホート、個人、集団、サンプル、配列または値は、対象の薬剤、コホート、個人、集団、サンプル、配列または値の試験または決定と実質的に同時に試験および/または決定される。一部の実施形態では、参照薬剤、コホート、個人、集団、サンプル、配列または値は、随意に有形媒体で具現化された歴史的参照である。一部の実施形態では、参照は対照を指す場合がある。本明細書で使用される場合、「参照」は「参照動物」を指す場合がある。「参照動物」は本明細書に記述された変更、本明細書に記述されたものとは異なる変更を持つか、または未変更（すなわち、野生型動物）である場合がある。一般的には、当業者には理解されるであろうように、参照薬剤、動物、コホート、個人、集団、サンプル、配列または値は、対象の薬剤、動物（例えば、哺乳類）、コホート、個人、集団、サンプル、配列または値を決定または特徴付けるために利用されるものと同等の条件下で決定または特徴付けられる。

【0092】

「実質的に」という用語は、本明細書において用いられる場合、対象の特徴または特性のすべての、またはほぼすべての範囲または程度を示す定性的な状態を指す。生物学分野の当業者であれば、生物学的および化学的な現象はあったとしても、完了まで進む、および/または完全な状態まで進行する、または絶対的な結果を達成または避けることは稀であることを理解するであろう。従って「実質的に」という用語は本明細書では、多くの生物学的および化学的な現象に固有の完全性の欠如の可能性をとらえるために使用される。

【0093】

「実質的な相同性」という文言は、本明細書において用いられる場合、アミノ酸配列または核酸配列の間の比較を指す。当業者であれば理解するように、二つの配列はそれらが対応する位置に相同な残基を含む場合、「実質的に相同」であると一般的にみなされる。相同残基は同一の残基である場合がある。あるいは、相同残基は、適切に類似の構造およ

10

20

30

40

50

び／または機能的特徴を持つ非同一残基である場合がある。例えば、当業者には周知のように、特定のアミノ酸は「疎水性」または「親水性」アミノ酸、および／または「極性」または「非極性」側鎖を持つものとして一般的に分類される。一つのアミノ酸の同じタイプの別のアミノ酸での置換は、「相同」置換とみなされる場合がよくある。一般的なアミノ酸分類が表1および2に要約されている。

【表1】

表1

アラニン	Ala	A	非極性	中性	1.8	10
アルギニン	Arg	R	極性	陽性	-4.5	
アスパラギン	Asn	N	極性	中性	-3.5	
アスパラギン酸	Asp	D	極性	陰性	-3.5	
システイン	Cys	C	非極性	中性	2.5	
グルタミン酸	Glu	E	極性	陰性	-3.5	
グルタミン	Gln	Q	極性	中性	-3.5	20
グリシン	Gly	G	非極性	中性	-0.4	
ヒスチジン	His	H	極性	陽性	-3.2	
イソロイシン	Ile	I	非極性	中性	4.5	
ロイシン	Leu	L	非極性	中性	3.8	
リジン	Lys	K	極性	陽性	-3.9	
メチオニン	Met	M	非極性	中性	1.9	30
フェニルアラニン	Phe	F	非極性	中性	2.8	
プロリン	Pro	P	非極性	中性	-1.6	
セリン	Ser	S	極性	中性	-0.8	
スレオニン	Thr	T	極性	中性	-0.7	
トリプトファン	Trp	W	非極性	中性	-0.9	
チロシン	Tyr	Y	極性	中性	-1.3	
バリン	Val	V	非極性	中性	4.2	40

【表2】

表2

曖昧なアミノ酸	3文字	1文字
---------	-----	-----

アスパラギンまたはアスパラ ギン酸	Asx	B	10
グルタミンまたはグルタミン 酸	Glx	Z	
ロイシンまたはイソロイシン	Xle	J	
不特定または未知のアミノ酸	Xaa	X	

【0094】

当技術分野で周知のように、アミノ酸または核酸配列は、ヌクレオチド配列に対するBLASTNおよびBLASTP、gapped BLAST、およびアミノ酸配列に対するPSI-BLASTなどの市販のコンピュータプログラムで利用可能なものを含む、さまざまなアルゴリズムの任意のものを使用して比較することができる。かかるプログラムの例示は、Altschul et al., (1990) *Basic local alignment search tool*, *J. Mol. Biol.*, 215(3): 403-410、Altschul et al., (1997) *Methods in Enzymology*、Altschul et al., "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402、Baxevanis et al., (1998) *Bioinformatics: A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins*, Wiley、およびMisener et al., (eds.) (1999) *Bioinformatics Methods and Protocols* (*Methods in Molecular Biology*, Vol. 132), Humana Pressに記述されている。
20
相同配列を特定することに加えて、上述のプログラムは相同性の程度の指標を一般的に提供する。一部の実施形態では、二つの配列は、残基の関連する区間に渡って、その対応残基の少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれ以上が相同の場合、実質的に相同であるとみなされる。一部の実施形態では、関連する区間は完全配列である。一部の実施形態では、関連する区間は少なくとも9、10、11、12、13、14、15、16、17またはそれ以上の残基である。一部の実施形態では、関連する区間は完全配列に沿った隣接残基を含む。一部の実施形態では、関連する区間は完全配列に沿った不連続残基を含む。一部の実施形態では、関連する区間は少なくとも10、15、20、25、30、35、40、45、50またはそれ以上の残基である。
30

【0095】

「実質的な同一性」という文言は、本明細書において用いられる場合、アミノ酸配列または核酸配列間の間の比較を指す。当業者であれば理解するように、二つの配列はそれらが対応する位置に同一な残基を含む場合、「実質的に同一」であると一般的にみなされる。当技術分野で周知のように、アミノ酸または核酸配列は、ヌクレオチド配列に対するBLASTNおよびBLASTP、gapped BLAST、およびアミノ酸配列に対するPSI-BLASTなどの市販のコンピュータプログラムで利用可能なものを含む、さまざまなアルゴリズムの任意のものを使用して比較することができる。かかるプログラムの例示は、Altschul et al., (1990) *Basic local alignment search tool*, *J. Mol. Biol.*, 215(3): 403-410、Altschul et al., (1997) *Methods in Enzymology*、Altschul et al., "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs"
40
50

ams", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402、Baxevanis et al., (1998) Bioinformatics: A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins, Wiley、およびMisener et al.,(eds.) (1999) Bioinformatics Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology, Vol. 132), Humana Pressに記述されている。同一配列の特定に加え、上述のプログラムは多くの場合、同一性の程度の指標も提供する。一部の実施形態では、二つの配列は、残基の関連する区間に渡って、その対応残基の少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれ以上が同一の場合、実質的に同一であるとみなされる。一部の実施形態では、関連する区間は完全配列である。一部の実施形態では、関連する区間は少なくとも10、15、20、25、30、35、40、45、50またはそれ以上の残基である。

10

【0096】

「標的化ベクター」または「標的化構築物」という語句は、本明細書において用いられる場合、標的化領域を備えるポリヌクレオチド分子を指す。標的化領域は、標的細胞、組織または動物の配列と同一または実質的に同一の配列を備え、相同組み換えにより、標的化構築物を、細胞、組織または動物のゲノム内の位置に統合する。部位特異的リコンビナーゼ認識部位（例えば、loxPまたはFrt部位）を使用して狙う標的化領域も含まれる。一部の実施形態では、本発明の標的化構築物は、特に関心のある核酸配列または遺伝子、選択可能マーカー、制御およびまたは調節配列、ならびにこのような配列が関与する組み換えを支援または促進するタンパク質の外からの追加を通して媒介される組み換えを許容するその他の核酸配列をさらに備える。一部の実施形態では、本発明の標的化構築物は対象の遺伝子の全部または一部をさらに備え、対象の遺伝子は、内因性配列によってコードされるタンパク質と類似の機能を持つたんぱく質の全部または一部をコードする異種遺伝子である。一部の実施形態では、本発明の標的化構築物は対象のヒト化遺伝子の全部または一部をさらに備え、対象のヒト化遺伝子は、内因性配列によってコードされるタンパク質と類似の機能を持つたんぱく質の全部または一部をコードする対象のヒト化遺伝子である。

20

【0097】

「バリアント」という用語は、本明細書において用いられる場合、参照実体と高い構造的同一性を示すが、参照実体と比較し、一つ以上の化学的部分の存在下で、または一つ以上の化学的部分のレベルで、参照実体とは構造的に異なる実体を指す。多くの実施形態では、「バリアント」は、その参照実体とは機能的にも異なる。一般的に、特定の実体が、参照実体の「バリアント」と正しくみなされるかどうかは、参照実体とのその構造同一性の程度に基づく。当業者であれば理解するように、すべての生物学的または化学的参照実体は特定の特徴的構造要素を持つ。「バリアント」は、定義によると、一つ以上のこのような特徴的構造要素を共有する別個の化学的実体である。いくつかの例を挙げると、小分子は特徴的なコア構造要素（例えば、マクロサイクルコア）および／または一つ以上の特徴的懸垂部分を持つ場合があり、従って小分子のバリアントは、コア構造要素および特徴的懸垂部分を共有するが、その他の懸垂部分および／またはコア内に存在する結合のタイプ（単に対する二重、Eに対するZなど）が異なるものであり、ポリペプチドは、直線または三次元空間でお互いに対して指定された位置を持つおよび／または特定の生物学的機能に寄与する複数のアミノ酸から成る特徴的配列要素を持つ場合があり、核酸は、直線または三次元空間でお互いに対して指定された位置を持つ複数のヌクレオチド残基から成る特徴的配列要素を持つ場合がある。例えば、「バリアントポリペプチド」は、アミノ酸配列の一つ以上の差異および／またはポリペプチド骨格に共有結合した化学的部分（例えば、炭化水素、脂質など）の一つ以上の差異の結果として、参照ポリペプチドとは異なる場合がある。一部の実施形態では、「バリアントポリペプチド」は、参照ポリペプチドと少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、または99%の全体的配列同一性を示す。あるいはまたはさらに、一部の実施形態では、「バリアントポリペプチド」は、少なくとも一つの特徴的配列要素を参照ポリペプチドと共有しない。一部の実施形態では、参照ポリペプチドは一つ以上の生物活性を持つ。一部の実施形態で

30

40

50

は、「バリアントポリペプチド」は参照ポリペプチドの生物活性の一つ以上を共有する。一部の実施形態では、「バリアントポリペプチド」は参照ポリペプチドの生物活性の一つ以上を欠く。一部の実施形態では、「バリアントポリペプチド」は参照ポリペプチドと比べて一つ以上の生物活性のレベル減少を示す。多くの実施形態で、特定位置での少数の配列変更がなければ対象のポリペプチドが親のものと同一のアミノ酸配列を持つ場合、対象のポリペプチドは親または参照ポリペプチドの「バリアント」であるとみなされる。一般的に、親と比べて、バリアントの残基の20%、15%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%未満が置換される。一部の実施形態では、「バリアント」は親と比べて、10、9、8、7、6、5、4、3、2、または1個の置換残基を持つ。しばしば、「バリアント」は、非常に少数の（例えば、5、4、3、2、または1未満）の置換された機能残基（すなわち、特定の生物活性に参加する残基）を持つ。さらに、「バリアント」は一般的には5、4、3、2、または1以下の付加または欠失を持ち、親と比べて付加または欠失を持たないことがよくある。さらに、任意の付加または欠失は一般的には、約25、約20、約19、約18、約17、約16、約15、約14、約13、約10、約9、約8、約7、約6未満であり、通常は約5、約4、約3、または約2残基である。一部の実施形態では、親または参照ポリペプチドは自然界に見られるものである。当業者であれば理解するように、特に対象のポリペプチドが感染因子ペプチドである時、対象の特定ポリペプチドの複数のバリアントは、通常は自然界に見られる場合がある。
10

【0098】

「ベクター」という用語は、本明細書において用いられる場合、それが関連している別の核酸を輸送することができる核酸分子を指す。一部の実施形態では、ベクターは、染色体外複製および／または、真核および／または原核細胞などの宿主細胞中でそれらが連結している核酸の発現能力がある。動作可能なように連結された遺伝子の発現を方向付けることができるベクターは、本明細書では「発現ベクター」と呼ばれる。
20

【0099】

「野生型」という用語は、本明細書において用いられる場合、（変異体、病的、改変などと対照をなす）「正常」な状態または状況で自然界に存在する構造および／または活性を有する実体を指す当技術分野に理解されている意味を有する。当業者であれば、野生型遺伝子およびポリペプチドはしばしば複数の異なる形態（例えば、アレル）で存在することを理解するであろう。
30

[発明を実施するための形態]

【0100】

本発明は、特に、癌の治療のためのcluster of differentiation 47 (CD47) 拮抗薬（たとえば、抗CD47抗体）の治療有効性を決定するための、ならびに移植片生着、活性化および貪食およびシグナル伝達のアッセイのための、CD47遺伝子をコードするヒト化遺伝物質を有する改良された、および／または操作された非ヒト動物を提供するものである。このような非ヒト動物は、CD47拮抗薬の治療有効性の決定、およびそれらのCD47阻害能力の決定における改善を提供することが予期される。また、このような非ヒト動物は、ヒト細胞の移植片生着における改善を提供することが予期される。したがって、本発明は、様々な癌の治療のための抗CD47治療剤の開発、ならびに非ヒト動物におけるヒト造血細胞の維持に特に有用である。特に、本発明は、非ヒト動物の細胞表面上にヒト化CD47タンパク質の発現を生じさせる、マウスCD47遺伝子のヒト化を包含する。かかるヒト化CD47タンパク質は、腫瘍細胞の貪食を活性化させる抗CD47治療剤の有効性を決定するための、ヒトCD47⁺細胞の源を提供する能力を有している。さらに、かかるヒト化CD47タンパク質は、生着ヒト細胞の表面上に存在するリガンド（たとえば、SIRP）と他の細胞表面タンパク質の結合を介して、当該生着ヒト細胞を認識する能力を有している。一部の実施形態では、本発明の非ヒト動物は、当該非ヒト動物の細胞表面上に発現されたヒト化CD47タンパク質を経由したCD47シグナル伝達の阻害を介して、貪食を活性化させることができる。一部の実施形態では、本発明の非ヒト動物は、移植されたヒト造血細胞を受け入れることができる。一部の実施形態では、かかる非ヒト哺乳動物は、ヒト細胞を備える免疫系を発現、お
40
50

および／または有する。一部の実施形態では、ヒト化CD47タンパク質は、ヒトCD47タンパク質のN末端イムノグロブリンVドメインに相当する配列を有する。一部の実施形態では、ヒト化CD47タンパク質は、ヒトCD47タンパク質の細胞外部分と膜貫通部分を備えたヒトCD47タンパク質のN末端部分に相当する配列を有しており、この場合において、当該細胞外部分は、ヒトCD47タンパク質のN末端イムノグロブリンVドメインを含有し、当該膜貫通部分は、ヒトCD47タンパク質の5つの膜貫通ドメインを含有している。一部の実施形態では、ヒト化CD47タンパク質は、非ヒト（たとえばマウス）のCD47タンパク質の細胞質内尾部に相当する配列を有している。一部の実施形態では、ヒト化CD47タンパク質は、ヒトCD47タンパク質のアミノ酸残基19～292（または19～141、または19～127）に相当する配列を有している。一部の実施形態では、本発明の非ヒト動物は、非ヒト動物および異種の種（例えれば、ヒト）からの遺伝物質を含む内因性CD47遺伝子を備えている。一部の実施形態では、本発明の非ヒト動物は、ヒト化CD47遺伝子を備えており、この場合において、当該ヒト化CD47遺伝子は、ヒトCD47遺伝子のN末端イムノグロブリンVドメインを含む細胞外部分をコードするヒトCD47遺伝子のエクソンを備えている。一部の実施形態では、ヒト化CD47遺伝子は、ヒトCD47タンパク質の細胞外部分と膜貫通部分を備えたヒトCD47タンパク質のN末端部分をコードする、たとえばエクソン2～7などのヒトCD47のエクソンを備えており、この場合において、当該細胞外部分は、ヒトCD47タンパク質のN末端イムノグロブリンVドメインを含み、当該膜貫通部分はヒトCD47タンパク質の5つの膜貫通ドメインを含んでいる。一部の実施形態では、ヒト化CD47遺伝子は、全部または一部のシグナルペプチド、および非ヒトCD47タンパク質の細胞質内尾部をコードする非ヒトCD47エクソンを備えている。一部の実施形態では、ヒト化CD47遺伝子は、非ヒトCD47エクソン1と、細胞質内尾部および3'UTRをコードするエクソン7の下流のエクソン（複数含む）を備えている。アイソフォームによっては、すべてのアイソフォームの最後のエクソンに存在する停止コドンと3'UTRとともに、エクソン7の下流に一つ以上のエクソンが存在する。たとえば、表3に示されるマウスとヒトのCD47の両方のアイソフォーム2は、エクソン7の下流に二つのエクソンを有しており、それらはエクソン8および9と指定されている。
10
20

【0101】

本発明のさまざまな態様が以下のセクションに詳細に記述されている。セクションの使用は本発明を限定することを意図しない。各セクションは本発明の任意の態様に適用することができる。本明細書では、特に指定のない限り、「または」の使用は「および／または」を意味する。
30

Cluster of Differentiation 47 (CD47) 遺伝子

【0102】

CD47は、元々はその免疫細胞上のインテグリンからのシグナル伝達における役割から、インテグリン関連タンパク質（IAP: integrin-associated protein）と名付けられていた、N末端イムノグロブリンVドメイン、5つの膜貫通ドメイン、および短いC末端細胞質内尾部を含む膜貫通型タンパク質である。特定されている4つの選択的スプライス型アイソフォームによると、細胞質内尾部は長さが異なっている。CD47（またはIAP）は当初、すべての組織上（アイソフォーム2）、神経細胞（アイソフォーム4）、ならびに角化細胞およびマクロファージ（アイソフォーム1: Reinhold et al. (1995) J. Cell Sci. 108:3419-3425を参照のこと）で発現していると記述されていた。アイソフォーム3は、この4つのアイソフォームの中で2番目に長い細胞質内尾部を有しているにもかかわらず、ほとんど何も判明していない。CD47は、インテグリンに加え、たとえばトロンボスポンジン、およびSIRPファミリーのメンバーなどのいくつかの他の細胞表面タンパク質と相互作用することが知られている。特に、CD47は、SIRP と相互作用し、たとえば貪食阻害およびT細胞活性化などの様々な細胞間応答を制御する二方向性のシグナル伝達を生じさせる。実際に近年、CD47-SIRP の相互作用は、腫瘍細胞に免疫監視を逃れる能力をもたらすというその役割が明らかとなった。CD47のSIRP への結合は通常、抗貪食シグナル（「食べないで」）を通して正常細胞に保護をもたらすものである。しかしながら、腫瘍細胞もまた、貪食による破壊を逃れるためのCD47を含む抗貪食シグナルを発現していることが発見
40
50

された。興味深いことに、CD47は数種の血液癌において上方制御されており、これが腫瘍の成長と播種の両方に貢献していることが知られている (Chao et al. (2012) *Curr Opin Immunol.* 24(2): 225-232)。

【 0 1 0 3 】

癌に対する新たな治療法としてCD47とCD47-SIRP 経路を標的とする場合の効果のすべては明らかになっておらず、いくつか毒性の可能性が調査されている。将来的により優れた癌治療のための標的化療法を開発するためには、CD47のシグナル伝達と、CD47-SIRP 経路に関するより徹底した詳細な理解が必要である。

CD47配列

【 0 1 0 4 】

10

マウスとヒトの例示的なCD47配列を表3に解説する。mRNA配列については、太字はコード配列を示し、その太字で示されているなかで、連続したエクソンは、交互の下線文字により分けられている。マウスとヒトのタンパク質配列に関しては、シグナルペプチドは下線を引かれており、細胞外配列は太字、細胞質内配列は斜体となっている。ヒト化タンパク質配列に関しては、非ヒト配列は通常のフォントで示され、ヒト配列は太字で示され、シグナルペプチドは下線を引かれている。示されているとおり、アイソフォームはエクソンの数が異なっている。たとえば、ヒトCD47遺伝子のアイソフォーム1~4は、総数でそれぞれ8個、9個、10個および11個のエクソンを有しており、各アイソフォームのエクソン2~7は細胞外ドメインと5つの膜貫通ドメインをコードしている。

【表3-1】

表3

マウス CD47 mRNA アイソフォーム 1 (XM_006521810.1)

GCCTACACCGGGAGAGCAGGGAGGAGGAGTTGGACTGAGGTTGGCGGCTCCGAGGTCCAGGGGAGCTTG
 GCCAGAGGGAGTAGAGAGCAGCGGGCTGCGCAGGGACGCGTGCGTGAGTCCGGTGAGCGTGTGTGTC
 CATGCTCCGTCTTCAGGCCGCCAGGACACGAAGCGGAAGAGAGCTGGCTGGAGGGACGGGGCGT 10
 GAGCAGAGAGTGCAACCGCGCAGCCCCGGGACAGGCTGATTCTGGCGCTCTCCGCCGGAGCCTGCCA
 GGGCTGGGTGTGAGGCTGGCGTCACGTCAACGAGCAGAGGCCAGGCGGGCGAGTGCCTGCGCG
 GGCGCGAGCACGCGCGCGCACCCCCGGGAGCCTGGCGGCCCTGCCTGTCAGTGCCTGCGCG
 GCTGCTGGTCGGTCGTTCCCTGAAGGCAGCAGCGAGGCCGGCTGCTCCAGACACCTGCCGGCGA
 CCCCCCGGCCGGCGAG
 ATGTGCCCTGGCGCGCGTGTGCTGGCTCTGCTGCGGTCAGCTCAACTACTGTTAGTA 20
 ACGTCAACTCCATAGAGTTCACTTCATGCAATGAAACTGTGGTCATCCCTGCATCGTCCGTAATGTGGA
 GGCGCAAAGCACCGAAGAAATGTTGTGAAGTGGAAAGTTGAACAAATCGTATATTTCATCTATGATGGA
 AATAAAAATAGCACTACTACAGATCAAAACTTACCGAGTGCAGGAAACTCTCAGTCTCAGACTTAATCAATG
 GCATTGCCCTTTGAAAATGGATAAGCGCGATGCCATGGTGGAAACTACACTTGCAGTGCAGAGTT
 ATCCAGAGAAGGCAAAACAGTTAGAGCTGAAAACCGCACGGCCTCAACACTGACCAAGGATCAGCC
 TGTTCTACGAGGAGGAGAAAGGAGGTTGCAAATTAGTTCTGGTTCTCAAATGAAAAGATCCTCA 30
 TTGTTATTTCCCAATTGGCTACTCCTGTTCTGGAAAGTTGGTATTTAACACTCAAATATAA
 ATCCAGCCATACGAATAAGAGAATCATTCTGCTGCTGCGTGCCTGCCGGCTGGCTCACAGTCATCGTGGTT
 GTTGGAGGCATCCTCTCATCCAGGAGAAAAGCCGTGAAGAATGCTCTGGACTTGGCTCATTGTAA
 TCTCTACGGGGATTTAACACTACTTCAGTACAATGTGTTATGACAGCTTGGAAATGACCTCTTCAC
 CATTGCCATATTGATCACTCAAGTGCTGGCTACGTCTGCTTGGTGGCTGTCTGCATCATG
 GCATGTGAGCCAGTGCACGGCCCCTTGATTCAGGTTGGGATCATGCTCTAGCAGAAACTACTG
 GATTAGTTATATGAAGTTGCGAATAG 40
 GTGAAGGGAAGTGACGGACTGTAACCTGGAAGTCAGAAATGGAAGAATACAGTTGCTAAGCACCAGGTCT
 TCACGACTCACAGCTGGAAGGAACAGACAACAGTAACTGACTTCCATCCAGGAAACATGTCACATAATG
 ATTACTAAGTTATTCAGCAGCTGACTTACATAATAAAAAAAATGATGTGCTGTGTAACCAAT

【表3-2】

TGGAAATCCCATTTCTATTGTTCTACTCAACTAGGGGAAACGTTCAGGGCAACTCCAAGAATGAT
 GCTTGTAGATCCTAGAGTCTCTGAACACTGAGTTAAATTGATTCCGAGTGAGACTGCCAAGCACTAAC
 CTGAGGGTAGTTACCCAGAGATACCTATGAAAAACAGTGGTATCCAGCAAGCCTAGTAAACTCAGGTTG
 CCAGCAGCTTGCCACTTCCGCTGCTAGCTGAATAACAAGACTGCCACTCTGGTCATAGTGTAGAGAC
 TGAAGTAGAAAAACGAATGTGGTGGCAAATCCCGTGTGGCCCTCTGTGTGCTATGATATTGATGGCAC
 TGGTGTCTCATTCTGGGGTGCCATCATTACACACACCCCCTTGACATACAGTGCACCCAGTTG 10
 AATACATTTTTTGACCCCTGCCCCGTCTGCTACTTGATTGCGTTATGATATATATATATATATA
 ATACCTTTCTCCTCTTAAACATGGCCTGTGACACAATAGTCAGTTGCAGAAAGGAGCCAGACTTATTG
 GCAAAGCACTGTGCTCAAACCTTCAGAAAAAAAGGAAAAAAAGCTATAGTGTAAACATATGTAT
 TCCAGACCTCTGGTTAAAGGAAAAGAAAAAAACTACAGTGTCTCTGCATGGCAACACGTGTCTCCGTCAGGCCCTCGC
 CATGACAAAGCAAGACTGAAACTGAACGTGTCTCCCTGCATGGCAACACGTGTCTCCGTCAGGCCCTCGC
 AAGGCCGGGAGGGGTTCTACGCCTTGTCTTGTGCATGCTGAACACTCATGCCCTCCTACTG 20
 TATCCTGCCTCCTGCAGCCTCCCTTCCCTCCTCTCCCTCTCCCTCTCCCTCTCCCTCTCTCT
 TCCTCCAAGTTGAAAGGTCAAACAAAACACCACATTCCCTACCCAGTTAGAAGAAAACCACCGTCTGA
 CAGTTGTATCGATGGAGTACTTTAGATTAGCACCTGTTTACCTCGTTGTGGCGTGTGTA
 TGTGCACATGTATGAAGTCGGCACATGCACCTCTGTATGGCAGAGGCATGGCATCTACAGAAGAGCAGA
 TGCCAACTTGTGCTTTAGTGAATACATTAAAAAAACCAACGGTCTTATTGAGTGGATTCTAT
 TTGATGCAAATATTGAGCTTTAAGACTTAAACTAGATAATGTGCCAAGCTTACGGACTGCTCACC 30
 AGTGCCTCTGAAGAAACACCACTTTCTGTCTGTGTAATAAGGCATATTGTATTGTTGTTGC
 ATCACTAATGGTTATTCTCTTAGTCCACTGAATGTTCCATGTGCCTCTCGTATGCCAAACTTTGTC
 ATCTTCATGTGGGACCAAATGGTTGTCTGTGGAAACCTAAACCTATGACCTGCTGAGGCCCTCAGA
 AACTGACCACAGTACCAAGATAGTACTTCGCAAAGAAAAGTAGGTTCCCTCCCTGGTTTAGCTGTCG
 CCAATTAGCGTAATTCCAAGGAGCTGAACGCCCTTATATAATCTGATGGCACCTGATGCTTACGGT
 TGAAAATTTACACTCGGATCATGTTGATGACTAAACAAAGTTGATGAAGAGAGCAAAAAAAA 40
 GCAGGTGGATTGGAACAGTTCAAGGTTTTTGTGTTTTGTTTTGTTTTGTTTTGTTTTTAT
 TTTGTTTCTGTTCTGTTAGAAAAGTCAGGTGTTCTGTCAGGCTATCTTATAGTCAATT
 TACGAACAAAGTAGTACCTTTAATATGAGTCACGCCCTCTGCTCGGGGTTCAAGTTGGCTTAA
 CCAGCTGTCATGTTCTATGCTGCCACTGAGGCACTGAGTGCCTAGACAGTCCCATCGGTGGTA
 GCCAGGGAAACGAAAGACGAACCTCAACTCTGCTCCTAATAATCAACTCTGATGAAGGATGGCAGCAT

【表3-3】

TAAGAGTCCTCCTGCCTGGCATTATTGGGCCAGTTCACCCCTTTAAATCAAACCCGAGTGGCTCCAG
 TTCTCGTCCCACAGTTAAATTGCTAACAGTATGGGGGCACCACGCATCTGTTGTCCCACAATGCG
 CTTTCTCTCCAAATCCGATTCTGCTGTCATAGCCTCTATTCAATTTTATTGTCTGCCCTCCA
 CTTATACAATCGTAGAGAGCAATGCCATTGTCACTTCTGCAACAGTTTGAGCCTTATGGCTGAAT
 CCCATTTCCTCTTCAAACGTGTTGCTCCATTGCTCCTCCGCACGGCTGTCGTACAGTCATCCCA
 TCCATCTGGGGCCTTTCATCTCACCCCTCCTGGTCTCGTGGATCTCTGCTTACCTCTGTGGTT
 TTTTTTTTTTGACTTATTCTCTCACTGGACTTAAGATTACTTCCACAGCGAAAGTGCTGCCTCC
 CTTTCTGCCCGAGTGTCTCGTACTTAGATACTACTCAGTGCTGACATTGATGGAAAAGTTGCCT
 GCACCTAAATTCTTTAAAGGGTGAACATAGAGTTGGAGTTTCTCTTTCTCTTTCTCTCTC
 TCT
 CTCTCTCTTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCT
 AAATCTCACAGGCTTGAGAATTATAAAAGGTGACAGTCACCTGAAAATCACAGGTCTGGTCTGTTAAA
 TTGTTGAGAAATATCCGATTAAAAGTCTTGTGGCTGTGCTTAATAGGCTCTTTCAAGGACGTTGAGTC
 AATAGAGTGGCTGAACCATACTTGAGTTATAAGCTAAAAACTGATGCACCCACTCTGCTATTATCGT
 TTAGTAAGAGTTCACTGTATATCATTGCTAGGTTATCTGCTTACAGTGGTATTCAAATATGCCA
 CCAGAGGATATGTGAAATATAAGCACCTGTATTGCCCTGTTGAGAAGTGGAGGGAAAACAAAAATG
 TCTGGCAACCCTTGCCTTTAACCGTAATTGACAGTTAGAGATAAGAGTTTCAAAATC
 TCTTAACGCCACAACCCACAGAGGGTCTGTTGCCATCTCAGTGGCTCACAGATATGATCCAAGTTA
 ACTTGAAAGAGATGAGCAGTACCCAGGAAATTGCTCTGCCTTAACCTGGCTGTCCTTAATTATGACTGT
 TTAATGCTGAATTTCATCCGTCTAGTGTGTTGAGGGTAAAGAAAAGCCTTTAAATAAGTATTCTGT
 AAAACGGCATCGTGGATCTCTGTGCTATCACGGGTAAAGAGGGAAACATTCTTATTAAATAAGTATTCTGT
 AGCAGAGCATTATTACAGAAAGCCATTGTTGAGAATTAGTCCCACATCATATAAATATCCATTAACCAT
 TCTAAATTGTAAGAGAACTCCAGTGTGCTATGCACAAGGAACCTCCTGGGGCCTTTGCATAGCA
 ATTAAAGGTATGCTATTGTCAGTAGCCATTGAGTGTAAAGACCAAGTTGTTACAGCTGT
 GTTACCCCTAAAGGTTTTTATGTATTAAATCAATTATCACTGTTGAAGCTTGAATACCTGCAA
 TCTTGCCAAGATACTTTTATTAAAAAAATAACTGTGAAATATTACCCGTAAATTATATAACTT
 AATAAAACATTAAAGCTA (配列番号1)

マウス CD47 アミノ酸アイソフォーム 1 (XP_006521873.1)

【表3-4】

MWPLAAALLLGSCCCGSA QLLFSNVNSIEFTSCNETVVIPICVRNVEAQSTEEMFVKWKLNKSYIFIYDG
 NKNSTTTDQNFTSAKISVSDLINGIASLKMDKRDAMVGNYTCEVTELSREGKTVIELKNRTAFNTDQGSA
 CSYEEKGGCKLVSWFSPNEK
 ILIVIFPILAILFWGKFGILTLKYKSSHTNKRI ILLLVAGLVLTV I VVVGAILLIPGEKPVKNASGLGLI
 VISTGILILLQYNVFMTAFGMSFTIAILITQVLGYVLALVGLCLCIMACEPVHGPLISGLGI I ALAELL
 GLVYMKFV E (配列番号2)

10

マウス CD47 mRNA アイソフォーム 2 (XM_006521811.1)

GCCTACACCGGGAGAGCAGGGAGGAGGAGTTGGACTGAGGTTGGCGGCTCCGAGGTCCAGGGCAGCTTG
 GCCAGAGGGAGTAGAGAGCAGCGGGCTGCGCAGGGACGCGTCCGTGAGTTCCGGTGAGCGTGTGTGTC
 CATGCTCCGTCTTCAGGCCGCCAGGACACGAAGCCGAAGAGAGCTGGCTGGAGGGACGGGGCCGT
 GAGCAGAGAGTGCAACCCGGCAGCCCCGGGACAGGCTGATTCTTGGCGCTCTCCGGGAGCCTGCCA
 GGGCTGGGTGTGAGGCTGGCGTCACGTCAACGAGCAGAGCGGCCAGGCGGGAGTGCGCGTGC
 GCGCGCGAGCACGCGCGCGCACCCCCGGGAGGCTGGCGGCCGCTGCCTGTCAGTGC
 GCTGCTGGTCGGTCGTTCCCTGAAGGCAGCAGCGAGGCGGGCTGCTCCAGACACCTGCGCG
 CCCCCCGGGCGCGAG

20

ATGTGGCCCTTGGCGCGCGCTGTTGCTGGCTCCTGCTGCTGGTTCACTCAACTGTAGTA
 ACGTCAACTCCATAGAGTTCACTTCATGCAATGAAACTGTGGTCATCCCTGCATCGTCCGTAATGTGGA
 GGCGCAAAGCACCAGAAGAAATGTTGTGAAGTGGAAAGTTGAACAAATCGTATATTCATCTATGATGGA
 AATAAAAATAGCACTACTACAGATCAAAACTTACCACTGCAAAATCTCAGTCTCAGACTTAATCAATG
 GCATTGCCCTTTGAAAATGGATAAGCGCGATGCCATGGTGGAAACTACACTTGCAGAAGTGCACAGAGTT
 ATCCAGAGAAGGCAAAACAGTTAGAGCTGAAAACCGCACGGTTCTGGTTCTCAAATGAAAAG
 ATCCTCATGTTATTTCCAATTGGCTACTCCTGTTCTGGGAAAGTTGGTATTTAACACTCA
 AATATAAATCCAGCCATACGAATAAGAGAATCATTCTGCTGCTCGTTGCCGGCTGGTGCACAGTCAT
 CGTGGTTGGAGCCATCCTCTCATCCAGGAGAAAAGCCCGTGAAGAATGCTTCTGGACTTGGCCTC
 ATTGTAATCTCTACGGGGATTTAATACTACTTCAGTACAATGTGTTATGACAGCTTGGAAATGACCT
 CTTCACCATTGCCATATTGATCACTCAAGTGCTGGCTACGTCCCTGCTTGGCGGGCTGTCTCTG
 CATCATGGCATGTGAGCCAGTGCACGGCCCCCTTGATTCAGGTTGGGATCATAGCTCTAGCAGAA
 CTACTTGGATTAGTTATATGAAGTTGTCGCTTCCAACCAGAGGACTATCCAACCTCTAGGAATAG

30

40

【表3-5】

GTGAAGGGAAAGTGACGGACTGTAACTTGGAAGTCAGAAATGGAAGAATACAGTTGTCTAACGACCAAGGTCT
 TCACGACTCACAGCTGGAAGGAACAGACAAACAGTAACGTACTTCCATCCAGGAAAACATGTCACATAAATG
 ATTACTAAGTTATTCAGCAAGCAGCTGTACTTACATAATAAAAAAAATATGATGTGCTGTGAACCAAT
 TGGAATCCCATTTCATTGTTCTACTCAACTAGGGCAAACGTTCAAGGGCAACTCCAAGAATGAT
 GCTTGTAGATCCTAGTCTCTGAACACTGAGTTAAATTGATTCCGAGTGAGACTGCCAAGCACTAAC 10
 CTGAGGGTAGTTACCCAGAGATACCTATGAAAAACAGTGGTATCCAGCAAGCCTAGTAAACTCAGGTG
 CCAGCAGCTTGCCACTTCCGCTGCTAGCTGAATAACAAGACTGCCACTTCTGGTCATAGTGTAGAGAC
 TGAAGTAGAAAAACGAATGTGGTGGCAAATCCCGTGTGGCCCTCTGTGTGCTATGATATTGATGGCAC
 TGGTGTCTCATTCTGGGGTTGCCATTCACACACACCCCTTGACATACAGTGCACCCAGTTG 20
 AATACATTTTTTGACCCCTGCCCCCTGCTACTTGATTTGCGTTATGATATATATATATATATA
 ATACCTTTCTCCTCTTAAACATGGCCTGTGACACAATAGTCAGTTGAGAAAGGAGGCCAGACTTATTC
 GCAAAGCACTGTGCTCAAACCTTCAGAAAAAAAGGAAAAAAAGCTATAGTTGTAACATATGTAT
 TCCAGACCTCTGGTTAAAGGCAAAGAAAAAAATCTACAGTGTCTTCTCATGTTCTGATCGGAGG 30
 CATGACAAAGCAAGACTGAAATCTGAACGTGTCTCCTGCATGGCAACACGTGTCTCCGTCAAGGCCCTCGC
 AAGGCCGGGAGGGGGTCTACGCCTCTGTCTTTGTCATGCTGAACACTCATGCCTCCTACTG
 TATCCTGCCTCCTGCAGCCTCCCTTCCCTCCCTCTCCTCTCCTCTCCTCTCCTCTCT
 TCCTCCAAGTTGAAAGGTCAAACAAACTACCACATCCCTACCCAGTTAGAAGAAAACCACCGTCTGA
 CAGTTGTATCGCATGGAGTACTTTAGATTATTAGCACCTGTTTACCTCGTTGTGGCGTGTGTA
 TGTGCACATGTATGAAGTCGGCACATGCACCTCTGTATGGCAGAGCGTGGCATCTACAGAAGAGCAGA
 TGCCAACTTGTGCTTTAGTGAATACATTAAAAAAACCAACGGTCTTATTGAGTGAATTCTAT 40
 TTGATGCAAATATTGAGCTTTAAGACTTTAAACTAGATAATGTGCCAAGCTTCTAGGACTGCTCACC
 AGTGCCTCTGAAGAACACCAAGTACTTTCTGTTGTAAATAAGGCATATTGTATTGTGTTG
 ATCACTAATGGTTATTCTTAGTCCACTGAATGTTCCATGCTCGTATGCCAAACTTTGTC
 ATCTTCATGTGGGACCAATGGTTGTGCAACCTAAACCTATGACCTGCTGAGGCCTCTCAGA
 AACTGACCACAGTACCAAGATAGTACTTCGCAAAGAAAAGTAGGTTCCCTCCCTGGTTGTAGCTGTCG
 CCAATATTAGCGTAATTCCAAGGAGCTGAACGCCCTTATATAAAATCTGATGGCACCTGATGCTTCTAGTTC
 TGAAAATATTACACTCGGATCATGTTGATGACTAAACAAAGTTGATGAAGAGAGCAAAAAAAA
 GCAGGTGGATTGGAACAGTTCAAGGTTTTTGTGTTTGTGTTTGTGTTTTTTTAT
 TTTGTTTCTGTTCTGTTAGAAAAGTCAGGTGTTCTGTCAGGCTATCTTATAGTCATTTT

【表3-6】

TACGAACTAAAGTAGTACCTTTAATATGTAGTCACGCCCTCTGCTCGGGTTCAGTTGGTCTAA
 CCAGCTGTCATGTTCTCTATGCTGCCTGCCACTTGAGGCAGTGACTGCCCTAGACAGTCCCATCGGTGGTA
 GCCAGGGAAACGAAAGACGAACACTCAACTCTGCTCCTAATAATCAACTCTGTATGAAGGATGGCAGCAT
 TAAGAGTCCTCCTGCCTGGCAATTATTGGGCCAGTTCACCCCTTTAAATCAAACCCGAGTGGCTCCAG
 TTCTCGTCCCATCAGATTAAATTGCTAACAGTATGGGGGCACCACGCATCTGTTGTCCCACAATGCG
 10 CTTTCTCTCCAAATCCGATTCTGCTCATAGCCTCTATTCAATTTTATTATGTCTGCCCTCCA
 CTTATACAATCGTAGAGAGCAA TGCCATTGCACTTCTGCAACAGTTTGAGCCTTATGGCTGAAT
 CCCATTTCCTCTTTCAAACGTGTTGCTCCATTGCTCCCGCACGGCTGTCCGTACAGTCATCCCA
 TCCATCTGGGGCCTTTCATCTCACCCCTCGGTGCTCGTGGATCTGCTTACCTCTGTGGTT
 TTTTTTTTTTTGACTTATTCTCTCACTGGACTTAAGATTACTTCCACAGCGAAAGTGCTGCCTCC
 20 CTTTCTGCCCGCAGTGTCTGCGTACTTAGATACTACTCAGTGCTGACATTGATGGCAAAAGTTGCCT
 GCACCTAAATTCTCTTTAATAGGGTGAACTAGAGTTGGAGTTTTCTCTTTCTCTTTCTCTCTCTC
 TCT
 CTCTCTCTTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCT
 30 AAATCTCACAGGCTTGAGAATTATAAAAGGTGACAGTCACCTGAAAATCACAGGTCTGGTCTGTTAAA
 TTGTTGAGAAATATCCGATTAAAGTCTTGTGGCTGTGCTTAATAGGCTCTTCAGGACGTTAGTC
 AATAGAGTGGCTGAACCATACTTGAGTTATAAGCTAAAAACTGATGCACCCACTCTGCTATTATCGT
 TTAGTAAGAGTTCAGCTGTATATCATTGCTAGGTTATCTTGCTCTACAGTGGTATTCAAATATGCCA
 CCAGAGGATATGTGAAATATAAGCACCTGTATTGCTGTGAGAAGTGGAGGGAAAACAAAAATG
 TCTGGCAACCCCTTGCCTTTAACCGTAATTAAATTGACAGTTATTAGAGATAAGAGTTTCAAAATC
 TCTTAACTGCCACAACCCACAGAGGGCTTGTGTTGCCATCTCAGTGGTCACAGATATGATCCAAGTTA
 ACTTGAAAGAGATGAGCAGTACCCAGGAATTGCTCTGCCTTAACCTGGCTGTCTTAATTATGACTGT
 TTAATGCTGAATTTCATCCGCTAGTGTGTTGAGGGTAAAGAAAAGCCTTTAAATAAGTATTCTGT
 AAAACGGCATCGTGGATCTCTGTGCTATCACGGTGAAAGAGGGAAACATTCTTATTATTATTAA
 AGCAGAGCATTATTACAGAAAGCCATTGAGAATTAGTCCCACATCATATAAATATCCATTAACCAT
 40 TCTAAATTGTAAGAGAACTCCAGTGTGCTATGCACAAGGAACCTCTCCTGGGGCCTTTTGCATAGCA
 ATTAAGGTATGCTATTGTCAGTAGCCATTGGCAGTGATTAAAGACCAAAAGTGTGTTACAGCTGT
 GTTACCCCTAAAGGTTTTTATGTATTAAATCAATTACTGTTGAAGCTTGAATACCTGCAA
 TCTTGCCAAGATACTTTTATTAAAAAAATAACTGTGAAATATTACCCGTAAATATTATATACCTT

【表3-7】

AATAAAACATTTAAGCTA (配列番号3)

マウス CD47 アミノ酸アイソフォーム2 (XP_006521874.1)

MWPLAAALLLGSCCCGSAQLLFSNVNSIEFTSCNETVVIPCIVRNVEAQSTEEMFVKWKLNSYIFIYDG
 NKNSTTDQNFTSAKISVSDLINGIASL**KMDKRDAMVGNYTCEVTELSREGKTVIELKNRTVSWFSPNEK**
 ILIVIFPILAILFWGKFGILTLYKSSHTNKRII**LLVAGLVLTVIVVVA**ILLIPGEKPVKNASGLGLI
 VISTGIL**LLQYNVFM**TAFGMTSFTIA**LLITQVLGYVLALVGLCLC**TMACEPVHGPLLISGLGI**IALAELL**
 GLVYMKFV *ASNQRTIQPPRNR* (配列番号4)

10

マウス CD47 mRNA アイソフォーム3 (XM_006521807.1)

GCCTACACCGGGAGAGCAGGGAGGAGTTGGACTGAGGTTGGCGCTCCGAGGTCCAGGGCGAGCTTG
 GCCAGAGGGAGTAGAGAGCAGCGGGCTGCGCAGGGACGCGTCCGTGAGTTCCGGTGAGCGTGTGTCC
 CATGCTCCGTCTTCAGGCCGCCAGGACACGAAGCCGAAGAGAGCTGGCTGGAGGGACGGGGCCGT
 GAGCAGAGAGTGCAACCGCGCAGCCCCGGGACAGGCTGATTCTGGCGCTCTCCGCCGGAGCCTGCCA
 GGGCTGGTGTGAGGCTGGCGTCACGTCAACGAGCAGAGGCCAGGCCGGAGTGCGCGTGC
 GCGAGCAGCAGCGCGCGCACCCCCGGCAGCCTGGCGGCCCTGCCTGTCAGTGC
 GCTGCTGGTCGGTCTTCCCTGAAGGCAGCAGGGAGGCGGGCTGCTCCAGACACCTGC
 GGGCGAGATGTGGCCCTGGCGGGCGTGTGCTGGCTCTGCTGCTGCCAG
 CTCAACTACTGTTAGTAACGTCAACTCCATAGAGTTCACTTCATGCAATGAAACTGTGGTCATCCCTG
 CATCGTCCGTAAATGTGGAGGCCAAAGCACCGAAGAAATGTTGTGAAGTGGAAAGTTGAACAAATCGTAT
 ATTTCATCTATGAAATAAAATAGCACTACTACAGATCAAACATTACAGTCAG
 TCTCAGACTTAATCAATGGCATTGCCTCTTGAAATGGATAAGCGCGATGCCATGG
 TTGCGAAGTGACAGAGTTATCCAGAGAAGGCAAAACAGTTAGAGCTGAAA
 ACTGACCAAGGATCAGCCTGTTACGAGGAGGAGAAAGGAGGTGCAAATTAG
 CAAATGAAAGATCCTCATTGTTATTTCCAATTGGCTAACTCCTGTTCTGG
 TTTAACACTCAAATATAATCCAGCCATACGAATAAGAGAATCATTCTGCT
 CTCACAGTCATCGTGGTGGAGCCATCCTCTCATCCCAGGAGAAAGCC
 GACTTGGCCTCATTGTAATCTACGGGATATTAAACTACTTCAGTACA
 TGGAATGACCTCTTCACCATTGCCATTGATCACTCAAGTGCTGG
 TACGTCCCTGCTTGGCGGG

20

30

40

【表3-8】

CTGTGTCTCTGCATCATGGCATGTGAGCCAGTGCACGGCCCCCTTGATTCAGGTTGGGATCATAG
 CTCTAGCAGAACTACTTGGATTAGTTATATGAAGTTGTCGCTCCAACCAGAGGACTATCCAACCTCC
 TAGGAAAGCTGTAGAGGAACCCCTAACGAATAGGTGAAGGGAAGTGACGGACTGTAACTTGGAAGTCAG
 AAATGGAAGAATACAGTTGCTAACGACCCAGTCTCACAGCTGGAAAGAACAGACAACAGTAA
 CTGACTTCCATCCAGGAAAACATGTCACATAAATGATTACTAACGTTATATTCAAAGCAGCTGTACTTTAC 10
 ATAATAAAAAAAATATGATGTGCTGTGAACCAATTGGAATCCCATTTCATTGTTCTACTCAACTAG
 GGGCAAACGTTCAAGGGCAACTCCAAGAATGATGCTGTTAGATCCTAGAGTCTCTGAACACTGAGTT
 AAATTGATTCCGAGTGAGACTGCCAAGCACTAACCTGAGGGTTAGTTACCCAGAGATACCTATGAAAAAC
 AGTGGTATCCAGCAAGCCTAGTAAACTCAGGTTGCCAGCAGCTTGCACCTCCGCTGCTAGCTGAATAA
 CAAGACTGCCACTTCTGGTCATAGTGATAGAGACTGAAGTAGAAAAACGAATGTGGTGGCAAATCCCG
 TGTGGCCCTCTGTGTGCTATGATATTGATGGCACTGGTGTCTCATTCTGGGGTTGCCATCATTACA
 CACACCCCTTGACATACAGTCACCCAGTTGAATAACATTTCCTGCACCTGTCCCCTGCTAC 20
 TTTGATTGCGTTATGATATATATATATATAACCTTTCTCCTTTAAACATGGTCTGTGACA
 CAATAGTCAGTTGCAGAAAGGAGCCAGACTTATCGCAAAGCACTGTGCTCAAACCTTCAGAAAAAAAGG
 AAAAAAAAGCTATAGTTGTAACATATGTATTCCAGACCTCTGGTTAAAGGCAAAGAAAAAAAT
 CTACAGTGTCTTCATGTTCTGATCGGAGGCATGACAAAGCAAGACTGAAATCTGAACGTGTCTC
 CTGCATGGCAACACGTCTCCGTCAAGGCCCTCGCAAGGCCGGGAGGGGTTCTACGCCTTTGTCT 30
 TTGTTGCATGCTGAACACTCATGCCCTCCTACTGTATCCTGCCTCTGCAGCCTCCCTTCCTCCT
 CTTCCCTTCCTCCTTCCTCCCTCTCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCT
 TTCCCTACCCAGTTAGAAGAAAACCACCGCCTGACAGTTGATCGCATGGAGTACTTTAGATTATTAG
 CACCTGTTTACCTCGTTGTTGGCGTGGTATGTGACATGTATGAAGTCGGCACATGCACCTCTG
 TATGGGCAGAGCGTGGCATCTACAGAAGAGCAGATGCCACTTGTGCTTTAGTGAATACTTAA 40
 AAAAAACCAACGGTCCTTATTGAGTGAATTCTATTGATGCAAATATTGAGCTTTAAGACTTTAAAA
 CTAGATAATGTGCCAAGCTTCTAGGACTGCTCACCAAGTGCCTCTGAAGAACACCAGTACTTTCTGT
 TTGTTGTAATAAAGGCATATTGATTTGTTGATCACTAATGGTTATTCTCTTAGTCCACTGAATG
 TTTCCATGTGCCTCTCGTATGCCAAACTTTGTCATCTTCATGTGGGACCAATGGTTGTCTGTGGC
 AACCTAAACCTATGACCTGCTGAGGCCTCTCAGAAAAGTACCCAGTACCAAGATAGTACTTCGCAAAG
 AAAAGTAGGTTCCCTCCCTGGTTTAGCTGCGCAATATTAGCGTAATTCCAAGGAGCTGAACGCCT
 TATATAAAATCTGATGGCACCTGATGCTTTAGTTCTGAAAATATTACACTCGGATCATGTTGATGAC

【表 3 - 9】

TTAAACAAAGTTTGTAGAAGAGAGCAAAAAAAAGCAGGTGGATTGGAACAGTTTCAGGGTTTTTG
TTTTTGTGTTTGTGTTTTTTTATTTGTTCTGTTCTGTTAGAAAAGTCAGGTG
TTCTCTGTCAGGCTATCTTATAGTCATTTTTACGAACAAAGTAGTACCTTTAATATGTAGTCAA
CGCCCCCTGCTGGGGTTCAGTTGGTCTAACAGCTGCATGTTCTCTATGCTGCCACTTGA
GGCACTGAGTGCCCTAGACAGTCCCCTCGGTGGTAGCCAGGGAAACGAAAGACGAACCTCAACTCTGCTCC
TAATAATCAACTCTGTATGAAGGAAGCAGCTTAAGAGTCCTCCTGCCTGGCATTATTGGGCCAGTT
CACCCCTTTAAATCAAACCCGAGTGGCTCCAGTTCTCGTCCCCTCAGATTAAATTGCTAACAGTATG
GGGGCACCACGCATCTGTTGTCACATGCCTTCTCTCCAAATCCGATTCTGCTGTCTAG
CCTCTATTCAATTTTATTATTGTCTGCCCTCCACTTATACAATCGTAGAGAGCAATGCCATTGTCACT
TTCTGCAACAGTTTTGAGCCTTATGGCTGAATCCCATTTCCTCTCTTCAAACAGTTGCTCCATT
GCTCCTCCCGCACGGCTGCCGTACAGTCATCCATCTGGGGCCTTCTCATCTCACCCCTCCT
GGTGCTTCGTGGATCTCTGCTTACCTCTGGTTTTTTTTTACTTATTCTCTACTGGAC
TTAAGATTACTCCACAGCGAAAGTGCTGCCCTTCTGCCCGAGTGTCTGCGTACTTAGATAC
TACTCAGTGCTGACATTGATGGCAAAAGTTGCCCTGCACTTAAATTCTCTTTAATAGGGTGAACAGA
GTTGGAGTTTTCTCTTTCT
TCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT
CTT
GTTCACCTGAAAATCACAGGTCTGGCTGTTAAATTGTTGAGAAATATCCGATTAAAGTCTGTGGCTG
TGTCTTAATAGGCTCTTCTCAGGACGTTGAGTCAATAGAGTGGCTGAACCATACTGAGTTATAAGC
TCAAAAATGATGCACCCACTCTGCTATTATCGTGTAGTAAGAGTTCAAGCTGTATATCATTGCTAGGTT
TATCTTGTCTACAGGGTATTCAAATATGCCACCAAGAGGATATGTAAATATAAGCACCTGTATTG
CCTGTTGAGAACTGGAGGGAAACAAAAATGTCGGCAACCCTTGCCTTTAACCGTAATTAAATT
GACAGTTATTAGAGATAAGAGTTCAAAATCTCTTAACGCCACAGAGGGCTTGTTCTGTT
CCATCTTCAGTGGCTCACAGATATGATCCAAGTTAACTGAAAGAGATGAGCAGTACCCAGGAAATTGTCC
TGCCTTAACTCTGGCTGCCTTAATTGACTGTTAATGCTGAATTTCATCCGCTAGTGTGAGG
GTAAAGAAAAGCCTTTAAATAAGTATTCTGAAAACGGCATCGGTGGATCTCTGTGCTATCA
CGGGTGAAGAGGGAAACATTCTTATTAAAGCAGAGCATTATTACAGAAAGCCATTGTTGAGAA
TTAGTTCCCACATCATATAATATCCATTAACTCTAAATTGTAAGAGAACTCCAGTGTGCTATGCAC
AAGGAACCTCCTGGGGCCTTTTGCATAGCAATTAAAGGTATGCTATTGTCAGTAGCCATTGTT
TTTTTG

【表3-10】

CA GTGATTAAAGACCAAGTTGTTACAGCTGTGTTACCCCTAAAGGTTTTTTATGTATTAATC
AATTATCACTGTTGAAGCTTGAATACCTGCAATCTTCCAAGATACTTTTATTAAAAAAATAAC
TGTGTAAATATTACCCGTAAATTATATATACTTAATAAAACATTTAAGCTA (配列番号5)

マウス CD47 アミノ酸アイソフォーム 3 (XP_006521870.1)

1] MWPLAAALLGSCCCGSAQLLFSNVNSIEFTSCNETVVIPCIVRNVEAQSTEEMFVKWKLNKSYIFY 10
DGNKNSTTDQNFTSAKISVSDLINGIASLKMDKRDAMVGNYTCEVTELSREGKTVIELKNRTAFNTDQG
SACSYEEEKGGCKLVSWFSPNEKILIVIFPILAILLFWGKFGILTLKYKSHTNKRIILLLVAGLVLTVI
VVVGAIILLIPGEKPVKNASGLGLIVISTGILILLQYNVFMTAFGMSFTIAILITQVLGYVLALVGLCLCI
MACEPVHGPLLISGLGIIALAELLGLVYMKFVASNQRTIQPPRKAVEEPLNE (配列番号6)

マウス CD47 mRNA アイソフォーム 4 (XM_006521808.1)

GCCTACACCGGGAGAGCAGGGAGGAGGACTGGACTGAGGTGGCCGCTCCGAGGTCCAGGGCAGCTTG
GCCAGAGGGAGTAGAGAGCAGCGGGCTCGCAGGGACCGTGGCTGAGTTCCGGTGAGCGTGTGTCC
CATGCTCCGTCTTCAGGCCGCCAGGACACGAAGCCGAAGAGAGCTGGCTGGAGGGACGGGGCCGT
GAGCAGAGAGTGCAACCCCGCAGCCCCGGGACAGGCTGATTCTGGCGCTCTGCCGGAGCCTGCCA
GGGCTGGGTGTAGGGCTGGCGTCACGTCAACGAGCAGAGCGGCCAGGCGGGCGAGTGCCTGCGCG
GGCGCGAGCACGCCGCGCAGCCCTGGCGCCGCTCCTGCCTGCACTGCTGCC 30
GCTGCTGGTCGGTCGTTCCCTGAAGGCAGCAGCGAGGCGGGCTGCTCCAGACACCTGCCGGCGA
CCCCCGCGCGCGAGATGTGCCCTGGCGCCGCTGTGCTGGCTCTGCTGCCGGTCAG
CTCAACTACTGTTAGTAACGTCAACTCCATAGAGTTCACTTCATGCAATGAAACTGTGGTCATCCCTG
CATCGTCCGTAATGTGGAGGCGAAAGCACCGAAGAAATGTTGTGAAGTGAAGTTGAACAAATCGTAT
ATTTCATCTATGATGAAATAAAATAGCACTACTACAGATCAAAACTTACCAAGTGCAAAATCTCAG
TCTCAGACTTAATCAATGGCATTGCCCTTTGAAATGGATAAGCGCGATGCCATGGGGAAACTACAC
TTGCGAAGTGACAGAGTTATCCAGAGAAGGAAACAGTTAGAGCTGAAAAACCGCACGGTTCTGG 40
TTTCTCCAAATGAAAAGATCCTCATTGTTATTTCCAATTGGCTACTCCTGCTGGGGAAAGT
TTGGTATTAAACACTCAAATATAATCCAGCCATACGAATAAGAGAATCATTCTGCTGCTCGTGC
GCTGGTGCTCACAGTCATCGTGGTTGGAGCCATCCTCTCATCCCAGGAGAAAAGCCGTGAAGAAT
GCTTCTGGACTTGGCCTATTGTAATCTACGGGATATTAATACTACTTCAGTACAATGTGTTATGA

【表3-11】

CAGCTTTGGAATGACCTTTCACCATTGCCATATTGATCACTCAAGTGCTGGCTACGTCTGCTT
 GGTGGGCTGTCTGCATCATGGCATGTGAGCCAGTGCACGGCCCCCTTGATTCAGGTTGGG
 ATCATAGCTCTAGCAGAACTACTTGGATTAGTTATATGAAGTTGTCGCTCCAACCAGAGGACTATCC
 AACCTCCTAGGAAAGCTGTAGAGGAACCCCTAACGCATTAAAGAGTCAAAGGAATGATGAATGACGA
 ATAGGTGAAGGGAAGTGACGGACTGTAACCTGGAAGTCAGAAATGGAAGAACAGTTGCTAAGCACCAG
 GTCTCACGACTCACAGCTGGAAGGAACAGAACAGTAACACTGACTTCCATCCAGGAAAACATGTCACATA
 AATGATTACTAAGTTATATTCAAAGCAGCTGTACTTACATAATAAAAAAAATATGATGTGCTGTGTAAC
 CAATTGGAATCCCATTTCATTGTTCTACTCAACTAGGGCAACGTTCAGGGCAACTCCAAGAA
 TGATGCTTGTAGATCCTAGACTCTGAACACTGAGTTAAATTGATTCCGAGTGAGACTGCCAAC
 TAACCTGAGGGTTAGTTACCCAGAGATACTATGAAAAACAGTGGTATCCAGCAAGCCTAGTAAACTCAG
 GTGCCAGCAGCTTGCCTCCGCTGCTAGCTGAATAACAAGACTGCCACTCTGGTCATAGTGTAG
 AGACTGAAGTAGAAAAACGAATGTGGTGGCAAATCCCGTGGCCCTCTGTGTGCTATGATATTGATG
 GCACTGGTGTCTCATTCTGGGGTTGCCATCATTACACACACCCCCTTGACATACTGACAGCAGC
 TTTGAATACATTTTTGCACCCGTCCGTTCTGCTACTTGATTGCGTTATGATATATATATATA
 TATAATACCTTTCTCCTTTAAACATGGCCTGTGACACAATAGTCAGTTGAGAAAGGAGCCAGACTT
 ATTCGCAAAGCACTGTGCTCAAACCTTCAGAAAAAAAGGAAAAAAAGCTATAGTTGTAACATAT
 GTATTCCAGACCTCTGGTTAAAGGCAAAGGAAAAAAAGCTACAGTGTCTCTCATGTTCTGATCG
 GAGGCATGACAAAGCAAGACTGAAATCTGAACCTGTGCTCCTGCATGGCAACACGTGCTCCGTAGGCC
 TCGCAAGGCCGGGGAGGGGTTCTACGCCCTTGCTCTTGTGATGTAACACTCATGCCCTCCT
 ACTGTATCCTGCCCTGCAGCCCTCTGCCCTCTGCCCTCTGCCCTCTGCCCTCTGCCCTCCT
 CTCTGCCCAAGTTGAAAGGTCAAACAAACTACCACATTCCCTACCCAGTTAGAAGAAAACCACCGTC
 CTGACAGTTGATCGCATGGAGTACTTTAGATTAGCACCTGTTTACCTCGTTGTGGCGTGT
 TGTATGTGCACATGTATGAAGTCGGCACATGCACCTCTGTATGGCAGAGCGTGGCATCTACAGAAGAG
 CAGATGCCAACTTGTGCTTTAGTGAATACATTAAAAAAACCAACGGCCTTATTGAGTGGATT
 CTATTGATGCAAATATTGAGCTTTAAGACTTAAACTAGATAATGTGCCAAGCTTTAGGACTGCT
 CACCAAGGCCCTCTGAAGAACACCAAGTACTTTCTGTTGTGTAATAAAGGCATATTGTATTGT
 TTGCATCACTAATGGTTATTCTTCTAGTCCACTGAATGTTCCATGTGCCCTCGTATGCCAAACTTT
 TGTGATCTTCATGTGGGACCAATGGTTGTGTCAGGCAAACCTAAACCTATGACCTGCTGAGGCCTCT
 CAGAAAAGTACCAAGTACCAAGATAGTACTTCGCAAAGAAAAGTAGGTTCCCTCCCTGGTTTAGCT

10

20

30

40

【表 3 - 1 2】

GTCGCCAATATTAGCGTAATTCCAAGGAGCTGAACGCCCTTATATAAATCTGATGGCACCTGATGCTTTA
GTTCTGAAAATATTACACTCGGATCATGTTGATGACTAAACAAAGTTGATGAAGAGAGCAAAAA
AAAAGCAGGTGGATTGGAACAGTTCAGGGTTTTGTTTGTGTTTGTGTTTGTGTTTTTTTTTT
TTATTTGTTTCTGTTCTGTTAGAAAAGTCAGGTGTTCTGTCAGGCTATCTTATAGTCATT
TTTTACGAACAAAGTAGTACCTTTAATATGTAGTCACGCCCTCTGCTGGGTTCAGTTGGTC
TTAACCGAGCTGTCATGTTCTATGCTGCCACTTGAGGCAGTGACTGCCCTAGACAGTCCCCTCGGT
GGTAGCCAGGGAAACGAAAGACGAACCTCAACTCTTGCTCCTAATAATCAACTCTGTATGAAGGATGGCA
GCATTAAGAGTCCTCCTGCCTGGCATTATTGGGCCAGTTCACCCCTTTAAATCAAACCCGAGTGGCTC
CCAGTTCTCGTCCCATCAGATTAAATTGCTAACAGTATGGGGGCACCACGCATCTGTTGTCCCACAA
TGCCTTTCTCCAAATCCGATTCTGCTGTCATGCCCTATTCAATTTTATTATTGTCTGCC
TCCACTTACAATCGTAGAGAGCAATGCCATTGCACTTCTGCAACAGTTTGAGCCTTATGGCT
GAATCCCATTTCCTCTTCAAACGTGTTGCTCCATTGCTCCTCCGCACGGCTGTCGTACAGTCAT
CCCATCCATCTGGGGCCTCTTCATCTCACCCCTCCTGGCTCGTGGATCTCTGCTTACCTCTGTG
GGTTTTTTTTTTTGACTTATTCTCTACTGGACTTAAGATTACTCCACAGCGAAAGTGC
CTCCCTTCTGCCGCAGTGTCTGCGTACTTAGATACTACTCAGTGCTGACATTGATGGCAAAAGTT
GCCTGCACTAAATTCTCTTTAATAGGGTGAACTAGAGTTGGAGTTTTCTCTTTCTCTTT
TCT
CT
TGACAAATCTCACAGGCTTGAGAATTATAAAAGGTGACAGTCACCTGAAAATCACAGGTCTGGTCTGTT
TAAATTGTTGAGAAATATCCGATTAAAGTCTGTGGCTGTGCTTAATAGGCTCTTCAAGGACGTTG
AGTCAATAGAGTGGCTGACCACACTTGAGTTATAAGCTAAAAACTGATGCACCCACTCTGCTATT
CGTGTAGTAAGAGTTCAGCTGTATATCATTGTCAGGTTATCTGCTCCTACAGTGGTATTCAAATATG
GCCACCAGAGGATATGTAAATATAAGCACCTGTATTGCCCTGTTGAGAAGTGGAGGGAAAACAAAA
AATGTCTGGCAACCCTTGCTTTAACCGTAATTAAATTGACAGTTATTAGAGATAAGAGTTCAAA
AACTCTTAACGCCACAACCCACAGAGGGCTTGTGTTGCCATCTCAGTGGCTCACAGATATGATCCAA
GTTAACCTGAAAGAGATGAGCAGTACCCAGGAATTGCTCTGCCCTTAACCTGGCTGCTTAATT
CTGTTAATGCTGAATTTCATCCGCTAGTGTGTTGAGGGTAAAGAAAAGCCTTTAAATAAGTATT
CTGTAACCGGCATCGGTGGATCTCTGTGCTATCACGGGTGAAAGAGGGAAACATTCTTATT
ATTAAGCAGAGCATTATTACAGAAAGCCATTGTTGAGAATTAGTCCCACATCATATAAATATCCATTAA

【表3-13】

CCATTCTAAATTGTAAGAGAACTCCAGTGGCTATGCACAAGGAACCTCCTGGGGCCTTTGCAT
 AGCAATTAAAGGTATGCTATTGTCAGTAGCCATTTCAGTAAAGACCAAAGTTGTTACAG
 CTGTGTTACCCCTAAAGGTTTTATGTATTAAATCAATTACTGTTGAAGCTTGAATACCT
 GCAATCTTGCCAAGATACTTTTATTAAAAAAATAACTGTGAAATATTACCTGTAATATTATAT
 ACTTAATAAAACATTTAAGCTA (配列番号 7)

10

マウス CD47 アミノ酸アイソフォーム 4 (XP_006521871. 1)

MWPLAAALLLGSCCGSAQLLFSNVNSIEFTSCNETVVIPCIVRNVEAQSTEEMFVKWKLNKSYIFIYDG
 NKNSTTDQNFTSAKISVSDLINGIASLKM**D**KRDAMVGNYTCEVTELSREGKTVIELKNRTVSWFSPNEK
 ILIVIFPILAILFWGKFGILTLYKSSHTNKRI ILLVAGLVITVIVVVGAILLIPGEKPVKNASGLGLI
 VISTGILILLQYNVFMTAFGMTSFTIAILITQVLGYVLALVGLCLCIMACEPVHGPLLISGLGI IALAELL
 GLVYMKFVASNQRTI**QPPRK**AVEEPLNAFKESKGMMNDE (配列番号 8)

20

ヒト CD47 mRNA アイソフォーム 1 (XM_005247909. 1)

AGTGGGAGCGCGCGTGC~~GC~~CGCGCCGTGCAGCCTGGCAGTGGCCTGCCTGTGACGCCGGCGCGTC
 GGTCCCTGCCTGTAACGGCGGCGGCGCTGCTGCTCCGGACACCTGCGGCGGCGGCGACCCCGCGCG
GCGCGGAGATGTGGCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCTGGCTGGCGTGCGGATCAGCTAGCTACT
ATTTAATAAAACAAATCTGTAGAATTCACGTTTGTAATGACACTGTCGTCATTCCATGCTTGTTACT
AATATGGAGGCACAAACACTACTGAAGTATACGTAAAGTGGAAATTTAAAGGAAGAGATATTTACACCT
TTGATGGAGCTCTAAACAAGTCCACTGTCCCCACTGACTTAGTAGTGCAAAATTGAAGTCTCACAATT
ACTAAAAGGAGATGCCCTTTGAAGATGGATAAGAGTGATGCTGTCTCACACACAGGAAACTACACTTGT
GAAGTAACAGAATTAACCAGAGAAGGTGAAACGATCATCGAGCTAAATCGTGTTTCATGGTTT
CTCCAAATGAAATATTCTTATTGTTATTTCCCAATTTTGCTATACTCCTGTTCTGGGACAGTTGG
TATTAACACTTAAATAGATCCGGTGGTATGGATGAGAAACAATTGCTTACTTGTTGCTGGACTA
GTGATCACTGTCATTGTCATTGTTGGAGCCATTCTTCGTCCCAGGTGAATATTCAAAAGAATGCTA
CTGGCCTTGGTTAATTGTGACTTCTACAGGGATATTAAATTACTTCACTACTATGTTAGTAGC
GATTGGATTAACCTCCTCGTCATTGCCATTGGTTATTCAGGGTGATAGCCTATATCCTCGTGTGGTT
GGACTGAGTCTCTGTATTGCGGCGTGTATACCAATGCATGGCCCTTCTGATTCCAGGTTGAGTATCT
TAGCTCTAGCACAATTACTGGACTAGTTTATATGAAATTGTTGGAAAACTGAAGTGATGGACT

30

40

【表3-14】

CCGATTGGAGAGTAGTAAGACGTAAAGGAATACTTGTGTTAAGCACCAGGCCTGATGATTCACT
 GTTGGGGAGAAGAAACAAGAAAAGTAACGGTGTACCTATGAGACCCCTACGTGATTGTTAGTTAAGTT
 TTTATTCAAAGCAGCTGAATTAGTTAATAAAATAATTGATCTATGTTGTTGCCAATTGAGATCCA
 GTTTTTGTTGTTATTTAATCAATTAGGGCAATAGTAAATGGACAATTCCAAGAATGATGCCCTTC
 AGGTCCCTAGGGCCTCTGGCCTAGGTAAACAGTTAAATTGGTCAGGGTGATAACTACTAGCACTGCC
 CTGGTGATTACCCAGAGATATCTATGAAAACCAGTGGCTCCATCAAACCTTGCAACTCAGGTCACAG
 CAGCTTGGGCAGTTATGGCAGTATGGCATTAGCTGAGAGGTGCTGCCACTTCTGGGTCATGGAATAAT
 AAATTAAAGTACAGGCAGGAATTGGTGGAGCATCTGTATGATCTCGTATGATGTGATATTGATGGAG
 ATAGTGGCCTCATTCTGGGGGTGCCATTCCCACATTCCCCCTCAACAAACAGTGTAAACAGGTCCTTC
 CCAGATTAGGTACTTTATTGATGGATATGTTCTTATTACACATAACCCCTGAAACCTGTCTT
 GTCCTCCTGTTACTTGCTCTGCTGTACAAGATGTAGCACCTTCTCCTCTTGAACATGGCTAGTGAC
 ACGGTAGCACCAGTTGCAGGAAGGAGCCAGACTTGTCTCAGAGCACTGTGTTCACACTTTCAGCAAAAA
 TAGCTATGGTTGTAACATATGATTCCCTCCTGATTGAAGGCAAAACTACAGTGTCTTC
 CTTTCTGATCTGGGCATGAAAAAGCAAGATTGAACATGAGTCTCCTGCATGGCAACAAAA
 TGTGTGTCACCATCAGGCCAACAGGCCAGCCCTGAATGGGATTATTACTGTTGATCTATGTCATG
 ATAAACATTCACTACCTCCTCCTGAGTCCTGCCTCGTACTCCCCTCCCTATGATTGAAAGTAAACA
 AAACCCACATTCCTATCCTGGTTAGAAGAAATTAAATGTTCTGACAGTTGATCGCCTGGAGTACTTT
 AGACTTTAGCATTGTTTACCTGTTGGATGTTGTTGATGTCACGTATGAGATAGGCAC
 ATGCATCTCTGATGGACAAAGGTGGGTACCTACAGGAGAGCAAAGGTTAATTGCTTTAGTAA
 AACATTAAATACAAAGTTCTTATTGGGTGGAATTATATTGATGCAAATATTGATCACTAAACATT
 TAAAACCTCTAGTAATTGCCACGCCCTTGAETGCTCACCAATACCCCTGAAAAATACGTAAATTCTC
 TGTTGTTGTAATAAGATATTGATTTGATGTTGCTTAATAATAGTTATTCTTAGTCATCAGATGTC
 CCGTGTGCCTCTTATGCCAATTGATTGCTATTGATGTTGGACCAAGTAGTTGCCATGGCAAA
 CCTAAATTATGACCTGCTGAGGCCTCTCAGAAAATGAGCATACTAGCAAGACAGCTTCTGAAAAAA
 AAAATATGATACACAAATATACGTATATCTATATACGTATGTTACACACATGTATATTCTC
 TTGATTGTTAGCTGTCAAAATAAAACATATATAGAGGGAGCTGATTCCCTTATACAAATCTGATGGC
 CCCTGCAGCACTTTCTGAAATATTACATTGCTAACCTAGTTGTTACTTAAACATCAGTT
 TTGATGAAAGGAGGGAAAAGCAGATGGACTGAAAAAGATCCAAGCTCCTATTAGAAAAGGTATGAAAC
 TTTATAGTAAATTTTATAAAACTAAAGTTGACCTTTAATATGTTAGTAAACTCTCATTATTGGGGT

10

20

30

40

【表3-15】

TCGCTCTGGATCTCATCCATCATTGTTCTCTTAATGCTGCCTGCCTTGAGGCATTCACTGCCCT
 AGACAATGCCACCAGAGATAGTGGGGAAATGCCAGATGAAACCAACTCTGCTCTCACTAGTTGTCAGCT
 TCTCTGGATAAGTGACCACAGAAGCAGGAGCCTCCTGCTGGCATCATGGCCAGTCCCTCTCTTA
 AATCAGATTGTAATGGCTCCAAATTCCATCACATCACATTAAATTGCAGACAGTGTGACATCAT
 GTATCTGTTGTCCCATAATATGCTTTACTCCCTGATCCCAGTTCTGCTGTTGACTCTCCATTCA
 TTTTATTATTGTGTTCTCACAGTGACACCATTGTCCTTCTGCAACAACCTTCCAGCTACTTTG
 CCAAATTCTATTGTCCTCCTCAAAACATTCCCTTGCAAGTCCTCTCATCTGTGAGCTGCTTT
 TTGTCCTTAACCTACCATTCTATAGTACTTATGCATCTGCTTAGTCTATTAGTTTTGGCCTTG
 CTCTCTCCTGATTAAAATTCCCTCTATAGCTAGAGCTTCTTCATTCTCTTCAGT
 GTTTGCAACATCAGAAGCTAGGTACATAAGTAAATGATTGAGAGTTGGCTGTATTAGATTAC
 TTTTAATAGGGTGAGCTTGAGAGTTTCTTCTGTTTTTTTTGTTTTTTTTTTTT
 TTTTTTTTTGACTAATTACATGCTCAAAACCTCAAAGGTGATTATTTCTCTGGAAACTCC
 AGGTCCATTCTGTTAAATCCCTAAGAATGTCAGAATTAAACAGGGCTATCCGTAATTGGAAATAT
 TTCTTTTCAGGATGCTATAGTCATTAGTAAGTGACCACAAATTGTTATTGCACTAACAAAGCTCA
 AACACGATAAGTTACTCCTCCATCTCAGTAATAAAATTAAAGCTGTAATCACCTCTAGGTTCTTT
 GTCTTAAATGGTATTCAAATGGGATCTGTTGTATGTATGGAAACACATACTCCTTAATTACCT
 GTGTTGGAAACTGGAGAAATGATTGTCGGCAACCGTTATTTTTATTGTATTGTTGGTGGAGGGA
 TTTTTTATAAACAGTTACTGTGTCATATTAAAATTACTAACGCCATCACCTGCTGGGTCTTT
 GTTAGGTCAATTTCAGTGACTAATAGGGATAATCCAGGTAACTTGAAGAGATGAGCAGTGAGTGAC
 CAGTTTTCTGCCTTAGCTTGCAGTTCTTAATTAAAGATCATTGAAGACCAGCTTCTCATAAATTCT
 CTTTTGAAAAAAAGAAAGCATTGACTAAGCTCCTCTGTAAGACAAACATCTTAAATCTTAAAGTGTG
 TTATCATGACTGGTGAGAGAAGAAAACATTGTTTTATTAAATGGAGCATTATTACAAAAGCCATTG
 TTGAGAATTAGATCCCACATCGTATAAATATCTATTAAACCATTCTAAATAAGAGAACTCCAGTGCT
 TGTGCAAGATCCTCTTGAGCTTTGCATAGCAATTAAAGGTGTGCTATTGTCAGTAGCCATT
 TTGCAAGTGATTGAAGACCAAGTTGTTTACAGCTGTGTTACCGTTAAAGGTTTTTTATATGTAT
 TAAATCAATTACTGTTAAAGCTTGAATATCTGCAATCTTGCCAAGGTACTTTTATTAAAAA
 AAAACATAACTTGAAATATTACCTGTAATATTATATACTTAATAAAACATTAAAGCTA (配列
 番号9)

10

20

30

40

【表3-16】

ヒトCD47アミノ酸アイソフォーム1(XP_005247966.1)

MWPLVAALLLGSACCGSAQLLFNKTGSVEFTFCNDTVVIPCFVTNMEAQNTTEVYVKWKFGRDIYTFDG
 ALNKSTVPTDFSSAKIEVSQLLKGDASLKMDSAVSHTGNYTCEVTELREGETIIELKYRVSFSPN
 ENILIVIFPIFAILLFWGQFGIKTLKYRSGGMDEKTIALLVAGLVTIVIVGAILFVPGEYSLKNATGLG
 LIVTSTGILILLHYYVFSTAIGLTSFVIAILVIQVIAYILAVVGLSLCIAACIPMHGPLLISGLSILALAQ
 LLGLVYMKFVE

10

(配列番号10)

ヒトCD47 mRNAアイソフォーム2(NM_198793.2)

GGGGAGCAGCGGGGGAGCGGGCGGAAGCAGTGGAGCGCCGTGCCGCCGTGCAGCCTGGCAGT
 GGGTCTGCCTGTGACCGCGGCCGGTGGCCTGCCTGTAACGGCGGCCGGCTGCTGCTCCAGACA
 CCTGCGCGGCCGGCGACCCCGCGCGGGAGATGTGGCCCTGGTAGCGCGCTGGCTGG 20
CTCGCGTGCTCGGGATCAGCTCAGCTACTATTAATAAAACAAATCTGTAGAATT
CACACTGTCGTATTCCATGCTTGTACTAATATGGAGGCACAAACACTACTGAAGTATA
CGTAAAGTAAAGGAAGAGATATTACACCTTGATGGAGCTCTAAACAAGTCCACTG
TCCCCACTGACTGACTGACTGACTGACTGACTGACTGACTGACTGACTGACTGACTG
AGCTAAATATCGTGTGTTCATGGTTCTCAAATGAAATATTCTTATTGTTATTC
CCAAATTCTGCTTACTTGTGCTGGACTAGTGATCACTGTCATTGTCATTGTCATT
GCTGCTCACACACAGGAAACTACACTTGTGAAGTAACAGAATTACCAAGAGAAGGT
GAAACGATCATCGAGCTAAATATCGTGTGTTCATGGTTCTCAAATGAAATATTCTTATTGTTATTC
TGCTATACTCCTGTTCTGGGGACAGTTGGTATTAAACACTTAAATATAGATCCGGTGGTATGGATGAG
AAAACAATTGCTTACTTGTGCTGGACTAGTGATCACTGTCATTGTCATTGTCATTGTCATT
TCCCAGGTGAATATTCAATTAAAGAATGCTACTGGCCTTGGTTAATTGTGACTTCTACAGGGATATTAAAT
ATTACTCACTACTATGTGTTAGTACAGCGATTGGATTAAACCTCCCTCGCATTGCCATTGTTATT
CAGGTGATAGCCTATATCCTCGCTGGTGGACTGAGTCTGTATTGCGCGTGTACCAATGCATG
GCCCTCTCTGATTCAGGTTGAGTATCTAGCTCTAGCACAATTACTGGACTAGTTATATGAAATT
TGTGGCTTCCAATCAGAAGACTATACAACCTCCTAGGAATAACTGAAGTGAAGTGTGGACTCCGATTG
GAGAGTAGTAAGACGTGAAAGGAATACACTTGTGTTAACGACCATGGCCTGATGATTCACTGTTGGGA
GAAGAAACAAGAAAAGTAACCTGGTGCACCTATGAGACCCCTACGTGATTGTTAGTTAAGTTTATTCA
AAGCAGCTGTAATTAGTTAATAAAATAATTATGATCTATGTTGTTGCCAATTGAGATCCAGTTTGTG
TTGTTATTTAATCAATTAGGGCAATAGTAGAATGGACAATTCCAAGAATGATGCCCTTCAGGTCTA

20

30

40

【表3-17】

GGGCCTCTGGCCTCTAGGTAAACCAAGTTAAATTGGTCAGGGTATAACTACTAGCACTGCCCTGGTAT
 TACCCAGAGATATCTATGAAAACCAGTGGCTTCCATCAAACCTTGCAACTCAGGTTCACAGCAGCTTG
 GGCAGTTATGGCAGTATGGCATTAGCTGAGAGGTGTCGCCACTCTGGTCAATGGAATAATAATTAAAG
 TACAGGCAGGAATTGGTGGAGCATCTGTATGATCTCGTATGATGTGATATTGATGGAGATAGTGGT
 CCTCATTCTGGGGTGCATTCCACATTCCCCCTCAACAAACAGTGTAAACAGGTCCCTCCAGATT 10
 AGGGTACTTTATTGATGGATATGTTCCCTTATTACATAACCCCTGAAACCCGTCTTCCTCCT
 GTTACTTGCTCTGCTGTACAAGATGTAGCACCTTCTCCTCTTGAACATGGCTAGTGACACGGTAGC
 ACCAGTTGCAGGAAGGAGCCAGACTGTTCTCAGAGCACTGTGTCACACTTCAGCAAAATAGCTATG
 GTTGTAAACATATGTATTCCCTCCTGATTGAAGGCAAAATCTACAGTGTTCCTCACTTCTTCTG
 ATCTGGGCATGAAAAAGCAAGATTGAAATTGAACTATGAGTCTCCTGCATGGCAACAAATGTGTGTC
 ACCATCAGGCCAACAGGCCAGCCCTGAATGGGATTATTACTGTTGTATCTATGTTGCATGATAACAT
 TCATCACCTCCTCCTGACTCCTGCCTCGTACTCCCTCCCTATGATTGAAAAGTAAACAAACCCAC 20
 ATTTCCATCCTGGTTAGAAGAAAATTAAATGTTCTGACAGTTGTGATCGCCTGGAGTACTTTAGACTTT
 AGCATTGTTTACCTGTTGTGGATGTTGTATGTCATACGTATGAGATAGGCACATGCATCT
 TCTGTATGGACAAAGGTGGGTACCTACAGGAGAGCAAAGGTTAATTGCTTGTGCTTGTAAACATT
 AATACAAAGTTTTATTGGGTGGAATTATTTGATGCAAATATTGATCACTAAACTTTAAACTT
 CTAGGTAAATTGCCACGCTTTGACTGCTACCAATACCCGTAAAAACAGTAATTCCCTGTTGTG
 TAATAAGATATTCATTTGTTGCTTAATAATAGTTATTCTTAGTCCATCAGATGTTCCGTGTC 30
 CTCTTTATGCCAAATTGATTGTCATATTGATGTTGGACCAAGTAGTTGCCATGGCAAACCTAAATT
 TATGACCTGCTGAGGCCTCTCAGAAACTGAGCATACTAGCAAGACAGCTTCTGAAAAAAATATG
 TATACACAAATATACGTATCTATACGTATGTATACACACATGTATATTCTCCTGATTGT
 GTAGCTGTCCAAAATAAACATATAGAGGGAGCTGTATTCTTATACAAATCTGATGGCTCCTGCAG
 CACTTTCTGAAAATATTACATTGCTAACCTAGTTGTTACTTAAACAGTTGAA 40
 AGGAGGGAAAAGCAGATGGACTTGAAAAGATCCAAGCTCCTATTAGAAAAGGTATGAAAATCTTATAGT
 AAAATTAAACTAAAGTTGACCTTTAATATGAGTAAACTCTCATTATTGGGTTCGCTTT
 GGATCTCATCCATCCATTGTTCTTTAATGCTGCCCTGCTTGGCATTCACTGCCCTAGACAATG
 CCACCAAGAGATAGTGGGGAAATGCCAGATGAAACCAACTCTGCTCTCACTAGTTGTCAGCTCTGGA
 TAAGTGACCACAGAACAGCAGGAGTCCTCCTGCTTGGCATTGGCCAGTTCCCTCTTTAAACAGAT
 TTGTAATGGCTCCAAATTCCATCACATCACATTAAATTGCAGACAGTGTGACATCATGTATCTGT

【表3-18】

TTTGTCCCATAATATGCTTTACTCCCTGATCCCAGTTCTGCTGTTGACTCTCCATTAGTTTATT
 ATTGTGTGTTCTCACAGTGACACCATTGCTCTTCTGAAACAACCTTCCAGCTACTTGCCAAATC
 TATTGTCTCTCCTCAAAACATTCTCCTTGAGTCCTCTCATCTGTAGCTGCTTTGTCTCT
 TAACTTACCATTCCTATAGTACTTATGCATCTGCTTAGTTCTATTAGTTTTGGCCTGCTCTC
 CTTGATTTAAAATTCTCTATAGCTAGAGCTTCTTCATTCTCTCCTGCAGTGTGCA
 10 TACATCAGAAGCTAGGTACATAAGTTAAATGATTGAGAGTTGGCTGTATTAGATTACACTTTAATA
 GGGTGAGCTTGAGAGTTCTTCTTCTGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT
 TTTGACTAATTACATGCTCTAAACCTCAAAGGTGATTATTTCTCCTGGAAACTCCAGGTCCAT
 TCTGTTAAATCCCTAAGAATGTCAGAATTAAACAGGGCTATCCGTAATTGAAATATTCTTT
 TCAGGATGCTATAGTCATTAGTACCTGACCACCAATTGTTATTGCACTAACAGCTAAACACGA
 TAAGTTACTCCTCATCTCAGTAATAAAATTAGCTGAATCACCTCTAGGTTCTGTCTTAA
 ATGGTATTCAAAATGGGATCTGTTGATGTATGAAACACATACTCCTAATTACCTGTTGG
 20 AAACTGGAGAAATGATTGTCGGCAACCGTTATTTTATTGTTATTGGTTGAGGGATTNTTA
 TAAACAGTTACTTGTGTCATATTAAAATTACTAACTGCCATCACCTGCTGGGCTTGTAGGTC
 ATTTCACTGACTAATAGGATAATCCAGGTAACCTGAAGAGATGAGCAGTGACTGACCAGGAGTTT
 CTGCCTTAGCTTGACAGTTCTAATTAGATCATTGAAGACCAGCTTCTCATAAATTCTTTGA
 AAAAAGAAAGCATTGACTAAGCTCCTGTAAAGACAACATCTAAATCTAAAGTGTGTTATCATG
 ACTGGTGAGAGAAGAAAACATTGTTTATTAAATGGAGCATTATTACAAAAGCCATTGTTGAGAAT
 30 TAGATCCCACATCGTATAAATATCTATTAAACCATTCTAAATAAGAGAACTCCAGTGTGCTATGTCAAG
 ATCCTCTTGGAGCTTTGCATAGCAATTAAAGGTGTGCTATTGTCAGTAGCCATTGGCAGTG
 ATTGAAAGACCAAGTTGTTTACAGCTGTGTTACCGTTAAAGGTTTTTATATGTATTAAATCAA
 TTTACTGTTAAAGCTTGAATATCTGCAATCTTGCAAGGTACTTTTATTAAAAAAACATA
 ACTTTGTAATATTACCCGTAAATTATATACTTAATAAAACATTAAAGCTATTGTTGGCTATT
 TCTATTGCTGCTACAGCAGACCACAAGCACATTCTGAAAAATTAAATTATTAATGTATTAAAGTTG
 40 TTATATTCTAGGTAACAATGTAAGAATGATTAAAATTAAATTGAAATTGGAGTATAATACCCAA
 TAAGCTTTAATTAGAGCAGAGTTAATTAAAAGTTAAATCAGTC

(配列番号 11)

【表3-19】

MWPLVAALLGSACCGSA**QLLFNKTKSVEFTFCNDTVVIPCFTVNMEAQNTTEVYVKWFKGRDIYTFDG**
ALNKSTVPTDFSSAKIEVSQLKGDAALKMDKSDAVSHTGNYTCEVTELREGETIIELKYRVSWFSPN
ENILIVIFPIFAILLFWGQFGIKTLKYRSGGMDEKTIALLVAGLVTIVIVGAILFVPGESLKNATGLG
LIVTSTGILILLHYYVFSTAIGLTSFVIAILVIQVIAYILAVVGLSLCIAACIPMHGPLLISGLSILALAQ
LLGLVYMKVASNQKTIQPPRN (配列番号 12)

10

ヒト CD47 mRNA アイソフォーム 3 (XM_005247908.1)

AGTGGGAGCGCGCTGCGCGGCCGTGCAGCCGGCAGTGGTCCTGCCGTGACGCCGGCGCGTC
 GGTCCCTGCCGTGTAACGGCGCGCGCTGCTGCCGGACACCTGCGCGCGCGACCCCGCGCG
GCGCGGAGATGTGGCCCTGGTAGCGGCCTGTTGCTGGCTCGCGTGCGGATCAGCTCAGCTACT
ATTTAATAAAACAAATCTGTAGAATTACGTTGTAATGACACTGTCGTATTCCATGCTTGTACT
AATATGGAGGCACAAACACTACTGAAGTATACTGAAGTAAAGTGAAATTAAAGGAAGAGATATTACACCT
TTGATGGAGCTCTAACAAAGTCCACTGTCCCCACTGACTTTAGTAGTGCAAAATTGAAGTCTCACAATT
ACTAAAAGGAGATGCCCTTTGAAGATGGATAAGAGTGATGCTGTCACACACAGGAAACTACACTGT
GAAGTAACAGAATTAACCAGAGAAGGTGAAACGATCATCGAGCTAAATATCGTGTGTTCATGGTTT
CTCCAAATGAAAATTCTTATTGTTATTGCCAATTGGCTATACTCCTGTTCTGGGACAGTTGG
TATTAAAACACTTAAATATAGATCCGGTGGTATGGATGAGAAAACAATTGCTTACTGTTGCTGGACTA
GTGATCACTGTCATTGTCATTGTTGGAGCCATTCTTCGTCCAGGTGAATATTCAAAAGAATGCTA
CTGGCCTTGGTTAATTGTGACTTCTACAGGGATATTAAATTACTTCACTACTATGTGTTAGTACAGC
GATTGGATTAACCTCCTCGTCATTGCCATTGGTTATTCAAGGTGATAGCCTATATCCTCGTGTGGTT
GGACTGAGTCTCTGTATTGGCGCGTGTATACCAATGCATGGCCCTCTCTGATTCAGGTTGAGTATCT
TAGCTCTAGCACAATTACTGGACTAGTTATATGAAATTGTTCTCCAAATCAGAAGACTATACAACC
TCCTAGGAAAGCTGTAGAGGAACCCCTTAATGAATAACTGAAGTGAAGTGTGACTCCGATTGGAGAG
TAGTAAGACGTGAAAGGAATACACTTGTGTTAACCGACCATGGCCTGATGATTCACTGTTGGGAGAAGA
AACAAGAAAAGTAACGGTTGTCACCTATGAGACCCCTACGTGATTGTTAGTTAAGTTTATTCAAAGCA
GCTGTAATTAGTTAATAAAATAATTATGATCTATGTTGTTGCCAATTGAGATCCAGTTTTGTTGTT
ATTTTAATCAATTAGGGCAATAGTAGAATGGACAATTCCAAGAATGATGCCCTTCAGGTCTAGGGCC
TCTGGCCTCTAGGTAACCAGTTAAATTGGTTCAAGGTGATAACTACTAGCACTGCCCTGGTGATTACCC
AGAGATATCTATGAAAACCAGTGGCTCCATCAAACCTTGCCAACTCAGGTTCACAGCAGCTTGGCAG

20

30

40

【表3-20】

TTATGGCAGTATGGCATTAGCTGAGAGGTGCTGCCACTCTGGTCAATGGAATAATAATTAGTACAG
 GCAGGAATTGGTGGAGCATCTGTATGATCTCGTATGATGTGATATTGATGGAGATAGTGGCCTCA
 TTCTGGGGTTGCCATTCCCACATTCCCCCTCAACAAACAGTGTAAACAGGTCTCCAGATTAGGGT
 ACTTTATTGATGGATATGTTCTTATTACACATAACCCCTGAAACCCCTGTCTGTCCTCTGTTAC
 TTGCTTCTGCTGTACAAGATGTAGCACCTTCTCCTCTTGAACATGGCTAGTGACACGGTAGCACCAG
 TTGCAGGAAGGAGCCAGACTTGTCTCAGAGCACTGTGTTCACACTTTCAGCAAAAATAGCTATGGTTGT
 AACATATGTATTCCCTCCTGATTGAAGGCAAAAATCTACAGTGTCTTCACCTCTTCTGATCTG
 GGGCATAAAAAGCAAGATTGAAATTGAACTATGAGTCTCCTGCATGGCAACAAAATGTGTGTCACCAT
 CAGGCCAACAGGCCAGCCCTGAATGGGATTATTACTGTTGATCTATGTTGATGATAAACATTCACTC
 ACCTCCTCCTGTAGCCTGCCTCGTACTCCCCCTCCCTATGATTGAAAAGTAAACAAAACCCACATTCT
 CTATCCTGGTTAGAAGAAAATTAAATGTTCTGACAGTTGATGCCCTGGAGTACTTTAGACTTTAGCAT
 TCGTTTTTACCTGTTGTGGATGTGTTGTATGTGCATACGTATGAGATAGGCACATGCATCTCTGT
 ATGGACAAAGGTGGGTACCTACAGGAGAGCAAAGGTTAATTGCTTGTGCTTTAGTAAAACATTAAATAC
 AAAGTTCTTATTGGGTGGAATTATATTGATGCAAATATTGATCACTAAAACTTTAAAACCTCTAGG
 TAATTGCCACGCTTTGACTGCTACCAATACCCGTAAAAATACGTAATTCTCCTGTTGTGAATA
 AGATATTCATATTGAGTTGCATTAATAATAGTTATTCTTAGTCCATCAGATGTTCCGTGTCCTCTT
 TTATGCCAAATTGATTGTCATATTGATGTTGGACCAAGTAGTTGCCATGGCAAACCTAAATTATGA
 CCTGCTGAGGCCTCTCAGAAAATGAGCATACTAGCAAGACAGCTTCTGAAAAAAAATATGTATAC
 ACAAAATATACGTATCTATACGTATGTATACACACATGTATATTCTCCTGATTGTGTC
 TGTCCAAAATAACATATATAGAGGGAGCTGTATTCTTATACAAATCTGATGGCCTCTGCAGCACTT
 TTTCTCTGAAAATATTACATTGCTAACCTAGTTGTTACTTAAAAATCAGTTGATGAAAGGAG
 GGAAAAGCAGATGGACTTGAAAAAGATCCAAGCTCCTATTAGAAAAGGTATGAAAATCTTATAGTAAAAT
 TTTTATAAAACTAAAGTTGACCTTTAATATGAGTAACTCTCATTATTGGGTTCGCTCTGGATC
 TCATCCATCCATTGTTCTCTTAATGCTGCCTGCCTTGAGGCATTCACTGCCCTAGACAATGCCACC
 AGAGATAGTGGGGAAATGCCAGATGAAACCAACTCTGCTCTCACTAGTTGTCAGCTCTGGATAAGT
 GACCACAGAAGCAGGAGTCCTCCTGCTGGCATCATTGGGCCAGTTCCCTCTTTAAATCAGATTGTA
 ATGGCTCCAAATTCCATCACATCACATTAAATTGAGACAGTGTGTTGCACATCATGTATCTGTTGT
 CCCATAATATGCTTTACTCCCTGATCCAGTTCTGCTGTTGACTCTCCATTCACTAGTTTATTGAT
 GTGTTCTCACAGTGACACCATTGTCCTTCTGCAACAAACCTTCCAGCTACTTTGCCAAATTCTATT

10

20

30

40

【表3-21】

GTCTTCTCCTCAAAACATTCTCCTTGAGTCCTCTCATCTGTGTAGCTGCTCTTGTCTCTTAAC
TACCAATTCTATAGTACTTATGCATCTGCTTAGTCTATTAGTTTTGGCCTGCTCTCCTGA
TTTTAAAATTCTCTATAGCTAGAGCTTCTTCATTCTCTTCAGTGTACATACAT
CAGAAGCTAGGTACATAAGTTAAATGATTGAGAGTTGGCTGTATTAGATTACACTTTAATAGGGTG
AGCTTGAGAGTTCTTCTTCTGTTTTTTTTGTTTTTTTTTTTTTTTTTG
ACTAATTTCACATGCTCTAAACCTCAAAGGTATTATTTCTCCTGAAACTCCAGGTCCATTCTGT 10
TTAAATCCCTAAGAATGTCAGAATTAAAACAGGGCTATCCGTATTGAAATATTCTTTTCAGG
ATGCTATAGTCATTAGTAAGTGACCACCAAATTGTTATTGACTAACAAAGCTAAAACACGATAAGT
TTACTCCTCCATCTCAGTAATAAAATTAAGCTGTAATCACCTCTAGGTTCTGTCTAAATGGG
TATTCAAAAATGGGATCTGTTGTATGTATGAAACACATACTCTTAATTACCTGTTGGAAACT
GGAGAAATGATTGTCGGCAACCGTTATTTTATTGTATTGTTGGAGGGATTTTATAAAC
AGTTTACTTGTGTCATATTAAAATTACTAACTGCCATCACCTGCTGGGTCTTGTAGGTCAATT 20
CAGTGACTAATAGGATAATCCAGGTAACTTGAAGAGATGAGCAGTGAGTGACCAGGCAGTTCTGCC
TTAGCTTGACAGTTCTTAATTAAGATCATTGAAGACCAGCTTCTCATAAAATTCTCTTTGAAAAAA
AGAAAGCATTGACTAAGCTCCTCTGTAAGACAACATCTAAATCTAAAAGTGTGTTATCATGACTGG
TGAGAGAAGAAAACATTGTTTATTAAATGGAGCATTATTACAAAAGCCATTGTTGAGAATTAGAT
CCCACATCGTATAAATATCTATTACCATTCTAAATAAGAGAACTCCAGTGTTGCTATGTCAAGATCCT
CTCTGGAGTTTGCATAGCAATTAAAGGTGTGCTATTGTCAGTAGCCATTGGCAGTGATTG 30
AAGACCAAAGTTTTACAGCTGTGTTACCGTTAAAGGTTTTTATATGATTAAATCAATTAT
CACTGTTAAAGCTTGAATATCTGCAATCTTGCCTAAAGGTACTTTTATTAAAAAAACATAACTT
GTAAATATTACCTGTAATTATATATACTTAATAAAACATTAAAGCTA (配列番号13)

ヒト CD47 アミノ酸アイソフォーム 3 (XP_005247965.1)

MWPLVAALLLGSACCGSAQLLFNKTGSVEFTFCNDTVVIPCFTVNMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFDG
ALNKSTVPTDFSSAKIEVSQLLKGDASLKDMDKSDAVSHTGNYTCEVTELREGETIIELKYRVVSWFSPN 40
ENILIVIFPIFAILFWGQFGIKTLKYRSGGMDEKTIALLVAGLVI TVIVIVGAILFVPGEYSLKNATGLG
LIVTSTGILILLHYYVSTAIGLTSFVIAILVIQVIAYILAVVGLSLCIAACIPMHGPLLISGLSILALAQ
LLGLVYMKVASNQKTIQPPRKAVEEPLNE (配列番号14)

【表3-22】

ヒトCD47 mRNA アイソフォーム4(NM_001777.3)

GGGGAGCAGGCGGGGGAGCGGGCGGAAGCAGTGGGAGCGCGCGTGCAGCCTGGCAGT
 GGGTCTGCCTGTGACGCGCGCGCGTGGTCTGCCTGTAACGGCGGGCTGCTGCTCCAGACA
 CCTGCAGCGCGCGCGACCCCGCGCGGGAGATGTGGCCCTGGTAGCGGCCTGTTGCTGGG
CTCGCGTGCTGCGGATCAGCTACTATTAATAAAACAAATCTGAGAATTACGTTGTAAT 10
GACACTGTCGTATTCCATGCTTGTACTAATATGGAGGCACAAACACTACTGAAGTATACGTAAGT
GGAAATTAAAGGAAGAGATATTACACCTTGATGGAGCTCTAAACAAGTCCACTGTCCCCACTGACTT
TAGTAGTGCAAAATTGAAGTCTCACAAATTACTAAAAGGAGATGCCTCTTGAAGATGGATAAGAGTGAT
GCTGTCTCACACACAGGAAACTACACTTGTGAAGTAACAGAATTAACCAGAGAAGGTGAAACGATCATCG
AGCTAAATATCGTGTGTTCATGGTTCTCAAATGAAATATTCTTATTGTTATTTCCAATTGTT 20
TGCTATACTCCTGTTCTGGGACAGTTGGTATTAAACACTTAAATATAGATCCGGTGGTATGGATGAG
AAAACAATTGCTTACTTGTGCTGGACTAGTGATCACTGTCATTGTCATTGTTGGAGCCATTCTTCG
TCCCAGGTGAATATTCAATTAAAGAATGCTACTGGCCTGGTTAATTGTGACTTCTACAGGGATATTAAT
ATTACTTCACTACTATGTGTTAGTACAGCGATTGGATTAACCTCCTCGTCATTGCCATTGTTATT
CAGGTGATAGCCTATATCCTCGCTGTGGTGGACTGAGTCTGTATTGCGCGTGTATACCAATGCATG
GCCCTCTCTGATTCAGGTTGAGTATCTAGCTCTAGCACAATTACTGGACTAGTTATATGAAATT
TGTGGCTTCCAATCAGAAGACTATACAACCTCTAGGAAAGCTGTAGAGGAACCCCTTAATGCATTCAA 30
GAATCAAAGGAATGATGAATGATGAATAACTGAAGTGAAGTGATGGACTCCGATTGGAGAGTAGTAAG
ACGTGAAAGGAATACACTTGTGTTAAGCACCATGGCCTGATGATTCACTGTTGGGAGAAGAAACAAGA
AAAGTAACTGGTTGTCACCTATGAGACCCCTACGTGATTGTTAGTTAAGTTTATTCAAAGCAGCTGTAA
TTTAGTTAATAAAATAATTGATCTATGTTGTTGCCAATTGAGATCCAGTTTTGTTATTGTT
ATCAATTAGGGCAATAGTGAATGGACAATTCCAAGAATGATGCCCTCAGGTCTAGGGCCTCTGGCC
TCTAGGTAACCAGTTAAATTGGTTAGGGTGATAACTACTAGCACTGCCCTGGTATTACCCAGAGATA
TCTATGAAAACCAGTGGCTCCATCAAACCTTGCCAACTCAGGTTACAGCAGCTTGGCAGTTATGGC 40
AGTATGGCATTAGCTGAGAGGTGTCTGCCACTTCTGGTCAATGGAATAATAAGTACAGGCAGGAA
TTTGGTTGGAGCATCTGTATGATCTCCGTATGATGTGATATTGATGGAGATAGTGGCCTCATTCTGG
GGGTTGCCATTCCACATTCCCTCAACAAACAGTGTAAACAGGTCTTCCCAGATTAGGGTACTTTA
TTGATGGATATGTTCCATTACACATAACCCCTGAAACCCCTGTCTGCTCCTGTTACTGCTTC
TGCTGTACAAGATGTAGCACCTTCTCCTTTGAACATGGTAGTGACACGGTAGCACCAGTTGCAGG

【表3-23】

AAGGAGCCAGACTTGTCTCAGAGCACTGTGTTCACACTTTCAGCAAAATAGCTATGGTTGTAACATAT
 GTATTCCCTCCTCTGATTGAAGGCAAAATCTACAGTGTTCCTACTCTTCTGATCTGGGCATG
 AAAAAAGCAAGATTGAAATTGAACTATGAGTCTCCTGCATGGCAACAAAATGTGTGTCACCATCAGGCCA
 ACAGGCCAGCCCTGAATGGGGATTATTACTGTTGATCTATGTCATGATAAACATTCATCACCTCC
 TCCTGTAGCCTGCCTCGTACTCCCCCTCCCTATGATTGAAAAGTAAACAAAACCCACATTCCATCCT
 GGTTAGAAGAAAATTAATGTTCTGACAGTGTGATCGCCTGGAGTACTTTAGACTTTAGCATTGTTT 10
 TTACCTGTTGTGGATGTGTTGTATGTCATACGTATGAGATAGGCACATGCATCTCTGTATGGACA
 AAGGTGGGTACCTACAGGAGAGCAAAGGTTAATTGTGCTTTAGTAAAAACATTAAATACAAAGTTC
 TTTATTGGGTGGAATTATATTGATGCAAATATTGATCCTAAACTTTAAACTTCTAGGTAATTG
 CCACGCTTTGACTGCTACCAATACCCGTAAAAACGTAATTCTCCTGTTGTGTAATAAGATATT
 CATATTGTAGTGCAATTAAATAGTTATTCTTAGTCCATCAGATGTTCCGTGCGCTTTATGCC
 AAATTGATTGTCATAATTGATGCTGGGACCAAGTAGTTGCCATGGCAAACCTAAATTGACCTGCTG 20
 AGGCCTCTCAGAAAATGAGCATACTAGCAAGACAGCTTCTGAAAAAAATATGTATACACAAATA
 TATACGTATATCTATACGTATGTATACACACATGTATATTCTCCTGATTGTGAGCTGTCAA
 AATAATAACATATAGAGGGAGCTGTATTCTTATACAAATCTGATGGCCTCGCAGCACTTTCTT
 CTGAAAATATTACATTGCTAACCTAGTTGTTACTTAAACAGTTGATGAAAGGAGGGAAAAG
 CAGATGGACTTGAAAAGATCCAAGCTCCTATTAGAAAAGGTATGAAAATCTTATAGTAAATTTTT 30
 AACTAAAGTTGACCTTTAATATGTAGTAAACTCTCATTATTGGGGTCGCTCTGGATCTCATCCA
 TCCATTGTTCTTTAATGCTGCCTGCCTTGAGGCATTCACTGCCCTAGACAATGCCACCAGAGATA
 GTGGGGAAATGCCAGATGAAACCAACTCTGCTCTCACTAGTTGTCAGCTCTGGATAAGTGACCACA
 GAAGCAGGAGTCCTCTGCTTGGCATCATTGGCCAGTTCTCTTTAAATCAGATTGTAATGGCTC
 CCAAATTCCATCACATCACATTAAATTGCAGACAGCTTGCACATCATGTATCTGTTGTCCCATAA
 TATGCTTTACTCCCTGATCCCAGTTCTGCTGTTGACTCTCCATTCACTAGTTGATTTTATTGTGTTCT 40
 CACAGTGACACCATTGCTCTTCTGCAACAAACCTTCCAGCTACTTTGCCAAATTCTATTGCTCT
 CCTTCAAAACATTCTCCTTGAGTCCTCTCATCTGCTGAGCTGCTCTTGTCTCTTAACCTACCATT
 CCTATAGTACTTATGCATCTGCTTAGTTCTATTAGTTTGGCCTGCTCTCTGATTTAA
 ATTCCCTCTATAGCTAGAGCTTCTTCTTCATTCTCTCTGCAAGTGTGTCATACATCAGAAC
 TAGGTACATAAGTTAAATGATTGAGAGTTGGCTGTATTAGATTACATTAAATAGGGTGAGCTGA
 GAGTTTCTTCTTCTGTTTTTTTTGTTTTTTTTTTTTTTTTTTGACTAATT

【表3-24】

TCACATGCTCTAAAACCTCAAAGGTGATTATTTCTCCTGGAAACTCCAGGTCCATTCTGTTAAATC
 CCTAAGAATGTCAGAATTAAAATACAGGGCTATCCGTAAATTGAAATATTCTTTTCAGGATGCTAT
 AGTCAATTAGTAAGTGACCACCAATTGTTATTGACTAACAAAGCTAAAACACGATAAGTTACTCC
 TCCATCTCAGTAATAAAAATTAAGCTGAATCAACCTCTAGGTTCTTGTCTAAAATGGTATTCAA
 AAATGGGATCTGTGGTGTATGAAACACATACTCCTAATTACCTGTTGGAAACTGGAGAAA
 TGATTGTCGGCAACCGTTATTTTATTGTATTGTTGGGAGTTTTATAAACAGTTA
 CTTGTGTCATATTAAAATTACTAACTGCCATCACCTGCTGGGCTTGTAGTCATTTCAGTGAC
 TAATAGGGATAATCCAGGTAACCTTGAAGAGATGAGCAGTGAGTGACCAGGCAGTTCTGCCTTAGCT
 TTGACAGTTCTAATTAAGATCATTGAAGACCAGCTTCTCATAAATTCTCTTTGAAAAAAAGAAAGC
 ATTGTACTAAGCTCCTCTGTAAGACAACATCTAAATCTAAAAGTGTGTTATCATGACTGGTAGAGA
 AGAAAACATTGTGTTTATTAAATGGAGCATTATTACAAAAGCCATTGTTGAGAATTAGATCCCACAT
 CGTATAAATATCTATTACCCTAAATAAGAGAACTCCAGTGTGCTATGTCAAGATCCTCTTGG
 AGCTTTTGATAGCAATTAAAGGTGTGCTATTGTCAGTAGCCATTGAGTGAAGACCA
 AAGTTGTTTACAGCTGTGTTACCGTAAAGGTTTTTATATGTATTAAATCAATTATCACTGTT
 TAAAGCTTGAATATCTGCAATCTTGCCAAGGTACTTTTATTAAAAAAACATAACTTGTAAATA
 TTACCCGTAAATTATATACTTAATAAAACATTAAAGCTATTGTTGGGCTATTCTATTGCTGCT
 ACAGCAGACCACAAGCACATTCTGAAAATTAAATTATGTTAGTTGCTTATATTCTAGG
 TAACAATGTAAGAATGATTAAAATTAAATTATGAATTGAGTATAAACCAATAAGCTTTAAT
 TAGAGCAGAGTTAATTAAAAGTTAAATCAGTC (配列番号 15)

10

20

30

ヒト CD47 アミノ酸アイソフォーム 4 (NP_001768.1)

MWPLVAALLLGSACCGSAQLLFNKTGSVEFTFCNDTVVIPCFTVNMEAQNTEVYVKWFKGRDIYTFDG
 ALNKSTVPTDFSSAKIEVSQLLKGDSLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTELTREGETIIELKYRVVSWFSPN
 ENILIVIFPIFAILLFWGQFGIKTLKYRSGGMDEKTIALVAGLVTIVIVGAILFVPGEYSLKNATGLG
 LIVTSTGILILLHYYVSTAIGLTSFVIILVIQVIAYILAVVGLSLCIAACIPMHGPLLISGLSILALAQ
 LLGLVYMKV ASNQKTIQPPRKAVEEPLNAFKESKGMNDE (配列番号 16)

40

ヒト化 CD47 アミノ酸アイソフォーム 1

MWPLAAALLLGSCCGSAQLLFNKTGSVEFTFCNDTVVIPCFTVNMEAQNTEVYVKWFKGRDIYTFDG

【表3-25】

ALNKSTVPTDFSSAKIEVSQLLKGDASLKMDSADSVHTGNYTCEVTEL TREGETI IELKYRVS WFSPN
 ENILIVIFPIFAILLFWGQFGIKTLKYRSGGMDEKTIALLVAGLVITVIVIVGAILFVPGEYSLKNATGL
 GLIVTSTGILILLHYYVSTAIGLTSFVIALVIQVIAYILAVVGLSLCIAACIPMHGPLLISGLSILAL
 AQLLGLVYMKFVE (配列番号 17)

ヒト化 CD47 アミノ酸アイソフォーム 2

MWPLAAALLLGSCCCGSAQLLFNKTKSVEFTFCNDTVVIPCFTVNMEAQNTEVYVWKFKGRDIYTFDG
 ALNKSTVPTDFSSAKIEVSQLLKGDASLKMDSADSVHTGNYTCEVTEL TREGETI IELKYRVS WFSPN
 ENILIVIFPIFAILLFWGQFGIKTLKYRSGGMDEKTIALLVAGLVITVIVIVGAILFVPGEYSLKNATGL
 GLIVTSTGILILLHYYVSTAIGLTSFVIALVIQVIAYILAVVGLSLCIAACIPMHGPLLISGLSILAL
 AQLLGLVYMKFV ASNQRTIQPPRNR (配列番号 18)

10

ヒト化 CD47 アミノ酸アイソフォーム 3

MWPLAAALLLGSCCCGSAQLLFNKTKSVEFTFCNDTVVIPCFTVNMEAQNTEVYVWKFKGRDIYTFDG
 ALNKSTVPTDFSSAKIEVSQLLKGDASLKMDSADSVHTGNYTCEVTEL TREGETI IELKYRVS WFSPN
 ENILIVIFPIFAILLFWGQFGIKTLKYRSGGMDEKTIALLVAGLVITVIVIVGAILFVPGEYSLKNATGL
 GLIVTSTGILILLHYYVSTAIGLTSFVIALVIQVIAYILAVVGLSLCIAACIPMHGPLLISGLSILAL
 AQLLGLVYMKFV ASNQRTIQPPRKAVEEPLNE (配列番号 19)

20

ヒト化 CD47 アミノ酸アイソフォーム 4

MWPLAAALLLGSCCCGSAQLLFNKTKSVEFTFCNDTVVIPCFTVNMEAQNTEVYVWKFKGRDIYTFDG
 ALNKSTVPTDFSSAKIEVSQLLKGDASLKMDSADSVHTGNYTCEVTEL TREGETI IELKYRVS WFSPN
 ENILIVIFPIFAILLFWGQFGIKTLKYRSGGMDEKTIALLVAGLVITVIVIVGAILFVPGEYSLKNATGL
 GLIVTSTGILILLHYYVSTAIGLTSFVIALVIQVIAYILAVVGLSLCIAACIPMHGPLLISGLSILAL
 AQLLGLVYMKFV ASNQRTIQPPRKAVEEPLNAFKESKGMMNDE (配列番号 20)

30

ヒト化CD47非ヒト動物

【0105】

CD47タンパク質をコードする非ヒト動物の内因性遺伝子座の遺伝子改変から生じる非ヒト動物の細胞表面上に、ヒト化CD47タンパク質を発現する非ヒト動物が提供される。本明細書に記述された適切な例には齧歯類、特にマウスが含まれる。

【0106】

一部の実施形態では、ヒト化CD47遺伝子は、異種の種（例えば、ヒト）からの遺伝物質を備え、ヒト化CD47遺伝子は異種の種由来の遺伝物質のコード化部分を備えるCD47タンパク質をコードする。一部の実施形態では、本発明のヒト化CD47遺伝子は、細胞の細胞膜上

40

50

に発現されるCD47タンパク質の細胞外部分をコードする異種の種のゲノムDNAを備える。一部の実施形態では、本発明のヒト化CD47遺伝子は、細胞の細胞膜上に発現されるCD47タンパク質の細胞外部分と膜貫通部分をコードする異種の種のゲノムDNAを備える。当該ヒト化CD47遺伝子を含む非ヒト動物、非ヒト胚、および細胞を作製するための非ヒト動物、胚、細胞および標的化構築物も提供される。

【0107】

一部の実施形態では、内因性CD47遺伝子は削除されている。一部の実施形態では、内因性CD47は変更されており、内因性CD47遺伝子の一部分が異種配列（例えば、ヒトCD47配列の全部または一部）で置換されている。一部の実施形態では、内因性CD47遺伝子のすべてまたは実質的にすべてが、異種の遺伝子（例えば、ヒトCD47遺伝子）で置換される。一部の実施形態では、異種CD47遺伝子の一部分が、内因性CD47遺伝子座で、内因性非ヒトCD47遺伝子に挿入される。一部の実施形態では、異種遺伝子はヒト遺伝子である。一部の実施形態では、改変またはヒト化は、内因性CD47遺伝子の二つの複製のうちの一つに対して行われ、それによりヒト化CD47遺伝子に対してヘテロ接合性の非ヒト動物を生じさせる。その他の実施形態では、ヒト化CD47遺伝子に対してホモ接合性の非ヒト動物が提供される。

10

【0108】

本発明の非ヒト動物は、全部または一部のヒトCD47を内因性非ヒトCD47遺伝子座に含有する。従って、このような非ヒト動物は異種CD47遺伝子を有するとして記述されることができる。内因性CD47遺伝子座で置換、挿入、改変または変更されたCD47遺伝子は、たとえばPCR、ウェスタンプロット、サザンプロット、制限酵素断片長多型（RFLP）、または対立遺伝子の獲得または欠失アッセイを含む、さまざまな方法を使用して検出できる。一部の実施形態では、非ヒト動物は、ヒト化CD47遺伝子に関してヘテロ接合性である。その他の実施形態では、非ヒト動物は、ヒト化CD47遺伝子に関してホモ接合性である。

20

【0109】

さまざまな実施形態で、本発明によるヒト化CD47遺伝子は、第二、第三、第四、第五、第六および第七のエクソンを有するCD47遺伝子を含み、各エクソンは表3のヒトCD47遺伝子に見られる第二、第三、第四、第五、第六および第七のエクソンと少なくとも50%（例えば、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれ以上）同一の配列を有する。

30

【0110】

さまざまな実施形態で、本発明によるヒト化CD47遺伝子は、第一のエクソンと、エクソン7の下流のエクソン（複数含む）（たとえばアイソフォーム2の第八エクソンおよび第九エクソン）を有するCD47遺伝子を含み、各エクソンは、表3のマウスCD47に見られる各エクソンと少なくとも50%（例えば、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれ以上）同一の配列を有する。

【0111】

さまざまな実施形態で、本発明によるヒト化CD47遺伝子は、5'非翻訳領域と3'非翻訳領域を有するCD47遺伝子を含み、各領域は表3のマウスCD47遺伝子に見られる5'非翻訳領域および3'非翻訳領域と少なくとも50%（例えば、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれ以上）同一の配列を有する。

40

【0112】

さまざまな実施形態で、本発明によるヒト化CD47遺伝子は、表3のヒトCD47ヌクレオチドコード化配列に見られるヌクレオチドコード化配列と少なくとも50%（例えば、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれ以上）同一のヌクレオチドコード化配列（例えば、cDNA配列）を有するCD47遺伝子を含む。

【0113】

さまざまな実施形態で、本発明の非ヒト動物によって生産されるヒト化CD47タンパク質は、表3に見られるヒトCD47タンパク質の細胞外部分と少なくとも50%（例えば、50%、55%

50

、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれ以上)同一のアミノ酸配列を有する細胞外部分を有する。

【0114】

さまざまな実施形態で、本発明の非ヒト動物によって生産されるヒト化CD47タンパク質は、表3のヒトCD47タンパク質に見られるアミノ酸残基19~141と同一のアミノ酸配列を有する細胞外部分を有する。

【0115】

さまざまな実施形態で、本発明の非ヒト動物によって生産されるヒト化CD47タンパク質は、表3に見られるヒトCD47タンパク質のN末端イムノグロブリンVドメインと少なくとも50% (例えば、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれ以上)同一であるアミノ酸配列を有するN末端免疫グロブリンVドメインを有する。

10

【0116】

さまざまな実施形態で、本発明の非ヒト動物によって生産されるヒト化CD47タンパク質は、表3のヒトCD47タンパク質に見られるアミノ酸残基19~127と同一のアミノ酸配列を有するN末端免疫グロブリンVドメインを有する。

【0117】

さまざまな実施形態で、本発明の非ヒト動物によって生産されるヒト化CD47タンパク質は、N末端免疫グロブリンVドメインおよび5つの膜貫通ドメインを有し、各ドメインは、表3に見られるヒトCD47タンパク質のN末端免疫グロブリンVドメインおよび5つの膜貫通ドメインと、少なくとも50% (例えば、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれ以上)同一である配列を有する。

20

【0118】

さまざまな実施形態で、本発明の非ヒト動物によって生産されるヒト化CD47タンパク質は、表3に見られるマウスCD47タンパク質の細胞質内尾部と少なくとも50% (例えば、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれ以上)同一である配列を有する細胞質内尾部を持つ。

【0119】

さまざまな実施形態で、本発明の非ヒト動物によって生産されるヒト化CD47タンパク質は、表3のヒトCD47タンパク質に見られるアミノ酸残基16~292と少なくとも50% (例えば、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれ以上)同一であるアミノ酸配列を有する。

30

【0120】

さまざまな実施形態で、本発明の非ヒト動物によって生産されるヒト化CD47タンパク質は、表3のヒトCD47タンパク質に見られるアミノ酸残基19~292と少なくとも50% (例えば、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれ以上)同一であるアミノ酸配列を有する。

【0121】

さまざまな実施形態で、本発明の非ヒト動物によって生産されるヒト化CD47タンパク質は、表3のヒトCD47タンパク質に見られるアミノ酸残基19~292 (または16~292) と同一であるアミノ酸配列を有する。

40

【0122】

さまざまな実施形態で、本発明の非ヒト動物によって生産されるヒト化CD47タンパク質は、表3に見られるヒト化CD47タンパク質のアミノ酸配列と少なくとも50% (例えば、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれ以上)同一であるアミノ酸配列を有する。

【0123】

さまざまな実施形態で、本発明の非ヒト動物によって生産されるヒト化CD47タンパク質は、表3に見られるヒト化CD47タンパク質のアミノ酸配列と同一であるアミノ酸配列を有

50

する。

【0124】

特定の多型体、対立遺伝子多型（例えば、一アミノ酸差異）または選択的スプライス型アイソフォームを含む、ヒト化CD47タンパク質を発現する非ヒト動物を作るための組成物および方法が提供されており、かかるタンパク質をヒトプロモーターおよびヒト調節配列から発現する非ヒト動物を作るための組成物および方法も含む。一部の実施形態では、かかるタンパク質を内因性プロモーターおよび内因性調節配列から発現する非ヒト動物を作るための組成物および方法も提供されている。当該方法は、ヒトCD47タンパク質の全部または一部をコードする遺伝物質を、内因性CD47遺伝子に相当する非ヒト動物のゲノムの正確な位置に挿入すること、およびそれによって、全部または一部がヒトであるCD47タンパク質を発現するヒト化CD47遺伝子を生成することを含む。一部の実施形態では、当該方法は、ヒトCD47遺伝子のエクソン2～7に相当するゲノムDNAを非ヒト動物の内因性CD47遺伝子に挿入すること、およびそれによって、挿入されたエクソンによりコードされるアミノ酸を含有するヒト部分を含むCD47タンパク質をコードするヒト化遺伝子を生成することを含む。10

【0125】

適切な場合、ヒトCD47タンパク質の全部または一部をコードする遺伝物質またはポリヌクレオチド配列のコード領域は、非ヒト動物での発現のために最適化されたコドンを含むように改変される場合がある（例えば、米国特許第5,670,356号および第5,874,304号を参照）。コドン最適化配列は合成配列であり、非コドン最適化親ポリヌクレオチドによってコードされる同一ポリペプチド（または全長ポリペプチドと実質的に同じ活性を有する全長ポリペプチドの生物活性断片）をコードすることが好ましい。一部の実施形態では、ヒトCD47タンパク質の全部または一部をコードする遺伝物質のコード領域は、特定の細胞型（例えば、齧歯類細胞）に対してコドン使用頻度を最適化するように変更された配列を含む場合がある。例えば、非ヒト動物（例えば、齧歯類）の内因性CD47遺伝子に挿入される、ヒトCD47遺伝子のエクソン2～7に相当するゲノムDNAのコドンは、非ヒト動物の細胞での発現のために最適化される場合がある。このような配列はコドン最適化配列として記述される場合がある。20

【0126】

さまざまな実施形態で、CD47配列のゲノム配列は単一断片中で改変され、それにより必要な調節配列を含むことによって正常な機能が維持されるため、ヒト化CD47遺伝子の方法は、相対的に最小限の内因性遺伝子の改変を用いることにより、非ヒト動物において自然な状態のCD47介在性シグナル伝達を生じさせている。従って、かかる実施形態では、CD47遺伝子の改変はその他の周囲の遺伝子またはその他の内因性CD47-相互作用遺伝子（例えば、トロンボスポンジン、SIRP、インテグリンなど）に影響を与えない。さらに、さまざまな実施形態で、改変は、細胞膜上の機能的CD47膜貫通型タンパク質の組み立てに影響を与えず、結合および、改変によって影響を受けないタンパク質の細胞質部分を通じたその後のシグナル伝達を介して正常なエフェクター機能を維持する。30

【0127】

内因性マウスCD47遺伝子およびヒトCD47遺伝子のゲノム構造の略図（正確な縮尺ではない）が図1に提供されている。ヒトCD47遺伝子のエクソン2～7を含むゲノム断片を使用して、内因性マウスCD47遺伝子をヒト化するための例示的方法が図2に提供されている。図示されているように、ヒトCD47のエクソン2～7を含有するゲノムDNAは、標的化構築物により内因性マウスCD47遺伝子座へと挿入されている。このゲノムDNAには、リガンド結合に関与するヒトCD47タンパク質の細胞外部分および膜貫通ドメイン（例えば、アミノ酸残基16～292）をコードする遺伝子の部分を含む。40

【0128】

内因性CD47遺伝子座にヒト化CD47遺伝子を有する非ヒト動物（例えば、マウス）は、当技術分野で公知の任意の方法で作ることができる。例えば、選択可能なマーカー遺伝子とともにヒトCD47遺伝子の全部または一部を導入する標的化ベクターを作ることができる。50

図2は、ヒトCD47遺伝子のエクソン2~7の挿入を備えるマウスゲノムの内因性CD47遺伝子座を図示している。図示されるように、標的化構築物は、内因性マウスCD47遺伝子（約39Kb）のエクソン2の上流の配列を含む5' ホモロジーアーム、次いでヒトCD47遺伝子のエクソン2~7を含有するゲノムDNA断片（約23.9Kb）、薬剤選択力セット（例えば、LoxP配列の両側に隣接するネオマイシン耐性遺伝子、約5Kb）、および内因性マウスCD47遺伝子のエクソン7の下流配列を含有する3' ホモロジーアーム（約99Kb）を含む。標的化構築物は、自動削除薬剤選択力セット（例えば、LoxP配列に隣接したネオマイシン耐性遺伝子、米国特許第8,697,851号、第8,518,392号および第8,354,389号を参照のこと。これらはすべて参考により本明細書に組み込まれる）を含む。相同組み換えが行われると、内因性マウスCD47遺伝子のエクソン2~7は、標的化ベクター中に含有される配列（すなわちヒトCD47遺伝子のエクソン2~7）により置換される。ヒト化CD47遺伝子が作られ、それによりヒトCD47遺伝子のエクソン2~7によりコードされるアミノ酸を含有するヒト化CD47タンパク質を発現する細胞または非ヒト動物がもたらされる。発生依存的な様式で除去された薬剤選択力セット、すなわち、その生殖系細胞が上述のヒト化CD47遺伝子を含むマウスから派生した子孫は、発生の間に分化した細胞から選択可能マーカーを脱落させる。

【0129】

本発明の非ヒト動物は、多くの場合、当該非ヒト動物の使用目的に応じて、上述のように作製され、または追加のヒト遺伝子もしくはヒト化遺伝子を含有させるための当技術分野に公知の方法を用いて作製されてもよい。かかる追加のヒト遺伝子またはヒト化遺伝子の遺伝物質は、上述の遺伝的改変を有する細胞（たとえば胚性幹細胞）のゲノムのさらなる改変を介して、または所望される他の遺伝子改変系統を用いた当分野に公知の交配技術を介して、導入される場合がある。一部の実施形態では、本発明の非ヒト動物は、SIRP（CD172a）、IL-3、M-CSF、GM-CSF、およびTPOから選択されるヒト遺伝子またはヒト化遺伝子を一つ以上さらに備えるように作製される。一部の実施形態では、本発明の非ヒト動物は、本明細書に記述されるように、標的化ベクターを、改変された系統由来の細胞へと導入することにより作製されてもよい。一例をあげると、上述の標的化ベクターは、Rag2を欠損およびIL-2R_cを欠損し、4つのヒトサイトカイン（Rag2^{-/-} IL2R_c^{-/-}; M-CSF^{Hu}; IL-3/GM-CSF^{Hu}; hSIRP^{tg}; TPO^{Hu}）を含むマウスへと導入されてもよい。一部の実施形態では、本発明の非ヒト動物は、ヒトまたはヒト化されたシグナル制御性タンパク質アルファ（SIRP : signal-regulatory protein alpha）遺伝子をさらに備えるように作製される。一部の実施形態では、本発明の非ヒト動物は、本明細書に記述されるヒト化CD47遺伝子、および異種の種（例えば、ヒト）由来の遺伝物質を備えており、この場合において当該遺伝物質は、SIRP（CD172a）、IL-3、M-CSF、GM-CSF、およびTPOから選択される異種タンパク質を一つ以上、全部または一部、コードしている。一部の特定実施形態では、本発明の非ヒト動物は、本明細書に記述されるヒト化CD47遺伝子、および異種の種（例えば、ヒト）由来の遺伝物質を備えており、この場合において、当該遺伝物質は、異種（例えば、ヒト）のSIRP（CD172a）タンパク質の全部または一部をコードしている。一部の特定実施形態では、本発明の非ヒト動物は、内因性部分およびヒト部分（例えば、ヒトSIRP遺伝子のエクソン2~4）を備えるSIRP遺伝子をさらに備えており、この場合において、当該ヒト部分は、SIRPタンパク質の細胞外ドメイン（例えば、ヒトSIRPタンパク質の28~362残基に相当するアミノ酸）をコードしており、当該内因性部分は、内因性SIRPタンパク質の細胞内ドメインをコードしている。一部の実施形態では、ヒト部分および内因性部分は、内因性SIRPプロモーターに動作可能なように連結されている。

【0130】

たとえば、本明細書において記述される場合、ヒト化CD47遺伝子を備えた非ヒト動物は、それら出願がその全体で参照により本明細書に援用される、2010年10月4日に出願されたPCT/US2010/051339、2013年9月6日に出願されたPCT/US2013/058448、2013年6月14日に出願されたPCT/US2013/045788、2014年9月23日に出願されたPCT/US2014/056910、2014年10月15日に出願されたPCT/US2014/060568、2014年2月14日に出願されたPCT/US2012/025040、2012年10月29日に出願されたPCT/US2012/062379、2014年11月10日に出願されたPCT/US2

10

20

30

40

50

014/064806、および2014年11月10日に出願されたPCT/US2014/064810に記述される一つ以上の改変を（たとえば、交雑育種または複数の遺伝子標的化戦略を介して）さらに備えてもよい。ある実施形態では、ヒト化CD47遺伝子（すなわち、ヒト化CD47遺伝子がヒトCD47タンパク質の細胞外部分と齧歯類CD47タンパク質の細胞内部分を有するCD47ポリペプチドをコードするよう、内因性齧歯類CD47遺伝子のエクソン1とエクソン8（およびそれに伴い任意の下流のエクソン）に動作可能に連結されたヒトCD47遺伝子のエクソン2～7）を備える齧歯類が、ヒト化SIRP 遺伝子（たとえば、ヒト化SIRP 遺伝子が、ヒトSIRP タンパク質の細胞外部分（たとえば28～362残基に相当するアミノ酸）と齧歯類SIRP タンパク質の細胞内部分を有するSIRP ポリペプチドをコードするよう、内因性齧歯類SIRP 遺伝子のエクソン1と5～8に動作可能に連結されたヒトSIRP 遺伝子のエクソン2～4。たとえば、参照により本明細書に援用される2014年9月23日に出願されたPCT/US2014/056910を参考のこと）を備える齧歯類と交配される。10

【0131】

マウスにおいて、ヒト化CD47遺伝子を用いる実施形態（すなわち、ヒト部分およびマウス部分を含むCD47タンパク質をコードするCD47遺伝子を伴うマウス）が本明細書では広く検討されているが、ヒト化CD47遺伝子を備えるその他の非ヒト動物も提供される。一部の実施形態では、このような非ヒト動物は、内因性CD47プロモーターに動作可能なように連結したヒト化CD47遺伝子を備える。一部の実施形態では、このような非ヒト動物は、内因性遺伝子座からヒト化CD47タンパク質を発現し、この場合において、ヒト化CD47タンパク質はヒトCD47タンパク質のアミノ酸残基16～292（または19～141、または19～127）を備える。このような非ヒト動物には、本明細書に開示されたCD47タンパク質を発現するよう遺伝子改変ができる非ヒト動物のいずれかを含み、例えば、マウス、ラット、ウサギ、ブタ、ウシ（例えば、雌牛、未去勢オスウシ、バッファロー）、シカ、ヒツジ、ヤギ、ニワトリ、ネコ、イヌ、フェレット、靈長類（例えば、マーモセット、アカゲザル）などの哺乳類が含まれる。例えば、好適な遺伝子改変可能ES細胞が直ちに利用可能でない非ヒト動物については、遺伝子改変を含む非ヒト動物を作るために他の方法が採用される。このような方法には、例えば、非ES細胞ゲノム（例えば、線維芽細胞または人工多能性細胞）を改変すること、および体細胞核移植（SCNT）を利用して好適な細胞、例えば除核卵母細胞、に遺伝子改変されたゲノムを導入すること、および改変された細胞（例えば、改変された卵母細胞）を胚の形成に好適な条件下で非ヒト動物に懐胎させることが挙げられる。20

【0132】

非ヒト動物ゲノム（例えば、ブタ、メスウシ、齧歯類、ニワトリなどのゲノム）の改変方法には、例えば、ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ZFN）またはTALエフェクターヌクレアーゼ（transcription activator-like effector nuclease、TALEN）を用いて、ゲノムを改変し、ヒト化CD47遺伝子を含ませる方法などが含まれる。30

【0133】

一部の実施形態では、本発明の非ヒト動物は哺乳動物である。一部の実施形態では、本発明の非ヒト動物は、例えばトビネズミ上科またはネズミ上科の小さな哺乳動物である。一部の実施形態では、本発明の遺伝子改変動物は齧歯類である。一部の実施形態では、本発明の齧歯類はマウス、ラット、ハムスターから選択される。一部の実施形態では、本発明の齧歯類はネズミ上科から選択される。一部の実施形態では、本発明の遺伝子改変動物は、ヨルマウス科（例えば、マウス様のハムスター）、キヌゲネズミ科（例えば、ハムスター、New Worldラットおよびマウス、ハタネズミ）、ネズミ科（純種のマウスおよびラット、アレチネズミ、トゲマウス、タテガミネズミ）、アシナガマウス科（キノボリマウス、ロックマウス、オジロラット、マダガスカルラットおよびマウス）、トゲヤマネ科（例えば、トゲヤマネ）、およびメクラネズミ科（例えば、メクラネズミ、タケネズミ、および高原モグラネズミ）から選択された科由来の動物である。一部の実施形態では、本発明の遺伝子改変齧歯類は、純種のマウスまたはラット（ネズミ科）、アレチネズミ、トゲマウス、およびタテガミネズミから選択される。一部の実施形態では、本発明の遺伝子改40

変マウスはネズミ科のメンバーからのものである。一部の実施形態では、本発明の非ヒト動物は齧歯類である。一部の実施形態では、本発明の齧歯類はマウスおよびラットから選択される。一部の実施形態では、本発明の非ヒト動物はマウスである。

【 0 1 3 4 】

一部の実施形態では、本発明の非ヒト動物は、C57BL/A、C57BL/An、C57BL/GrFa、C57BL/KaLwN、C57BL/6、C57BL/6J、C57BL/6ByJ、C57BL/6NJ、C57BL/10、C57BL/10ScSn、C57BL/10Cr、およびC57BL/01aから選択されるC57BL系のマウスである齧歯類である。一部の特定実施形態では、本発明のマウスは、129P1、129P2、129P3、129X1、129S1（例えば、129S1/SV、129S1/SvIm）、129S2、129S4、129S5、129S9/SvEvH、129/SvJae、129S6（129/SvEvTac）、129S7、129S8、129T1、129T2である系統からなる群から選択される129系統である（例えば、Festing et al., 1999, *Mammalian Genome* 10:836; Auerbach, W. et al., 2000, *Biotechniques* 29(5):1024-1028, 1030, 1032を参照）。一部の実施形態では、本発明の遺伝子改変マウスは、前述の129系と前述のC57BL/6系との混合である。一部の実施形態では、本発明の遺伝子改変マウスは、前述の129系の混合、または前述のBL/6系の混合である。一部の実施形態では、本明細書に記述された混合の129系は129S6（129/SvEvTac）系である。一部の実施形態では、本発明のマウスはBALB系（例えばBALB/c系）である。一部の実施形態では、本発明のマウスはBALB系と別の前述の系との混合である。

【 0 1 3 5 】

一部の実施形態では、本発明の非ヒト動物はラットである。一部の実施形態では、本発明のラットは、ウィスター・ラット、LEA系、Sprague Dawley系、フィッシャー系、F344、F6およびDark Agoutiから選択される。一部の実施形態では、本明細書に記述されたラット系は、ウィスター、LEA、Sprague Dawley、フィッシャー、F344、F6、およびDark Agoutiから成る群から選択された二つ以上の系の混合である。

ヒト化CD47遺伝子を有する非ヒト動物を用いる方法

【 0 1 3 6 】

CD47変異およびトランスジェニック非ヒト動物（例えば、ミニブタ）および細胞が報告されている（Koshimizu H. et al. (2014) *PLoS One*, 9(2):e89584; Lavender, K.J. et al. (2014) *J. Immunol. Methods*, 407:127-134; Tena, A. et al. (2014) *Am. J. Transplant.* doi: 10.1111/ajt.12918; Lavender K.J. et al. (2013) *Blood*, 122(25):4013-4020; Tena, A. et al. (2012) *Transplantation* 94(10S):776; Wang, C. et al. (2011) *Cell Transplant.* 20(11-12):1915-1920; Johansen, M.L. and Brown, E.J. (2007) *J. Biol. Chem.* 282:24219-24230; Wang, H. et al. (2007) *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 104:13744-13749; Tulasne D. et al. (2001) *Blood*, 98(12):3346-52; Oldenborg, P. et al. (2000) *Science* 288:2051-2054; Verdrengh, M. et al. (1999) *Microbes Infect.* 1(10):745-751; Chang, H.P. et al. (1999) *Learn Mem.* 6(5):448-457; Wang, X.Q. et al. (1999) *J. Cell Biol.* 147(2):389-400; Lindberg, F.P. et al. (1996) *Science* 274(5288):795-798）。かかる動物は、たとえばCD47の発現、機能および制御の分子的状況などを決定するためのさまざまなアッセイにおいて用いられている。少ながらぬ種差が発見されている。実際に、非肥満性糖尿病／重症複合型免疫不全（NOD/SCID）マウスは、ヒトCD47と相互作用可能なSIRP タンパク質を発現し、ヒト免疫系の構成要素を有するマウスモデルの開発のために広範に用いられている（たとえば、Takenaka, K. et al. (2007) *Nat. Immunol.* 8(120:1313-1323を参照のこと）。これらマウス中に存在するSIRP 対立遺伝子は、他のマウス系統中に存在する典型的なSIRP 対立遺伝子ではなく、一般的に種間でCD47とSIRP の間に交差反応はほとんど無い。また、マウス細胞上のCD47は、ほとんど完全な移動性を有している一方で、ヒト細胞上のCD47は約30%～40%のみを示すことが報告されている（Bruce, L. et al. (2003) *Blood* 101:4180-4188; Mouro-Chanteloup, L. et al. (2000) *VoxSanguinis* 78:P030; Mouro-Chanteloup 50

, L. et al. (2003) Blood 101:338-344) ゆえに、NOD/SCIDマウスは制限がないわけではない。たとえば、複数の系統のヒト造血発生が、一部の遺伝的背景において裏付けることができるが(たとえば、BALB/c $Rag2^{-/-}$ $IL-2R\gamma^{-/-}$)、他の細胞型のホメオスタシスには役に立たないままである(たとえば、T細胞およびNK細胞。たとえばGimeno, R. et al. (2004) Blood 104:3886-3893; Traggiai, E. et al. (2004) Science 304:104-107; Legrand, N. et al. (2006) Blood 108:238-245を参照のこと)。さらに、CD47はまた、他の細胞表面タンパク質を相互作用し、二方向性のシグナル伝達をもたらすことも知られている。従って、たとえば生着および貪食などのさまざまな生物プロセスにおけるCD47依存性の機能の解明に関し、既存のマウスは非効率的なインビオ系となっている。さらに、既存のマウスは、CD47標的化治療の開発に対し、次善のインビオ系となっている。

【0137】

本発明の非ヒト動物は、さまざまなアッセイに有用なヒトCD47を発現する、改善されたインビオシステムおよび生体物質(例えば、細胞)の供給源を提供する。さまざまな実施形態で、本発明の非ヒト動物は、CD47を標的とする療法および/またはCD47-SIRPシグナル伝達を調節する療法の開発に使用される。さまざまな実施形態では、本発明の非ヒト動物は、ヒトCD47に結合する候補治療薬(例えば、抗体)をスクリーニング、および開発するために使用される。さまざまな実施形態では、本発明の非ヒト動物は、ヒトCD47とヒトSIRPの相互作用を阻害する候補治療薬(例えば、抗体)をスクリーニングおよび開発するために使用される。さまざまな実施形態で、本発明の非ヒト動物を用いて、本明細書に記述される非ヒト動物の細胞表面上のヒト化CD47の拮抗薬および/または作動薬の結合プロファイルが決定される。一部の実施形態では、本発明の非ヒト動物を用いて、ヒトCD47に結合する一つ以上の治療用抗体候補のエピトープ(複数含む)が決定される。

【0138】

さまざまな実施形態では、本発明の非ヒト動物は、抗CD47抗体の薬物動態プロファイルを決定するために使用される。さまざまな実施形態で、本発明の一つ以上の非ヒト動物および一つ以上の対照または参考非ヒト動物が、それぞれ、一つ以上の治療用抗CD47抗体候補にさまざまな用量(例えば、0.1mg/kg、0.2mg/kg、0.3mg/kg、0.4mg/kg、0.5mg/kg、1mg/kg、2mg/kg、3mg/kg、4mg/kg、5mg/kg、7.5mg/kg、10mg/kg、15mg/kg、20mg/kg、25mg/kg、30mg/kg、40mg/kg、または50mg/kgまたはそれ以上)で曝露される。治療用抗体候補は、任意の所望される投与経路(たとえば、皮下、静脈内、筋肉内、腹腔内など)を介して投与されてもよい。非ヒト動物(ヒト化および対照)から血液がさまざまな時点(例えば、0時間、6時間、1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日、10日、11日、または最大30日またはそれ以上の日数)で単離される。さまざまなアッセイは、総IgG、抗治療抗体反応、凝集などを含むがこれらに限定されない、本明細書に記述された非ヒト動物から取得されたサンプルを使用して、投与された候補治療抗体の薬物動態プロファイルを決定するために実施される場合がある。

【0139】

さまざまな実施形態で、本発明の非ヒト動物を使用して、CD47シグナル伝達の阻害または調節の治療効果が測定され、および細胞変化の結果としての遺伝子発現への効果が測定される。さまざまな実施形態で、本発明の非ヒト動物またはそれから単離された細胞は、非ヒト動物の細胞表面上のヒト化CD47タンパク質(またはCD47タンパク質のヒト部分)に結合する治療薬候補に曝露され、それに引き続く期間の後、例えば、腫瘍(または腫瘍細胞)の接着、血管新生、アポトーシス、炎症、遊走、貪食、増殖およびクリアランスなどのCD47依存性プロセスに対する効果について分析される。

【0140】

本発明の非ヒト動物はヒト化CD47タンパク質を発現しており、ゆえに、例えば、特に拮抗薬または作動薬がヒトSIRP配列またはエピトープに特異的である場合に、CD47の拮抗薬または作動薬の結合または機能を検証するための結合アッセイおよび機能アッセイを使用するためのヒト化CD47の供給源としての役割を果たす細胞、細胞株、および細胞培養物

10

20

30

40

50

を生成することができる。さまざまな実施形態で、本発明の非ヒト動物から単離された細胞を使用して、治療用抗体候補によって結合されるCD47のエピトープを決定することができる。

【0141】

本発明の非ヒト動物からの細胞は、その場限りで単離して使用するか、または多世代にわたって培養物中で維持することができる。さまざまな実施形態で、本発明の非ヒト動物からの細胞は、不死化され、無期限に培養物中で（例えば、連続培養物中で）維持される。

【0142】

さまざまな実施形態で、本発明の細胞および／または非ヒト動物は、ヒトCD47シグナル伝達を調節する治療薬候補をスクリーニングおよび開発するための、（例えば、BまたはT細胞を用いる）生存および／または増殖のアッセイにおいて使用される。CD47の活性化または欠失は、細胞増殖の制御に重要な役割を果たし得、CD47によるアポトーシスの誘導は、CD47の細胞外ドメインの特異的エピトープの活性化から生じる場合があり、従って、CD47調節物質候補（たとえば、拮抗薬または作動薬）は、本発明の非ヒト動物の細胞および／または本明細書に記述された非ヒト動物を使用して、特定され、特徴解析され、および開発されてもよい。一部の実施形態では、本発明の細胞および／または非ヒト動物は、CD47の存在下および非存在下での特定細胞（複数含む）（例えば、癌細胞）の増殖またはアポトーシスに対する効果を決定するための生存または死亡アッセイ（複数含む）で使用される。

10

【0143】

さまざまな実施形態で、本発明の細胞および／または非ヒト動物は、移植されたヒト細胞に対する生理的（例えば、免疫）反応におけるCD47介在性の機能を決定するための、異種（例えば、ヒト）の細胞の異種移植に使用される。一部の実施形態では、ヒトCD47に結合する、またはその一つ以上の機能を阻害する治療薬候補が、本発明の非ヒト動物において特徴解析される。適切な測定法には、さまざまな細胞アッセイ、増殖アッセイ、血清免疫グロブリン分析（例えば、抗体価）、細胞毒性アッセイ、およびリガンド・受容体相互作用の特徴付け（免疫沈降アッセイ）が含まれる。一部の実施形態では、本発明の非ヒト動物は、抗原に対する免疫反応を制御するCD47介在性の機能を特徴解析するために使用される。一部の実施形態では、抗原は新生物と関連している。一部の実施形態では、抗原は、治療を必要とする一人以上のヒト患者が患っている疾患または状態と関連する標的である。

20

【0144】

さまざまな実施形態で、本発明の非ヒト動物は、新たなリンパ球およびその免疫機能のCD47依存性の制御を調節する化合物または生物学的製剤となる可能性のある治療剤を決定するための、移植または養子移入実験で使用される。さまざまな実施形態で、本発明の非ヒト動物は、ヒトB細胞が移植される。

30

【0145】

さまざまな実施形態で、本発明の非ヒト動物の細胞は、ヒトCD47を調節する治療薬候補をスクリーニングおよび開発するための、細胞遊走アッセイまたは拡散アッセイで使用される。かかるプロセスは、創傷治癒、分化、増殖および生存をはじめとする多くの細胞プロセスに必要である。

40

【0146】

さまざまな実施形態で、本発明の非ヒト動物の細胞は、CD47依存性の貪食制御を調節する化合物または生物学的製剤となる可能性がある治療剤を決定するための貪食アッセイに使用される。

【0147】

さまざまな実施形態で、本発明の非ヒト動物の細胞は、CD47依存性の腫瘍細胞の制御および／またはアポトーシスを調節する化合物または生物学的製剤となる可能性がある治療剤を決定するための、腫瘍細胞の成長（または増殖）アッセイで使用される。

50

【0148】

さまざまな実施形態で、炎症性の疾患、または状態の一つ以上の機能のCD47依存性の制御を調節する化合物または生物学的製剤の可能性のある治療剤を決定するためのインビボシステムを提供するために、本発明の一つ以上の非ヒト動物において、炎症性の疾患、または状態が誘導される。一部の実施形態では、炎症性の疾患または状態は、新生物と関連している。

【0149】

さまざまな実施形態で、抗血管新生状態の一つ以上の機能のCD47依存性の制御を調節する化合物または生物学的製剤の可能性のある治療剤を決定するためのインビボシステムを提供するために、本発明の一つ以上の非ヒト動物において、抗血管新生状態が誘導される。治療有効性を決定するために評価され得る例示的な機能としては、ケモカイン発現、一酸化窒素(NO)刺激応答、および血流の回復が挙げられる。

10

【0150】

本発明の非ヒト動物は、薬剤またはワクチンの分析および検査のためのインビボシステムを提供する。さまざまな実施形態で、候補薬剤またはワクチンが本発明の一つ以上の非ヒト動物に送達され、その後非ヒト動物をモニターして、薬剤またはワクチンに対する免疫反応、薬剤またはワクチンの安全性プロファイル、または疾患または状態に対する効果の一つ以上を決定する場合がある。安全性プロファイルを決定するために使用される例示的方法には、毒性、最適な用量濃度、薬剤またはワクチンの有効性、および潜在的リスク因子の測定を含む。このような薬剤またはワクチンはこのような非ヒト動物で改善および/または開発される場合がある。

20

【0151】

本発明の非ヒト動物は、CD47標的化薬剤の薬物動態特性を評価するためのインビボシステムを提供する。さまざまな実施形態で、CD47標的化薬剤は、本発明の一つ以上の非ヒト動物に送達または投与され、次いで、当該非ヒト動物（またはそれから単離された細胞）をモニターするか、またはそれらに対して一つ以上のアッセイを実施して、当該非ヒト動物に対する薬剤の効果を決定してもよい。薬物動態特性には、動物がどのように薬剤を処理してさまざまな代謝物にするか（または、有毒代謝物を含む一つ以上の薬剤代謝物の有無の検出）、薬剤半減期、投与後の薬剤の循環レベル（例えば、薬剤の血清濃度）、抗薬物反応（例えば、抗薬物抗体）、薬剤の吸収および分布、投与経路、薬剤の排泄および/またはクリアランス経路を含むがこれらに限定されない。一部の実施形態では、薬剤（例えば、CD47調節物質）の薬物動態特性および薬力学特性は、本発明の非ヒト動物で、またはその使用を通してモニターされる。

30

【0152】

本発明の非ヒト動物は、CD47標的化薬剤の標的毒性を評価するためのインビボシステムを提供する。さまざまな実施形態で、CD47標的化薬剤は、本発明の一つ以上の非ヒト動物に送達または投与され、次いで、当該非ヒト動物（またはそれから単離された細胞）をモニターするか、またはそれらに対する一つ以上のアッセイを実施して、当該非ヒト動物に対する薬剤の標的毒性効果を決定してもよい。一般的に、薬剤は標的の一つ以上の機能を調節することを目的としている。一例を挙げると、CD47調節物質は、一つ以上の細胞の表面上のCD47分子と何らかの方法で相互作用することによりCD47介在性の機能（例えば、CD47誘導性アポトーシス）を調節することを目的としている。一部の実施形態では、このような調節因子は、調節因子の望ましい薬理作用の誇張である有害作用を持つ場合がある。このような効果は標的効果（on-target effects）と呼ばれる。例示的な標的効果には、高すぎる用量、慢性的な活性化/不活性化、および正しくない組織での正しい作用が挙げられる。一部の実施形態では、本発明の非ヒト動物で、またはその使用を通して特定されたCD47標的化薬剤の標的効果は、従前には知られていなかったCD47の機能（複数含む）を決定するために使用される。

40

【0153】

本発明の非ヒト動物は、CD47標的化薬剤の標的外毒性（off-target toxicity）を評価

50

するためのインビオシステムを提供する。さまざまな実施形態で、CD47標的化薬剤は、本発明の一つ以上の非ヒト動物に送達または投与され、次いで、当該非ヒト動物（またはそれから単離された細胞）をモニターするか、またはそれらに対して一つ以上のアッセイを実施して、当該非ヒト動物に対する薬剤の標的外毒性効果を決定してもよい。標的外効果は、薬剤が意図しない標的と相互作用する時（例えば、共通エピトープに対する交差反応）に発生する可能性がある。このような相互反応は、意図するまたは意図しない組織で起こる可能性がある。一例を挙げると、薬剤の鏡像異性体（エナンチオマー）は標的外毒性効果をもたらす可能性がある。さらに、薬剤は異なる受容体サブタイプと不適切に相互作用し、それを非意図的に活性化する可能性がある。例示的標的外効果には、誤った標的がある組織の組織とは関係のない、誤った標的の誤った活性化／阻害を含む。一部の実施形態では、CD47標的化薬剤の標的外効果は、当該薬剤を本発明の非ヒト動物に投与した効果と、一つ以上の参照非ヒト動物に投与した効果とを比較することによって決定される。10

【0154】

一部の実施形態では、アッセイを行うことは、薬剤が投与される非ヒト動物の表現型（例えば、体重における変化など）および／または遺伝子型への効果を決定することを含む。一部の実施形態では、アッセイを行うことは、CD47調節物質（例えば、拮抗薬または作用薬）のロット間変動を決定することを含む。一部の実施形態では、アッセイを行うことは、本発明の非ヒト動物に投与されたCD47標的化薬剤の効果と、参照非ヒト動物に投与されたCD47標的化薬剤の効果の間の差異を決定することを含む。さまざまな実施形態で、参照非ヒト動物は、本明細書に記述された変更、本明細書に記述されたものとは異なる変更（例えば、破壊、欠失またはそうでなければ非機能的CD47遺伝子を有するもの）を有していてもよく、または変更を有していないてもよい（すなわち、野生型非ヒト動物）。20

【0155】

CD47標的化薬剤の薬物動態特性、標的毒性、および／または標的外毒性を評価するために非ヒト動物で（またはそれから単離された細胞で、および／またはそれらを使用して）測定される例示的パラメーターには、凝集、オートファジー、細胞分裂、細胞死、補体媒介溶血、DNA完全性、薬物特異抗体力価、薬剤代謝、遺伝子発現アレイ、ヘマトクリット値、血尿、代謝活性、ミトコンドリア活性、酸化ストレス、貪食、タンパク質生合成、タンパク質分解、タンパク質分泌、ストレス反応、標的組織薬剤濃度、標的外組織薬剤濃度、転写活性などが含まれるがこれらに限定されない。さまざまな実施形態で、本発明の非ヒト動物は、CD47調節物質の薬学的有効量を決定するために使用される。30

【0156】

本発明の非ヒト動物は、癌で使用する候補治療薬の開発および特徴付けのための、改善されたインビオシステムを提供する。さまざまな実施形態で、本発明の非ヒト動物に腫瘍が移植され、その後に、一つ以上の候補治療薬を投与する場合がある。一部の実施形態では、候補治療薬には、多特異性抗体（例えば、二重特異性抗体）または抗体カクテルを含む場合があり、一部の実施形態では、候補治療薬は、例えば、連側的または同時に投薬される単一特異性抗体の投与などの併用療法を含む。腫瘍は、非ヒト動物内の一つ以上の場所で定着するために十分な時間を与えられる場合がある。腫瘍細胞増殖、成長などは、たとえば治療薬候補（複数含む）の投与前と後の両方で測定されてもよい。望ましい場合には、治療薬候補の細胞毒性もまた、非ヒト動物で測定されてもよい。40

【0157】

本発明の非ヒト動物は、養子免疫伝達を介したヒトの細胞間相互作用のメカニズムを明らかにする改善されたインビオシステムを提供する。さまざまな実施形態で、本発明の非ヒト動物は、腫瘍異種移植片を移植され、次いで、腫瘍浸潤性リンパ球の第二の移植が養子免疫伝達により非ヒト動物に移植され、固体腫瘍または他の悪性腫瘍の根絶におけるその有効性を決定され得る。かかる実験は、非ヒト動物の内因性CD47との競合が無く、ヒトCD47は排他的に存在していることを理由に、ヒト細胞を用いて行われてもよい。あるいは、かかる実験は、NOD/SCIDまたはBRG (BALB/c Rag2^{-/-} IL-2R^{c^{-/-}})の背景からのマウス細胞の使用を含んでもよい。さらに、異種移植における使用のための療法および医薬50

は、かかる非ヒト動物において改善、および／または開発されることがある。

【0158】

本発明の非ヒト動物は、生着を介したヒト造血幹細胞の維持および発達のための改善されたインビオシステムを提供する。さまざまな実施形態で、本発明の非ヒト動物は、当該非ヒト動物内でのヒト幹細胞の改善された発達および維持を提供する。さまざまな実施形態で、当該非ヒト動物の血液、骨髓、脾臓および胸腺において、分化型ヒトB細胞およびT細胞の群の増加が観察される。さまざまな実施形態で、当該非ヒト動物の血液、骨髓、脾臓および胸腺の細胞において、T細胞およびNK細胞の最適なホメオスタシスが観察される。さまざまな実施形態で、本発明の非ヒト動物は、一つ以上の参照非ヒト動物と比較し、赤血球（RBC）のレベルまたは量の増加を示す。

10

【0159】

本発明の非ヒト動物は、ヒト細胞標的化治療薬剤を評価するために用いることができる。さまざまな実施形態で、本発明の非ヒト動物にヒト細胞が移植され、ヒト細胞などを標的とする薬剤候補がこのような非ヒト動物に投与される。次に薬剤の治療有効性が、薬剤の投与後に非ヒト動物のヒト細胞をモニターすることによって決定される。非ヒト動物で試験できる薬剤には、小分子化合物、すなわち1500kD、1200kD、1000kD、または800ダルトン未満の分子量の化合物、および大分子化合物（タンパク質など、例えば抗体）の両方を含み、これらはヒト細胞を標的化する（例えば、結合するおよび／または作用する）ことによってヒト疾患および状態の治療に対して意図する治療効果を持つ。

【0160】

20

一部の実施形態では、薬剤は抗癌剤であり、ヒト細胞は癌細胞であり、これらは原発癌の細胞または原発癌から定着した細胞株の細胞でありうる。これらの実施形態で、本発明の非ヒト動物はヒト癌細胞を移植され、抗癌剤が非ヒト動物に投与される。薬剤の有効性は、非ヒト動物のヒト癌細胞の成長または転移が、薬剤の投与の結果として阻害されるかどうかを評価することで決定することができる。

【0161】

特定の実施形態では、抗癌剤は、ヒト癌細胞上の抗原に結合する抗体分子である。特定の実施形態では、抗癌剤は、ヒト癌細胞上の抗原、およびその他のヒト細胞（例えばB細胞およびT細胞などのヒト免疫系の細胞（または「ヒト免疫細胞」）上の抗原に結合する二重特異性抗体である。

30

【0162】

一部の実施形態では、本発明の非ヒト動物に、ヒト免疫細胞、またはヒト免疫細胞へと分化する細胞が生着する。生着ヒト免疫細胞を有するかかる非ヒト動物は、ヒト癌細胞が移植され、たとえばヒト癌細胞上の抗原とヒト免疫細胞（例えば、T細胞）上の抗原に結合する二重特異性抗体などの抗癌剤が投与される。二重特異性抗体の治療有効性は、非ヒト動物におけるヒト癌細胞の成長または転移を阻害するその能力に基づき評価され得る。特定の実施形態では、本発明の非ヒト動物は、ヒト免疫細胞（特に、T細胞、B細胞、NK細胞が挙げられる）を生じさせるヒトCD34⁺ 造血系前駆細胞が生着される。ヒトB細胞リンパ腫細胞（たとえば、Raji細胞）が、ヒト免疫細胞が生着したかかる非ヒト動物に移植され、次いで、腫瘍抗原（例えば、CD20などの正常なB細胞と特定のB細胞悪性腫瘍上の抗原）と、T細胞受容体のCD3サブユニットに結合する二重特異性抗体が投与され、当該非ヒト動物における当該二重特異性抗体の腫瘍成長阻害に関する能力が検証される。

40

【実施例】

【0163】

以下の実施例は、本発明の方法および組成物をどのように作成し使用するかを当業者に説明するために提供されており、発明者がその発明として見なすものの範囲を限定することを意図していない。別途示されていない限り、温度は摂氏で示され、圧力は大気圧またはその近くである。

実施例1 内因性Cluster of Differentiation 47 (CD47)遺伝子のヒト化。

【0164】

50

本実施例は、齧歯類（例えば、マウス）などの非ヒト哺乳動物においてcluster of differentiation 47 (CD47) をコードする内因性遺伝子をヒト化する例示的方法を示す。本実施例に記述された方法は、任意のヒト配列、または所望の場合にはヒト配列（または配列断片）の組み合わせを使用して、非ヒト動物の内因性CD47遺伝子をヒト化するために用いることができる。本実施例において、マウスの内因性CD47遺伝子のヒト化のために、細菌人工染色体（BAC）クローンRP11-69A17にあるヒトCD47が用いられる。

【0165】

内因性CD47遺伝子の細胞外N末端IgV領域と5つの膜貫通ドメインをコードする遺伝物質のヒト化のための標的化ベクターは、VELOCIGENE（登録商標）技術を使用して構築された（参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第6,586,251号およびValenzuela et al. (2003), High-throughput engineering of the mouse genome coupled with high-resolution expression analysis, Nature Biotech. 21(6):652-659を参照のこと）。

【0166】

簡潔に述べると、マウス細菌人工染色体（BAC）クローンRP23-230L20（Invitrogen社）を改変し、内因性CD47遺伝子のエクソン2～7を含有する配列を削除し、ヒトCD47ポリペプチドのアミノ酸16～292をコードしているヒトBACクローンRP11-69A17（Invitrogen社）を用いてヒトCD47遺伝子のエクソン2～7を挿入した。アイソフォーム2のエクソン1、8および9、ならびに5' 非翻訳領域（UTRs）および3' 非翻訳領域に相当するゲノムDNAを含有する内因性DNAは維持された。BACクローンRP11-69A17に含まれるヒトCD47配列の配列解析は、すべてのCD47のエクソンとスプライシングシグナルを確認した。配列解析で、当該配列が参照ゲノムおよびCD47転写物 NM_001777.3およびNM_198793.2に一致したことが明らかとなった。内因性CD47遺伝子のエクソン2～7に相当するゲノムDNA（約30.8kb）は、細菌細胞中で相同組み換えによりBACクローンRP23-230L20中に置き換えられ、BACクローンRP11-69A17からのヒトCD47遺伝子のエクソン2～7に相当する約23.9kbのヒトゲノムDNAと、リコンビナーゼ認識部位に隣接する自己削除ネオマイシンカセットに相当する約4995bpを含有するDNA断片が挿入された（loxP-hUb1-em7-Neo-pA-mPrm1-Crei-loxP; 参照により本明細書に援用される米国特許第8,697,851号、第8,518,392号および第8,354,389号を参照のこと）。自己削除ネオマイシンカセットは、ヒトCD47遺伝子のエクソン2～7を含有する約23.9kbのヒトDNA断片の末端に付加された（図2）。標的化ベクターは、5' から3' に向かって、BACクローンRP23-230L20由来の約39kbのマウスゲノムDNAを含有する5' ホモロジーアーム、BACクローンRP11-69A17由来の約29.3kbのヒトゲノムDNA（ヒトCD47遺伝子のエクソン2～7を含有する）、lox P部位に隣接した自己削除ネオマイシンカセット、そしてBACクローンRP23-230L20由来の約98.8kbのマウスゲノムDNAを含有した。細菌細胞において上述の標的化ベクターを用いた相同組み換えを行った後、改変RP23-230L20 BACクローンを作製し、マウス5' UTR、マウスエクソン1、ヒトエクソン2～7、マウスエクソン8～9、およびマウス3' UTRを含有するヒト化CD47遺伝子を得た。ヒト化CD47の4つの推定選択的スプライス型アイソフォームのタンパク質配列を表3に示す。表3は、得られたマウスとヒトのアミノ酸が、それぞれマウスDNAとヒトDNAをコードしていたことを示す。

【0167】

上述の改変BACクローンを用いて、F1H4 (50% 129/SvEv/Tac, 50% C57BL/6NTac; Auerbach, W. et al. (2000) Biotechniques 29(5):1024-8, 1030, 1032) マウス胚性幹細胞（ES）をエレクトロポレーションし、エクソン2～7からヒト化された内因性CD47を備える改変ES細胞を作製した。ヒト化CD47遺伝子を含む明確に標的化されたES細胞が、ヒトCD47配列（例えば、エクソン2～7）の存在を検出するアッセイ（Valenzuelaら、上記参照）によって特定され、マウスCD47配列（例えば、エクソン1、8および9ならびに/またはエクソン2～7）の欠失および/または保持を確認した。表4は、上述の内因性CD47遺伝子のヒト化を確認するために使用されたプライマーおよびプローブを示す（図3）。上流挿入点をまたぐヌクレオチド配列には以下が含まれた。これは挿入点の上流の内因性マウス配列（以下の括弧内に含まれ、AsiSI制限酵素部位は斜字で示される）が、挿入点

に存在するヒトCD47配列に連続的に連結されたことを示す：

【化1】

(GCAGACATGA TTACTTCAGA GCTTCAAAG
CTAGATACTG TACCTTGCAT ATTCCAACAC) *GCGATCGC* ATTTAAGAT TTTCCATCCT
AGTGGAAAGA TATGATTGA TTCATCCTAT TTACTTGTA TATTAAAGTA CAGTAGAACCC
TGCCACTTTT (配列番号 33)

自己削除ネオマイシンカセットの5'末端の下流挿入点をまたぐヌクレオチド配列には以下が含まれた。これは挿入点の下流のカセット配列と連続したヒトCD47ゲノム配列を示す(以下の括弧内に含まれ、loxP配列は斜字で示される)：

【化2】

GGATCCATT TAAGTAATAG AATAGGATT
TTAATTGTT CAGTGTTC GTGATAGAGC TGTCTGCAC AGACCTGTTT (CTCGAGATAA
CTTCGTATAA TGTATGCTAT ACGAAGTTAT ATGCATGGCC TCCGCGCCGG GTTTGGCGC
CTCCCGCGGG) (配列番号 34)

ネオマイシンカセットの3'末端の下流挿入点をまたぐヌクレオチド配列には以下が含まれた。これは内因性CD47遺伝子のエクソン7のマウスゲノム配列3' と連続したカセット配列を示す(以下の括弧内に含まれ、loxP配列は斜字で示される)：

【化3】

CATGTCTGGA ATAACCTCGT
ATAATGTATG CTATACGAAG TTATGCTAGT AACTATAACG GTCCTAAGGT AGCGACTAGC
(ATTAGTATGG AAGGTCCGTC CACTGTCCAG GTTCCTCTTG CGGAGCTCTT TGTCTCTCTG
GACTCTGTAT ACACTGCTTG) (配列番号 35)

ネオマイシンカセット(76bp残留)の削除後、挿入点の下流にわたるヌクレオチド配列は以下を含んだ。これは残りのカセット配列loxP配列(以下の括弧内に含まれ、loxP配列は太字で示される)と並置されたヒトおよびマウスのゲノム配列を示す：

【化4】

GGATCCATT
TAAGTAATAG AATAGGATT TTAATTGTT CAGTGTTC GTGATAGAGC TGTCTGCAC
AGACCTGTTT (CTCGAGATAA CTTCGTATAA TGTATGCTAT ACGAAGTTAT GCTAGTAACT
ATAACGGTCC TAAGGTAGCG ACTAGC) ATT AGTATGGAAG GTCCGTCCAC TGTCAGGTT
CCTCTGCGG AGCTCTTGT CTCTCTGGAC TCTGTATACA CTGCTTGCAT (配列番号 36)

【0168】

次いで陽性ES細胞クローニングを、VELOCIMOUSE(登録商標)法を使用してメスのマウスに移植し(たとえば、米国特許第7,294,754号、およびPoueymirou et al., F0 generation mice that are essentially fully derived from the donor gene-targeted ES cells allowing immediate phenotypic analyses, 2007, Nature Biotech. 25(1):91-99を参照のこと)、ヒトCD47遺伝子のエクソン2~7のマウスの内因性CD47遺伝子への挿入を含有する一腹の仔を作製した。内因性CD47 遺伝子のエクソン2~7がヒト化されたマウスを、ヒトCD47遺伝子配列の存在を検出した対立遺伝子アッセイ(Va

10

20

30

40

50

lenzuela et al.、上記参照)の改良型を使用した、尾部断片から単離されたDNAの遺伝子型同定によって再び確認、および同定した。仔は遺伝子型同定され、ヒト化CD47遺伝子構築物に対してヘテロ接合性の動物のコホートを、特徴解析のために選択する。

【表4-1】

表4

名称	プライ	配列 (5' -3')	
	マー		10
7190mTU	フォワード	TGCAGAAGTCACTAGGAGGAAT	(配列番号 21)
	プローブ	TCAGTCAACTCTCTGGGTTGTTCC	(配列番号 22)
	リバース	GTGCCAGACTCACTTCTATCCA	(配列番号 23)
			20
7190mTD	フォワード	TGCTGCCAATATAACGGCTCTG	(配列番号 24)
	プローブ	CAGCTCTCATAGCCAACATATGGTGCC	(配列番号 25)
	リバース	TCAAGCAGAGCCTGGTTATCTG	(配列番号 26)
			30
7190hTU	フォワード	GTCGTCATTCCATGCTTGTAC	(配列番号 27)
	プローブ	TGGAGGCACAAACACTACTGAAGTATAACG	(配列番号 28)
	リバース	GGACAGTGGACTTGTAGAGC	(配列番号 29)
			40
7190hTD	フォワード	GGCTTGGTGGCTGATTGTTCT	(配列番号 30)

【表4-2】

プロー AGCACCCAAACTGATATGCCTGTATTTG (配列番号 31)
 ブ
 リバー TGGGAACCTGGTGTTCAGTCTA (配列番号 32)
 ス

実施例2 マウス赤血球によるヒト化CD47ポリペプチドの発現

10

【0169】

本実施例は、実施例1に従い、ヒト化CD47遺伝子を含有するよう改変された非ヒト動物（例えは、齧歯類）を用いて、CD47調節物質（例えは、抗CD47抗体）をスクリーニングし、たとえは薬物動態および安全性プロファイルなどのさまざまな特性を決定し得ることを示す。本実施例において、実施例1に従い作製され、本明細書に記述されるヒト化CD47ポリペプチドを発現する齧歯類から単離されたマウス赤血球（RBC）上でいくつかの抗CD47抗体をスクリーニングする。

【0170】

簡潔に述べると、ヒト化CD47マウス（n=2）由来の全血2mLを15mL試験管に移し、10分間、4、200xgで遠心した。血漿とバフィーコートを吸引し、次いで15mLのPBSを加え、細胞を穏やかに混合した。混合物を再度5分間、4、200xgで遠心した。上清を吸引し、細胞をさらに2度洗浄した。沈殿したRBCを10mL PBSの最終量に再懸濁した。再懸濁したRBCを最後に10分間、4、200xgで遠心した。パッケージされたRBCの量は0.5mLと推定され、PBSを用いて0.5%濃度まで希釈された（0.5mLのパッケージされたRBC / 100mLのPBS）。実際のRBC濃度は、Cellometer Auto T4（1.5x10⁷/mL；Nexcelom Bioscience社）を用いて決定された。

20

【0171】

80 μLの0.5%マウスRBCを、96ウェルのV底プレートの各ウェルに添加した。抗CD47抗体を各ウェルに添加した（33nMで20 μL）。プレートを穏やかにタッピングして混合し、氷上で30分間インキュベートした。次いで、プレートを染色緩衝液（2%FBS含有PBS）を用いて2回洗浄した。二次抗体Fab-488（Alexa Fluor 488結合AffiniPureマウス抗ヒトIgG、F(ab')₂断片特異的、Jackson Immuno Research社）を10 μg/mLの濃度で各ウェルに添加した。再度、プレートを氷上で30分間インキュベートし、次いで、染色緩衝液を用いて1回洗浄した。各ウェルの細胞を200 μLの染色緩衝液中に再懸濁し、96ウェルフィルタープレートを通してろ過した。プレート中の細胞を、BD ACCURI（商標）C6システム（BD Biosciences社）を用いて分析した。代表的な結果を図4に示す。検証された各抗体に対する上述のアイソタイプ対照の平均蛍光強度（MFI）を表5に示す。

30

【表5】

表5

抗体	MFI	上述のアイソタイプ対照の倍数	
Ab A、hIgG4s	28898	258	
Ab B、hIgG4s	27545	246	
Ab C、hIgG4s	24620	220	10
Ab D、hIgG1	29882	267	
Ab E、hIgG4	33423	298	
対照、hIgG4s	112	-	
対照、hIgG4	112	-	

hIgG4s：エフェクター機能が低下した改変Fc領域を伴うヒト IgG4。

20

【0172】

図4に示されるように、すべての抗CD47抗体はヒト化CD47マウス由来のRBCに結合した。まとめると、本実施例は、(1)本明細書に記述されるヒト化CD47遺伝子を含むよう操作された非ヒト動物(例えば、齧歯類)が、当該非ヒト動物の細胞(例えば、RBC)の表面上にヒト化CD47ポリペプチドを発現していること、および(2)かかる細胞が、CD47調節物質(例えば、CD47抗体)のスクリーニング、およびかかる調節物質の薬物動態プロファイルの決定に有用であることを示している。

実施例3 ヒト化CD47ポリペプチドを発現するマウス赤血球の血球凝集。

【0173】

30

本実施例はさらに、実施例1に従いヒト化CD47遺伝子を含有するよう改変された非ヒト動物(例えば、齧歯類)が、CD47調節物質(例えば、抗CD47抗体)をスクリーニングするためのさまざまなアッセイ(例えば、血球凝集アッセイ)、ならびにたとえば薬物動態および安全性プロファイルなどのさまざまな特性を決定するためのさまざまなアッセイに用いることができることを示す。本実施例において、本明細書に記述されるヒト化CD47ポリペプチドを発現するマウス赤血球(RBC)上でいくつかの抗CD47抗体がスクリーニングされ、血球凝集を促進する抗体濃度が決定される。

【0174】

簡潔に述べると、野生型およびヒト化CD47マウス(n=2)のRBCを、実施例2に記述されるように作製した。20 μLの抗CD47抗体(5倍連続希釈)を96ウェルのV底プレートのウェル1~12にわたって添加し、次いで80 μLの0.5%マウスRBCをプレートのすべてのウェルに添加した。プレートを穏やかにタッピングして混合させ、30分間、室温(24~27℃)でインキュベートした。凝集のエンドポイントは、視覚的に観察された(すなわち、陰性試料ではRBCは底に沈み、陽性試料ではRBCは凝集する)。代表的な結果を図5に示す。ボックスは、ヘム凝集を示すウェルの輪郭を示すためである。

40

【0175】

図5に示されているように、レクチンのみが野生型マウスに凝集を引き起こした。しかし、レクチンに加え、二つの抗CD47抗体(Ab EおよびAb C)が、実施例1に従い作製された二つのヒト化CD47齧歯類のRBCに凝集を誘導した。これら二つの抗体が凝集を誘導した濃度は、11nMからであった。まとめると、本実施例は、本明細書に記述されるヒト化CD

50

47遺伝子を含有するよう操作された非ヒト動物（例えば、齧歯類）を用いて、CD47調節物質（例えば、CD47抗体）の一つ以上の特性（例えば、血球凝集）を評価することができることを示す。

実施例4 ヒト化CD47齧歯類における、CD47調節物質の薬物動態的クリアランス。

【0176】

本実施例は、実施例1に従い、ヒト化CD47遺伝子を含有するよう改変された非ヒト動物（例えば、齧歯類）における、CD47調節物質（例えば、抗CD47抗体）の薬物動態的クリアランスを評価する方法を解説するものである。本実施例において、野生型齧歯類およびヒト化CD47齧歯類（例えば、マウス）に、抗CD47抗体を投与し、ELISAアッセイを用いて抗体の血清レベルを決定した。

10

【0177】

簡潔に述べると、野生型（n=5）またはヒト化CD47のマウスホモ接合体（n=5、上述）に、4つの抗CD47抗体（Ab F、Ab G、Ab HおよびAb I）およびIgG4sアイソタイプ対照抗体（IgG4s）を投与した。当該マウスの遺伝的バックグラウンドは、75% CD57BL/6および25% 129Svであった。各抗体は、5匹のヒト化CD47齧歯類において検証した。全ての抗体は、50mg/kgの投与量で皮下投与された。抗体投与の1日前に、1回、プレ血液を採取した（0日目）。注射後血液は、6時間、1日目、2日目、3日目、4日目、7日目、10日目、および14日目に採取された。血液から、血清分画を分離させ、ELISA免疫アッセイを用いて総ヒト抗体分析に供した。

【0178】

20

簡潔に述べると、ヤギ抗ヒトIgGポリクローナル抗体（Jackson ImmunoResearch社）を96ウェルプレート上にコーティングし、血清中の検証ヒト抗体を捕捉し、次いで、ブレート結合抗体を、西洋ワサビペルオキシダーゼを結合させたヤギ抗ヒトIgGポリクローナル抗体（Jackson ImmunoResearch社）およびTMB基質（BD Pharmingen社）を用いて検出した。血清サンプルは6投与量で連続希釈し、各抗体の参照標準は12投与量で連続希釈した。血清中の薬剤抗体濃度を、Graphpad Prismソフトウェアを使用して作成した参照標準曲線に基づいて算出した。代表的な結果を図6および表6に示す。

【0179】

データから、野生型マウスおよび本明細書に記述されるヒト化マウスに投与された抗体は、良好な容忍性であったことが示された。まとめると、本実施例は、本発明の非ヒト動物を用いて、たとえば循環薬剤レベルなどのCD47標的化薬剤（例えば、抗CD47抗体）の薬物動態的特性を一つ以上評価できることを示している。さらに、本明細書に記述される非ヒト動物を用いて、投与後の副作用を決定することにより、CD47標的化薬剤の毒性を評価できる。

30

【表6】

表6

抗体	血清抗体濃度（ μ g/mL±SEM）						
	6時間	1日目	2日目	3日目	4日目	7日目	10日目
Ab F	116.7±14.0	196.4±10.6	96.0±13.3	24.7±7.0	3.7±0.42	<0.35	<0.35
Ab G	115.0±22.1	198.8±23.4	118.4±20.9	48.3±16.0	2.9±1.97	<0.35	<0.35
Ab H	64.5±3.85	108.0±5.13	32.0±6.08	1.0±0.2	0.4±0.03	0.06±0.03	0.05±0.02
Ab I	51.1±16.6	115.2±14.8	63.8±8.3	11.1±4.2	0.5±0.1	0.1±0.02	<0.35
IgG4s							
アイソ タイプ	458.2±34.4	702.5±32.3	616.6±27.0	567.1±39.5	488.9±45.0	357.0±51.1	307.6±61.1
対照							

40

50

実施例5 ヒト化CD47/SIRP 齧歎類における、CD47調節物質の薬物動態プロファイル

【0180】

本実施例は、(実施例1に従う)ヒト化CD47とSIRP 遺伝子を含有するよう改変された非ヒト動物(例えば、齧歎類)における、CD47調節物質(例えば、抗CD47抗体)の薬物動態的クリアランスを評価する方法を解説するものである。特に、本明細書に記述されるヒト化CD47齧歎類は、内因性部分とヒト部分を含有するヒト化SIRP 遺伝子をさらに含有するよう改変され、そのヒト部分は、ヒトSIRP タンパク質の細胞外ドメイン(例えば、ヒトSIRP タンパク質のアミノ酸28~362)をコードし、その内因性部分は、参照により本明細書に援用される、2014年9月23日に出願されたPCT/US14/56910に記載されている、内因性SIRP タンパク質の細胞内ドメイン(例えば、マウスSIRP タンパク質の膜貫通部分と細胞内部分をコードするアミノ酸)をコードしていた。二重ヒト化CD47/SIRP マウスは、ヒト化SIRP マウスとヒト化CD47マウスを交配させることにより作製された。本実施例において、二重ヒト化CD47/SIRP 齧歎類(例えば、マウス)に、さまざまな抗CD47抗体が投与され、それらに伴う薬物動態プロファイルが決定された。

【0181】

簡潔に述べると、野生型マウス(n=5)と、ヒト化CD47とSIRP 遺伝子のホモ接合体マウス(CD47 ^{hu/hu}SIRP ^{hu/hu}、一群当たりn=5)の群に、選択された抗CD47抗体と、IgG4アイソタイプ対照抗体(hIgG4s)を投与した。当該マウスの遺伝的バックグラウンドは、75% CD57BL/6および25% 129Svであった。全ての抗体は、50mg/kgの投与量で単回皮下投与された。抗体投与の1日前に、1回、プレ血液を採取した(0日目)。注射後血液は、6時間、1日目、2日目、3日目、4日目、7日目、および10日目に採取された。血液から、血清分画を分離させ、ELISA免疫アッセイを用いて総ヒト抗体分析に供した(上述)。さらに、ヘマトクリット値を、6時間、1日目、2日目、3日目、4日目、7日目、および10日目に測定し、尿検査を必要に応じて行い(6時間、および尿の色が黄色ではないとき)、赤血球数を決定した。代表的な結果を図7~9に示す。

【0182】

図7および8に示されるように、すべての抗CD47抗体は、CD47 ^{hu/hu}SIRP ^{hu/hu} マウスにおいて、標的介在性クリアランスを示し、特に、多くが同様の薬物動態プロファイルを示した。さらに一つの抗CD47抗体(Ab F)の一価型は、二価の同等物よりも高い生体利用効率を示した(図8)。本発明者らは、ヒト化CD47と、二重ヒト化動物(すなわち、CD47 ^{hu/hu}SIRP ^{hu/hu} マウス)を用いた複数の実験で、同様の抗体薬物動態プロファイルを観察した。

【0183】

Ab Jは、CD47 ^{hu/hu}SIRP ^{hu/hu} マウスにおいて、検証された他の抗CD47抗体(Ab F、Ab G、Ab Iなど)よりもヘマトクリット値に対する効果が低く、ヘマトクリット値の変化は対照(hIgG4s)と同等であった。2~4日目のヘマトクリットの測定値は、正常範囲から最も大きな降下を示し(約38.5~45.1%)、それにはAb F、GおよびIが投与された群が含まれた。特に、Ab Fの一価型は、検証された他の抗体と比較し、ヘマトクリットに対して遅延型の低減効果を示した。本発明者らは、さまざまな処置群の間のヘマトクリット値における差異は、さまざまな抗体により認識されるエピトープにおける差異に起因すると推測した。また、選択された抗CD47抗体を投与されたマウスは、6時間で、ヘムに対し尿検査が陽性を示した。たとえば、Ab JおよびAb Fの各処置群は、1日目、1匹のマウスがヘム陽性であった一方、他のすべての時点では陰性であった。有意な体重の減少(>20%)はいずれの処置群でも観察されなかった。

【0184】

まとめると、本実施例は、本発明の非ヒト動物は、たとえば循環薬剤レベルなどの一つ以上のCD47標的薬剤(例えば、一つ以上の抗CD47抗体)の薬物動態の特性および/またはプロファイルを評価するためのインビボシステムを提供することを示す。さらに、他のヒト化遺伝子(例えば、ヒト化SIRP)をさらに含有するよう操作された本明細書に記述される非ヒト動物は、一つ以上のCD47標的薬剤の標的介在性クリアランスを評価するために

10

20

30

40

50

用いることができる。

均等

【0185】

本発明の少なくとも一つの実施形態のこのような記述されたいくつかの側面を持つ、さまざまな修正、変更、および改善を当業者であれば容易に思いつくことが当業者には理解されるはずである。このような修正、変更、および改善は本開示の一部であることが意図され、本発明の精神および範囲内であることが意図される。従って、前述の説明および図面は例示のみとしてのものであり、本発明は以下の請求項によって詳細に記述される。

【0186】

請求項で請求項を変更するための「第一の」、「第二の」、「第三の」などの順序の用語の使用は、それ自体は一つの請求項要素の別の要素に対する優位性、先行、もしくは順序、または方法の行為が実施される時間的順序を暗示せず、特定の名称を持つ一つの請求項要素を（順序の用語の使用以外は）同じ名称を持つ別の要素から区別して請求項要素を区別するための標識としてのみ使用される。

10

【0187】

本明細書および請求項で使用される場合、「a」および「an」という冠詞は、そうでないことが明確に示されない限り、複数参照を含むと理解されるべきである。群の一つ以上の要素の間に「または」を含む請求項または記述は、そうではないことが示されるかまたはそうでなければ文脈から明らかでない限り、一つ、二つ以上、または群のすべての要素が、所定の生成物またはプロセスに存在する、用いられる、またはそうでなければ関連する場合に満足される。本発明は、群の正確に一つの要素が所定の生成物またはプロセスに存在する、用いられる、またはそうでなければ関連する実施形態を含む。本発明は、二つ以上、または群の要素全体が所定の生成物またはプロセスに存在する、用いられる、またはそうでなければ関連する実施形態も含む。さらに、本発明は、別途指定されない限り、または矛盾または不一致が起こることが当業者には明らかでない限り、変形、組み合わせ、および記載された請求項の一つ以上からの一つ以上の限定、要素、句、記述用語などが、同じ基礎請求項に依存する別の請求項（または関連する任意のその他の請求項）に導入される並べ替えすべてを網羅することを理解すべきである。記載されたような要素が存在する場合（例えば、マーカッシュ群または類似の形式で）、要素の各サブグループも開示され、任意の要素を群から除去することができる。当然のことながら、一般的に、本発明、または本発明の態様が特定の要素、特徴などを含むとして言及される場合、本発明の特定実施形態または本発明の態様は、このような要素、特徴などから成る、または実質的にそれらから成る。簡潔にするために、これらの実施形態はすべての場合において、多くの言葉では本明細書に特に記述されていない。これも当然のことながら、本発明の任意の実施形態または態様は、特定の除外が明細書に列挙されているかどうかにかかわらず、請求項から明示的に除外される可能性がある。

20

【0188】

当業者であれば、アッセイまたは本明細書に記述されたその他のプロセスで得られた値に起因する一般的な標準偏差または誤差を認識するであろう。

30

【0189】

本発明の背景を説明し、その実践に関して追加的詳細を提供するための本明細書の出版物、ウェブサイトおよびその他の参考資料は、参照により本明細書に組み込まれる。

40

例えば、本発明は、以下の項目を提供する。

（項目1）

内因性部分およびヒト部分を備えるCD47遺伝子を備える齧歯類であって、前記内因性部分およびヒト部分が内因性CD47プロモーターと動作可能なように連結されている、前記齧歯類。

（項目2）

前記内因性部分が、内因性CD47遺伝子のエクソン1、およびエクソン7の下流のエクソンを備えている、項目1に記載の齧歯類。

50

(項目3)

前記内因性CD47遺伝子のエクソン1、およびエクソン7の下流のエクソンが、表3に示されるマウスCD47遺伝子の対応するエクソン1、およびエクソン7の下流のエクソンに対し、少なくとも90%、または少なくとも95%同一である、項目2に記載の齧歯類。

(項目4)

前記ヒト部分がヒトCD47ポリペプチドのアミノ酸16～292をコードする、項目1～3のいずれか一項に記載の齧歯類。

(項目5)

前記ヒト部分がヒトCD47遺伝子のエクソン2～7を備える、項目1～3のいずれか一項に記載の齧歯類。

10

(項目6)

前記ヒトCD47遺伝子のエクソン2～7が、表3に示されるヒトCD47遺伝子の対応するエクソン2～7に対し、少なくとも50%同一である、項目5に記載の齧歯類。

(項目7)

前記ヒトCD47遺伝子のエクソン2～7が、表3に示されるヒトCD47遺伝子の対応するエクソン2～7に対し、少なくとも60%同一である、項目5に記載の齧歯類。

(項目8)

前記ヒトCD47遺伝子のエクソン2～7が、表3に示されるヒトCD47遺伝子の対応するエクソン2～7に対し、少なくとも70%同一である、項目5に記載の齧歯類。

20

(項目9)

前記ヒトCD47遺伝子のエクソン2～7が、表3に示されるヒトCD47遺伝子の対応するエクソン2～7に対し、少なくとも80%同一である、項目5に記載の齧歯類。

(項目10)

前記ヒトCD47遺伝子のエクソン2～7が、表3に示されるヒトCD47遺伝子の対応するエクソン2～7に対し、少なくとも90%同一である、項目5に記載の齧歯類。

(項目11)

前記ヒトCD47遺伝子のエクソン2～7が、表3に示されるヒトCD47遺伝子の対応するエクソン2～7に対し、少なくとも95%同一である、項目5に記載の齧歯類。

30

(項目12)

前記ヒトCD47遺伝子のエクソン2～7が、表3に示されるヒトCD47遺伝子の対応するエクソン2～7と同一である、項目5に記載の齧歯類。

(項目13)

ヒトCD47ポリペプチドの細胞外部分および任意選択で膜貫通部分、ならびに内因性CD47ポリペプチドの細胞内部分を備えるCD47ポリペプチドを発現する齧歯類。

(項目14)

前記CD47ポリペプチドが齧歯類シグナルペプチドとともに前記齧歯類の細胞において翻訳される、項目13に記載の齧歯類。

(項目15)

前記内因性CD47ポリペプチドの細胞内部分が、表3に示されるマウスCD47ポリペプチドの細胞質内尾部と少なくとも50%同一であるアミノ酸配列を有している細胞質内尾部を備える、項目13に記載の齧歯類。

40

(項目16)

前記内因性CD47ポリペプチドの細胞内部分が、表3に示されるマウスCD47ポリペプチドの細胞質内尾部と少なくとも60%同一であるアミノ酸配列を有している細胞質内尾部を備える、項目13に記載の齧歯類。

(項目17)

前記内因性CD47ポリペプチドの細胞内部分が、表3に示されるマウスCD47ポリペプチドの細胞質内尾部と少なくとも70%同一であるアミノ酸配列を有している細胞質内尾部を備える、項目13に記載の齧歯類。

(項目18)

50

前記内因性CD47ポリペプチドの細胞内部分が、表3に示されるマウスCD47ポリペプチドの細胞質内尾部と少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を有している細胞質内尾部を備える、項目13に記載の齧歯類。

(項目19)

前記内因性CD47ポリペプチドの細胞内部分が、表3に示されるマウスCD47ポリペプチドの細胞質内尾部と少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を有している細胞質内尾部を備える、項目13に記載の齧歯類。

(項目20)

前記内因性CD47ポリペプチドの細胞内部分が、表3に示されるマウスCD47ポリペプチドの細胞質内尾部と少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を有している細胞質内尾部を備える、項目13に記載の齧歯類。

10

(項目21)

前記内因性CD47ポリペプチドの細胞内部分が、表3に示されるマウスCD47ポリペプチドの細胞質内尾部と同一であるアミノ酸を有している細胞質内尾部を備える、項目13に記載の齧歯類。

(項目22)

前記ヒトCD47ポリペプチドの細胞外部分が、ヒトCD47ポリペプチドの19～141残基に相当するアミノ酸を備える、項目13～21のいずれか一項に記載の齧歯類。

(項目23)

前記ヒトCD47ポリペプチドの細胞外部分が、表3に示されるヒトCD47ポリペプチドの細胞外部分の対応するアミノ酸配列と少なくとも50%同一であるアミノ酸配列を備える、項目13～21のいずれか一項に記載の齧歯類。

20

(項目24)

前記ヒトCD47ポリペプチドの細胞外部分が、表3に示されるヒトCD47ポリペプチドの細胞外部分の対応するアミノ酸配列と少なくとも60%同一であるアミノ酸配列を備える、項目13～21のいずれか一項に記載の齧歯類。

(項目25)

前記ヒトCD47ポリペプチドの細胞外部分が、表3に示されるヒトCD47ポリペプチドの細胞外部分の対応するアミノ酸配列と少なくとも70%同一であるアミノ酸配列を備える、項目13～21のいずれか一項に記載の齧歯類。

30

(項目26)

前記ヒトCD47ポリペプチドの細胞外部分が、表3に示されるヒトCD47ポリペプチドの細胞外部分の対応するアミノ酸配列と少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を備える、項目13～21のいずれか一項に記載の齧歯類。

(項目27)

前記ヒトCD47ポリペプチドの細胞外部分が、表3に示されるヒトCD47ポリペプチドの細胞外部分の対応するアミノ酸配列と少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を備える、項目13～21のいずれか一項に記載の齧歯類。

(項目28)

前記ヒトCD47ポリペプチドの細胞外部分が、表3に示されるヒトCD47ポリペプチドの細胞外部分の対応するアミノ酸配列と少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を備える、項目13～21のいずれか一項に記載の齧歯類。

40

(項目29)

前記ヒトCD47ポリペプチドの細胞外部分が、表3に示されるヒトCD47ポリペプチドの細胞外部分の対応するアミノ酸配列と同一であるアミノ酸配列を備える、項目13～21のいずれか一項に記載の齧歯類。

(項目30)

前記齧歯類が、ヒトSIRP ポリペプチドの細胞外部分と、内因性SIRP ポリペプチドの細胞内部分を備えるSIRP ポリペプチドをコードするSIRP 遺伝子をさらに備えており、この場合において、前記SIRP 遺伝子が任意選択で内因性SIRP 遺伝子のエクソン1、5、

50

6、7および8、ならびにヒトSIRP 遺伝子のエクソン2~4を備えている、項目1~29のいずれか一項に記載の齧歯類。

(項目31)

前記齧歯類がラットまたはマウスである、項目1~30のいずれか一項に記載の齧歯類。

(項目32)

項目1~31のいずれか一項に記載の齧歯類の遺伝子によりコードされるCD47ポリペプチド。

(項目33)

前記コードされるポリペプチドが、配列番号17、配列番号18、配列番号19、または配列番号20と少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%か、またはそれ以上同一であるアミノ酸配列を備えている、項目32に記載のCD47ポリペプチド。

(項目34)

そのゲノムが、内因性CD47ポリペプチドの細胞内部部分に連結された、ヒトCD47ポリペプチドの細胞外部分、および任意選択で膜貫通部分をコードするCD47遺伝子を備える、単離された齧歯類細胞または組織。

(項目35)

前記CD47遺伝子が、齧歯類のCD47プロモーターに動作可能に連結されている、項目34に記載の単離された細胞または組織。

(項目36)

前記CD47遺伝子が、ヒトCD47遺伝子のエクソン2~7を備えている、項目34もしくは35に記載の単離された細胞または組織

(項目37)

前記細胞または組織が、ヒトSIRP ポリペプチドの細胞外部分と、内因性SIRP ポリペプチドの細胞内部部分を備えたSIRP ポリペプチドをコードするSIRP 遺伝子をさらに備えている、項目34~36のいずれか一項に記載の単離された齧歯類細胞または組織。

(項目38)

前記齧歯類細胞または組織が、マウス細胞もしくはマウス組織、またはラット細胞もしくはラット組織である、項目34~37のいずれか一項に記載の単離された齧歯類細胞または組織。

(項目39)

そのゲノムが、内因性CD47ポリペプチドの細胞内部部分に連結されたヒトCD47ポリペプチドの細胞外部分、および任意選択で膜貫通部分をコードするCD47遺伝子を備えている、齧歯類胚性幹細胞。

(項目40)

前記CD47遺伝子が、内因性CD47プロモーターに動作可能に連結されたヒトCD47遺伝子のエクソン2~7を備えている、項目39に記載の齧歯類胚性幹細胞。

(項目41)

前記齧歯類胚性幹細胞がマウス胚性幹細胞であり、129系、C57BL系、またはそれらの混合由来である、項目39または40のいずれか一項に記載の齧歯類胚性幹細胞。

(項目42)

前記齧歯類胚性幹細胞がマウス胚性幹細胞であり、129系およびC57BL系の混合である、項目41に記載の齧歯類胚性幹細胞。

(項目43)

前記齧歯類胚性幹細胞のゲノムが、ヒトSIRP ポリペプチドの細胞外部分、および内因性SIRP ポリペプチドの細胞内部部分を備えるSIRP ポリペプチドをコードするSIRP 遺伝子をさらに備えており、この場合において、前記SIRP 遺伝子は任意選択で内因性SIRP 遺伝子のエクソン1、5、6、7および8、ならびにヒトSIRP 遺伝子のエクソン2~4を備え

10

20

30

40

50

ている、項目39～42のいずれか一項に記載の齧歯類胚性幹細胞。

(項目44)

前記齧歯類胚性幹細胞がマウスまたはラットの胚性幹細胞である、項目39、40、または43のいずれか一項に記載の齧歯類胚性幹細胞。

(項目45)

項目39～44のいずれか一項に記載の胚性幹細胞から生成される齧歯類胚。

(項目46)

前記胚は、マウスまたはラットの胚である、項目45に記載の齧歯類胚。

(項目47)

内因性CD47の遺伝子座からCD47ポリペプチドを発現する齧歯類を作製する方法であって、前記CD47ポリペプチドがヒト配列を備え、前記方法が、(a)齧歯類胚性幹細胞の内因性CD47遺伝子座にゲノム断片を挿入することであって、前記ゲノム断片はヒトCD47ポリペプチドの全部または一部をコードするヌクレオチド配列を備えており、それによりヒト化CD47遺伝子を形成すること、(b)(a)のヒト化CD47遺伝子を備える齧歯類胚性幹細胞を得ること、および(c)(b)の齧歯類胚性幹細胞を使用して齧歯類を作製することを含む、前記方法。

(項目48)

前記ヒト配列がヒトCD47ポリペプチドの19～127、19～141、19～292または16～292残基に相当するアミノ酸を備えている、項目47に記載の方法。

(項目49)

前記ヌクレオチド配列がヒトCD47遺伝子のエクソン2～7を備えている、項目47または48のいずれか一項に記載の方法。

(項目50)

前記ヌクレオチド配列が、一つ以上の選択マーカーを備え、この場合において、任意選択で一つ以上の部位特異的組み換え部位を備える、項目47～49のいずれか一項に記載の方法。

(項目51)

前記ヒト化CD47遺伝子が、齧歯類CD47遺伝子のエクソン1、およびエクソン7の下流のエクソンを備えている、項目47～50のいずれか一項に記載の方法。

(項目52)

前記方法が、(a)の齧歯類胚性幹細胞の内因性SIRP 遺伝子へゲノム断片を挿入する工程をさらに含み、前記ゲノム断片は、ヒトSIRP ポリペプチドの全部または一部をコードするヌクレオチド配列を備えており、この場合において、任意選択で前記ゲノム断片がヒトSIRP 遺伝子のエクソン2～4を備えている、項目47～51のいずれか一項に記載の方法。

(項目53)

ヒトSIRP ポリペプチドの全部または一部をコードするヌクレオチド配列を備える前記ゲノム断片が、内因性CD47遺伝子への挿入の前に、(a)の齧歯類胚性幹細胞の内因性SIRP 遺伝子へと挿入される、項目52に記載の方法。

(項目54)

前記方法が、第二の齧歯類と(c)の齧歯類を交配させることをさらに含み、前記第二の齧歯類はヒトSIRP ポリペプチドの細胞外部分と内因性SIRP ポリペプチドの細胞内部分を備えるSIRP ポリペプチドをコードするSIRP 遺伝子を備えるゲノムを有しており、この場合において、任意選択で前記SIRP 遺伝子が内因性SIRP 遺伝子のエクソン1、5、6、7および8、ならびにヒトSIRP 遺伝子のエクソン2～4を備えている、項目47～51のいずれか一項に記載の方法。

(項目55)

前記齧歯類がマウスまたはラットである、項目47～54のいずれか一項に記載の方法。

(項目56)

項目47～55のいずれか一項に記載の方法から取得可能な齧歯類。

10

20

30

40

50

(項目 5 7)

前記齧歯類がマウスまたはラットである、項目56に記載の齧歯類。

(項目 5 8)

そのゲノムが、内因性CD47ポリペプチドの細胞内部分に連結されたヒトCD47ポリペプチドの細胞外部分をコードするCD47遺伝子を備えている齧歯類を提供する方法であって、前記方法が、内因性CD47ポリペプチドの細胞内部分に連結されたヒトCD47ポリペプチドの細胞外部分と、任意選択で膜貫通部分をコードするCD47を備えるよう、齧歯類のゲノムを改変することにより、前記齧歯類を提供することを含む、前記方法。

(項目 5 9)

前記CD47遺伝子が、ヒトCD47遺伝子のエクソン2~7を含む、項目58に記載の方法。

10

(項目 6 0)

前記CD47遺伝子が、齧歯類CD47遺伝子のエクソン1、およびエクソン7の下流のエクソンを備えている、項目58または59のいずれか一項に記載の方法。

(項目 6 1)

前記ゲノムの改変が、齧歯類胚性幹細胞で行われる、項目58~60のいずれか一項に記載の方法。

(項目 6 2)

前記ヒトCD47ポリペプチドの細胞外部分が、ヒトCD47ポリペプチドのアミノ酸19~141に相当する、項目58~61のいずれか一項に記載の方法。

(項目 6 3)

20

前記方法が、内因性SIRP ポリペプチドの細胞内部分に連結されたヒトSIRP ポリペプチドの細胞外部分をコードするSIRP 遺伝子を備えるよう、齧歯類のゲノムを改変することをさらに含み、この場合において、任意選択で前記SIRP 遺伝子がヒトSIRP 遺伝子のエクソン2~4ならびに内因性SIRP 遺伝子のエクソン1および5~8を備えている、項目58~62のいずれか一項に記載の方法。

(項目 6 4)

内因性SIRP ポリペプチドの細胞内部分に連結されたヒトSIRP ポリペプチドの細胞外部分をコードするSIRP 遺伝子を備えるよう、前記齧歯類のゲノムを改変することが、内因性CD47ポリペプチドの細胞内部分に連結されたヒトCD47ポリペプチドの細胞外部分をコードするCD47遺伝子を備えるよう齧歯類のゲノムを改変する事の前に行われる、項目63に記載の方法。

30

(項目 6 5)

前記方法が、そのゲノムが内因性CD47ポリペプチドの細胞内部分に連結されたヒトCD47ポリペプチドの細胞外部分をコードするCD47遺伝子を備える齧歯類を、第二の齧歯類と交配させることをさらに含み、前記第二の齧歯類は、ヒトSIRP ポリペプチドの細胞外部分および内因性SIRP ポリペプチドの細胞内部分を備えるSIRP ポリペプチドをコードするSIRP 遺伝子を備えたゲノムを有しており、この場合において、任意選択で前記SIRP 遺伝子は、ヒトSIRP 遺伝子のエクソン2~4、ならびに内因性SIRP 遺伝子のエクソン1および5~8を備えている、項目58~62のいずれか一項に記載の方法。

(項目 6 6)

40

前記齧歯類がマウスまたはラットである、項目58~65のいずれか一項に記載の方法。

(項目 6 7)

項目58~66のいずれか一項に記載の方法から取得可能な齧歯類。

(項目 6 8)

前記齧歯類がマウスまたはラットである、項目67に記載の齧歯類。

(項目 6 9)

ヒト細胞を齧歯類に生着させる方法であって、(a)項目1~31のいずれか一項に記載の齧歯類を提供する工程、および(b)一つ以上のヒト細胞を前記齧歯類に移植する工程、を含む、前記方法。

(項目 7 0)

50

(c) 前記齧歯類における前記一つ以上のヒト細胞の生着を分析する工程、をさらに含む項目69に記載の方法。

(項目71)

前記分析工程が、前記一つ以上のヒト細胞の生着を、一つ以上の野生型齧歯類または対照齧歯類における生着と比較することを含む、項目70に記載の方法。

(項目72)

前記ヒト細胞が造血幹細胞である、項目69～71のいずれか一項に記載の方法。

(項目73)

前記ヒト細胞が、静脈内に移植される、項目69～72のいずれか一項に記載の方法。

(項目74)

前記ヒト細胞が、腹腔内に移植される、項目69～72のいずれか一項に記載の方法。

10

(項目75)

前記ヒト細胞が、皮下に移植される、項目69～72のいずれか一項に記載の方法。

(項目76)

ヒト細胞を標的とする薬剤の治療有効性を評価する方法であって、前記方法が、項目1～31のいずれか一項に記載の齧歯類を提供すること、前記齧歯類に一つ以上のヒト細胞を移植すること、前記齧歯類に薬剤候補を投与すること、および前記齧歯類中のヒト細胞をモニターし、前記薬剤候補の治療有効性を決定すること、を含む、前記方法。

(項目77)

前記ヒト細胞が、癌細胞であり、前記薬剤候補が、抗癌剤候補である、項目76に記載の方法。

20

(項目78)

前記薬剤候補が、抗体である、項目77に記載の方法。

(項目79)

前記齧歯類が、ヒト免疫細胞をさらに備える、項目78に記載の方法。

(項目80)

前記薬剤候補が、ヒトCD47、および移植されたヒト癌細胞上の抗原に結合する二特異性抗体である、項目79に記載の方法。

(項目81)

(a) そのゲノムが、内因性齧歯類CD47ポリペプチドの細胞内部分に連結されたヒトCD47ポリペプチドの細胞外部分をコードするCD47遺伝子を含む、一つ以上の齧歯類の細胞を提供する工程、(b) 工程(a)の前記一つ以上の齧歯類の細胞と、標識基質をインキュベートする工程、および(c) 工程(b)の前記一つ以上の齧歯類の細胞による、前記標識基質の貪食を測定する工程、を含む方法。

30

(項目82)

前記CD47遺伝子が、内因性齧歯類CD47プロモーターに動作可能に連結されている、項目81に記載の方法。

(項目83)

前記CD47遺伝子が、ヒトCD47遺伝子のエクソン2～7を備えている、項目81または82のいずれか一項に記載の方法。

40

(項目84)

前記CD47遺伝子が、内因性齧歯類CD47遺伝子のエクソン1、およびエクソン7の下流のエクソンを備えている、項目83に記載の方法。

(項目85)

前記基質が、蛍光標識されている、項目81～84のいずれか一項に記載の方法。

(項目86)

前記基質が、抗体で標識されている、項目81～84のいずれか一項に記載の方法。

(項目87)

前記基質が、一つ以上の赤血球である、項目81～84のいずれか一項に記載の方法。

(項目88)

50

- 前記基質が、一つ以上の細菌細胞である、項目81～84のいずれか一項に記載の方法。
 (項目89)
- 前記基質が、一つ以上の腫瘍細胞である、項目81～84のいずれか一項に記載の方法。
 (項目90)
- 前記工程(a)の一つ以上の齧歯類細胞のゲノムが、ヒトSIRP ポリペプチドの細胞外部分、および内因性SIRP ポリペプチドの細胞内部分を備えるSIRP ポリペプチドをコードするSIRP 遺伝子をさらに備えている、項目81～84のいずれか一項に記載の方法。
 (項目91)
- 前記SIRP 遺伝子が、ヒトSIRP 遺伝子のエクソン2～4、ならびに内因性SIRP 遺伝子のエクソン1およびエクソン5～8を備えている、項目90に記載の方法。
 (項目92)
- 前記工程(a)の一つ以上の細胞が、マウスまたはラットの細胞である、項目81～91のいずれか一項に記載の方法。
 (項目93)
- (a)項目1～31のいずれか一項に記載の齧歯類を提供すること、(b)抗原に前記齧歯類を曝露すること、および(c)前記齧歯類の一つ以上の細胞による前記抗原の貪食を測定すること、を含む方法。
 (項目94)
- 前記曝露工程が、蛍光標識されている抗原に前記齧歯類を曝露する工程を含む、項目93に記載の方法。
 (項目95)
- 前記曝露工程が、前記抗原を備える一つ以上の細胞に前記齧歯類を曝露する工程を含む、項目93に記載の方法。
 (項目96)
- 前記曝露工程が、前記抗原を備える一つ以上のヒト細胞、または前記抗原を備える一つ以上の細菌細胞に、前記齧歯類を曝露する工程を含む、項目95に記載の方法。
 (項目97)
- 前記曝露工程が、前記抗原が一つ以上の形質転換細胞の表面上に発現されるよう、前記抗原で形質転換された一つ以上の細胞に前記齧歯類を曝露する工程を含む、項目95に記載の方法。
 (項目98)
- 前記曝露工程が、前記抗原を備える一つ以上の腫瘍細胞に前記齧歯類を曝露する工程を含む、項目95に記載の方法。
 (項目99)
- ヒトCD47を標的とする薬剤の薬物動態特性を評価する方法であって、前記方法が、項目1～31のいずれか一項に記載の齧歯類に前記薬剤を投与する工程、およびヒトCD47を標的とする前記薬剤の一つ以上の薬物動態特性を決定するためのアッセイを行う工程、を含む、前記方法。
 (項目100)
- ヒトCD47を標的とする薬剤の標的毒性を評価する方法であって、前記方法が、項目1～31のいずれか一項に記載の齧歯類に前記薬剤を投与する工程、薬剤の標的毒性に関連した一つ以上のパラメーターに対するアッセイを行う工程、を含む、前記方法。
 (項目101)
- ヒトCD47を標的とする薬剤の標的外毒性を評価する方法であって、前記方法が、項目1～31のいずれか一項に記載の齧歯類に前記薬剤を投与する工程、薬剤の標的外毒性に関連した一つ以上のパラメーターに対するアッセイを行う工程、を含む、前記方法。
 (項目102)
- 前記ヒトCD47を標的とする薬剤が、CD47拮抗薬である、項目99～101のいずれか一項に記載の方法。
 (項目103)

10

20

30

40

50

前記CD47拮抗薬が、抗CD47抗体である、項目102に記載の方法。

(項目104)

前記ヒトCD47を標的とする薬剤が、CD47作動薬である、項目99～101のいずれか一項に記載の方法。

(項目105)

前記薬剤が、抗CD47抗体であり、前記アッセイが、前記齧歯類における前記抗体の薬物動態的クリアランスを決定する、項目99に記載の方法。

(項目106)

(a) 項目1～31のいずれか一項に記載の齧歯類を提供すること、(b) 前記齧歯類から赤血球を単離すること、(c) ヒトCD47タンパク質の調節物質候補の存在下で、前記単離された赤血球をインキュベートすること、および(d) 前記調節物質候補が前記赤血球の凝集を誘導するかどうかを評価すること、を含む方法。

(項目107)

前記調節物質候補が抗体である、項目106に記載の方法。

(項目108)

前記評価することが、前記調節物質候補が前記赤血球の凝集を誘導する濃度を決定することを含む、項目106または107に記載の方法。

10

【図1】

【図1】

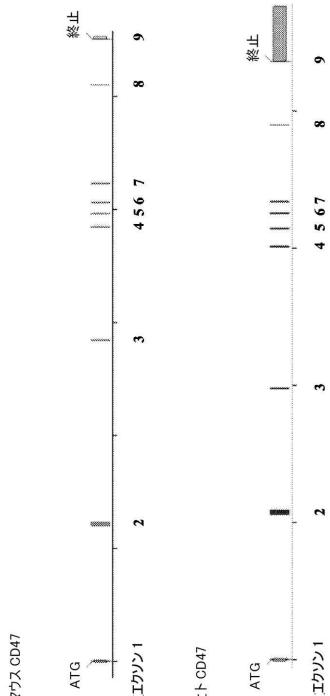


図1

【図2】

【図2】

ヒトCD47エクソン2～7が導入され、ネオマイシンカセットがそのままである(約4995bp)、内因性CD47遺伝子

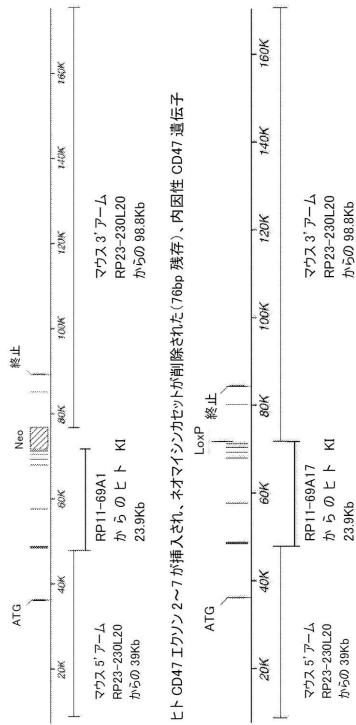


図2

【図3】

【図3】

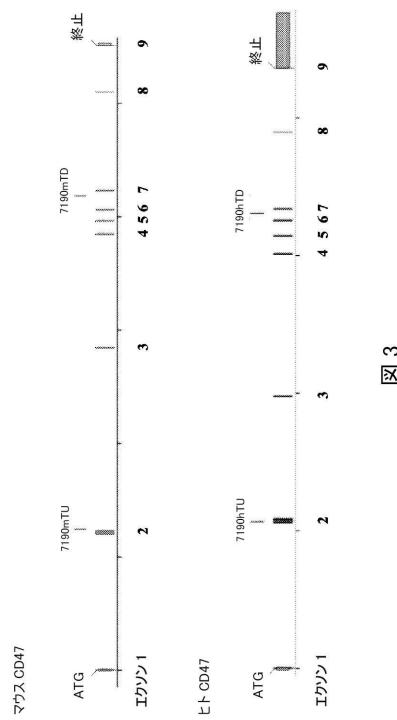


図3

【図4】

【図4】

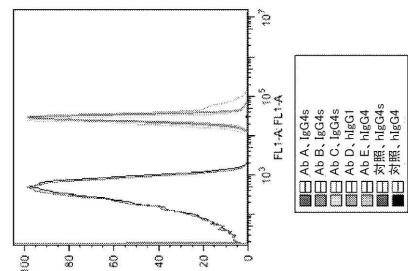


図4

【図5】

【図5】

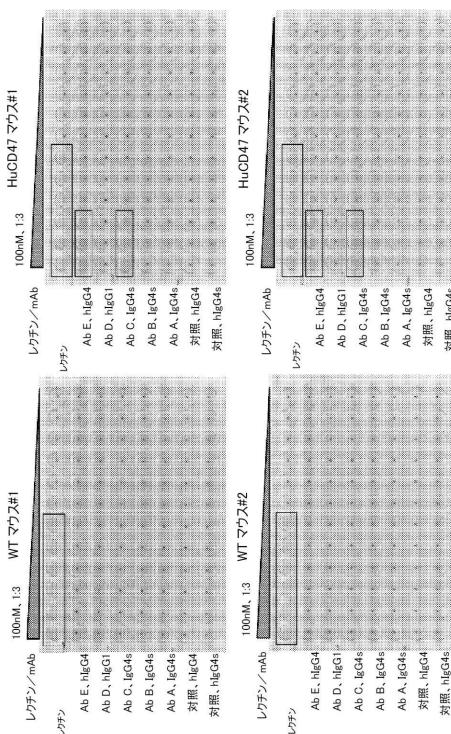


図5

【図6】

【図6】

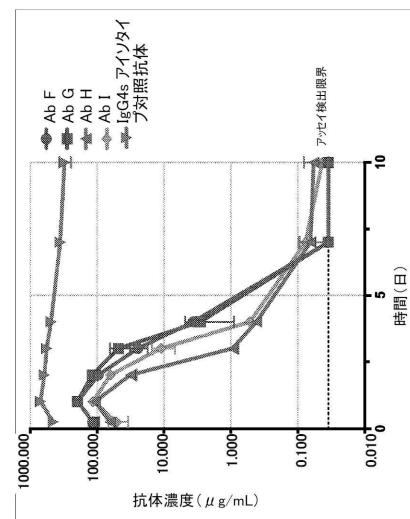
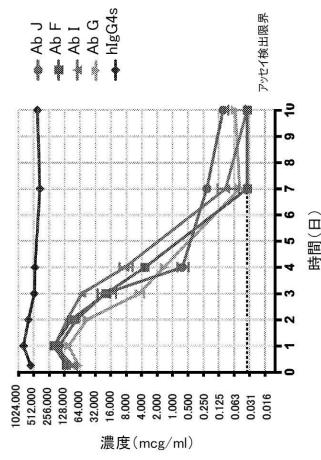


図6

【図7】

【図7】



【図8】

【図8】

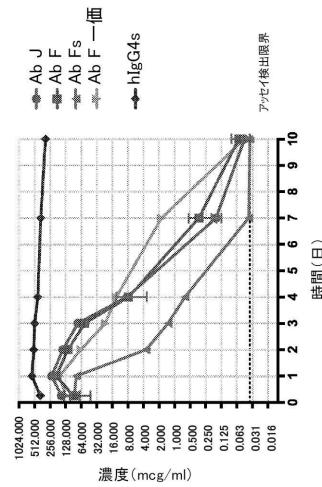


図7

図8

【図9】

【図9】

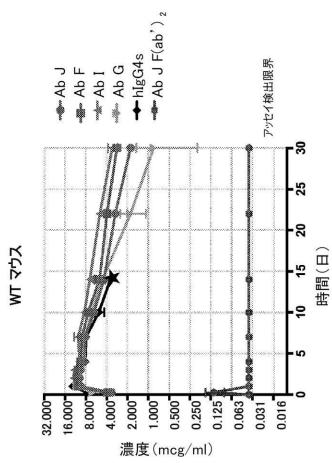


図9

【配列表】

0006730277000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I		
C 1 2 Q	1/06	(2006.01)	C 1 2 Q	1/06	
C 0 7 K	14/705	(2006.01)	C 0 7 K	14/705	
G 0 1 N	33/50	(2006.01)	G 0 1 N	33/50	Z
G 0 1 N	33/15	(2006.01)	G 0 1 N	33/15	Z
A 6 1 K	45/00	(2006.01)	A 6 1 K	45/00	
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	T
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	E
			A 6 1 P	35/00	

(72)発明者 ギュラー, ケイガン

アメリカ合衆国 ニューヨーク 10591-6707, タリータウン, オールド ソー ミル リバー ロード 777, リジェネロン フーマシューティカルズ, インコーポレイテッド 気付

(72)発明者 イオッフェ, エラ

アメリカ合衆国 ニューヨーク 10591-6707, タリータウン, オールド ソー ミル リバー ロード 777, リジェネロン フーマシューティカルズ, インコーポレイテッド 気付

(72)発明者 ムジカ, アレクサンダー

アメリカ合衆国 ニューヨーク 10591-6707, タリータウン, オールド ソー ミル リバー ロード 777, リジェネロン フーマシューティカルズ, インコーポレイテッド 気付

(72)発明者 サーストン, ギャビン

アメリカ合衆国 ニューヨーク 10591-6707, タリータウン, オールド ソー ミル リバー ロード 777, リジェネロン フーマシューティカルズ, インコーポレイテッド 気付

審査官 斎藤 貴子

(56)参考文献 国際公開第2007/033221(WO, A1)

国際公開第2013/144165(WO, A1)

特表2015-534819(JP, A)

ANNY DEVOY et al., GENOMICALLY HUMANIZED MICE: TECHNOLOGIES AND PROMISE, NATURE REVIEW GENETICS, 2012年, VOL:13, N1, P1-17(PAGE(S):14 - 20), URL, <http://dx.doi.org/10.1038/nrg3116>

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 0 7 K C 1 2 N A 6 1 K A 6 1 P
 C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S / W P I D S (S T N)
 U n i P r o t / G e n e S e q
 J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)