



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년03월09일
(11) 등록번호 10-2508175
(24) 등록일자 2023년03월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A01K 67/027 (2006.01) C07K 14/705 (2006.01)
C12N 15/85 (2006.01) G01N 33/50 (2017.01)
(52) CPC특허분류
A01K 67/0278 (2013.01)
C07K 14/70596 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2021-7032415(분할)
(22) 출원일자(국제) 2015년11월25일
심사청구일자 2021년10월29일
(85) 번역문제출일자 2021년10월08일
(65) 공개번호 10-2021-0127773
(43) 공개일자 2021년10월22일
(62) 원출원 특허 10-2017-7013948
원출원일자(국제) 2015년11월25일
심사청구일자 2020년11월24일
(86) 국제출원번호 PCT/US2015/062614
(87) 국제공개번호 WO 2016/089692
국제공개일자 2016년06월09일
(30) 우선권주장
62/087,992 2014년12월05일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
US20070113297 A1
(뒷면에 계속)
전체 청구항 수 : 총 19 항

(73) 특허권자
리제너론 파마슈티칼스 인코포레이티드
미합중국 뉴욕주 10591 타리타운 올드 소우 밀 리버 로드 777
(72) 발명자
규레르 카간
미국 뉴욕 10591-6707 테리타운 올드 소우 밀 리버 로드 777 리제너론 파마슈티칼스 인코포레이티드 내
요페 엘라
미국 뉴욕 10591-6707 테리타운 올드 소우 밀 리버 로드 777 리제너론 파마슈티칼스 인코포레이티드 내
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인와이에스장

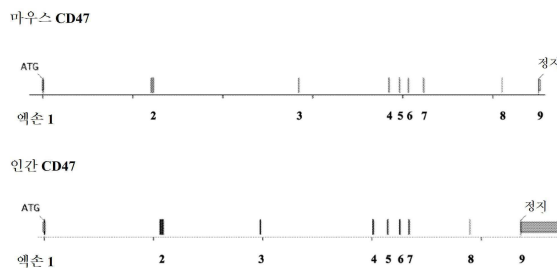
심사관 : 박영관

(54) 발명의 명칭 인간화 분화 클러스터 47 유전자를 가진 비인간 동물

(57) 요약

비인간 동물, 및 이를 제조 및 사용하기 위한 방법 및 조성물이 제공되며, 상기 비인간 동물은 내인성 분화 클러스터(CD) 유전자의 인간화, 특히 CD47 유전자의 인간화를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 비인간 동물은 인간 부분 및 비인간 부분(예를 들어, 쥐과 동물 부분)를 포함하는 CD47 폴리펩티드를 발현하도록 내인성 CD47 유전자에 유전자 변형을 갖는 것으로 설명될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12N 15/8509 (2013.01)
G01N 33/5088 (2013.01)
A01K 2207/15 (2013.01)
A01K 2217/052 (2013.01)
A01K 2217/072 (2013.01)
A01K 2217/15 (2013.01)
A01K 2227/105 (2013.01)
A01K 2267/0331 (2013.01)
A01K 2267/0381 (2013.01)

(72) 발명자

무지카 알렉산더

미국 뉴욕 10591-6707 테리타운 올드 소우 밀 리버
로드 777 리제너론 파마슈티칼스 인코포레이티드
내

서스톤 가빈

미국 뉴욕 10591-6707 테리타운 올드 소우 밀 리버
로드 777 리제너론 파마슈티칼스 인코포레이티드
내

(56) 선행기술조사문헌

W02013063556 A1
KR1020110117164 A
Trends in Immunology vol.32 no.7 pp.321-327,
2011.
Biochemistry and Cell biology vol.80 no.2
pp.169-176, 2002.
The journal of biological chemistry vol.276
no.37 pp.34607-34616, 2001.
Cellular &Molecular Immunology vol.8 no.4
pp.285-288, 2011.

명세서

청구범위

청구항 1

인간 CD47을 표적으로 하는 약물의 약동학을 평가하는 방법으로서,
 인간화된 CD47 폴리펩티드를 발현하는 설치류에게 약물을 투여하는 단계; 및
 인간 CD47을 표적으로 하는 약물의 하나 이상의 약동학적 성질을 결정하기 위한 검정을 수행하는 단계
 를 포함하고,
 여기서,
 설치류의 게놈은 인간화된 CD47 폴리펩티드를 암호화하는 인간화된 CD47 유전자를 포함하고,
 인간화된 CD47 유전자는 인간 CD47 유전자의 엑손 2-7 및 설치류 CD47 유전자의 엑손 7의 하류 엑손을
 포함하고;
 인간화된 CD47 폴리펩티드는 인간 CD47 폴리펩티드의 일부, 및 설치류 CD47 폴리펩티드의 세포내 부분을 포함하
 고;
 인간 CD47 폴리펩티드의 일부는 인간 CD47 폴리펩티드의 세포외 도메인 및 막관통 도메인을 포함하고, 인간
 CD47 유전자의 엑손 2-7에 의해 암호화되고;
 설치류 CD47 폴리펩티드의 세포내 부분은 설치류 CD47 유전자의 엑손 7의 하류 엑손에 의해 암호화되고;
 인간화된 CD47 유전자는 내인성 설치류 CD47 유전자좌에서 내인성 설치류 CD47 프로모터에 작동가능하게 연결되
 고;
 설치류는 마우스 또는 랫트인,
 인간 CD47을 표적으로 하는 약물의 약동학을 평가하는 방법.

청구항 2

제1 항에 있어서, 인간화된 CD47 유전자는 내인성 설치류 CD47 유전자좌에서 내인성 설치류 CD47 유전자의 엑손
 2-7을 포함하는 게놈 단편을 인간 CD47 유전자의 엑손 2-7을 포함하는 게놈 단편으로 대체하여 형성되는 것을
 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제1 항에 있어서, 인간화된 CD47 유전자는 내인성 설치류 CD47 유전자의 엑손 1, 인간 CD47 유전자의 엑손 2-7,
 및 내인성 CD47 유전자의 엑손 7의 하류 엑손을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제1 항에 있어서, 설치류는 인간 SIRP α 폴리펩티드의 세포외 도메인 및 내인성 설치류 SIRP α 폴리펩티드의 세
 포내 도메인을 포함하는 SIRP α 폴리펩티드를 암호화하는 SIRP α 유전자를 포함하며, SIRP α 폴리펩티드는 CD47
 과 상호작용하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제4 항에 있어서, SIRP α 유전자는 내인성 설치류 SIRP α 유전자의 엑손 1, 5, 6, 7 및 8 및 인간 SIRP α 유전
 자의 엑손 2-4를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

인간 CD47을 표적으로 하는 약물의 온 타겟(on-target) 독성을 평가하는 방법으로서,

인간화된 CD47 폴리펩티드를 발현하는 설치류에게 약물을 투여하는 단계; 및
 약물의 온 타겟 독성과 관련된 하나 이상의 파라미터에 대한 검정을 수행하는 단계
 를 포함하고,
 여기서,
 설치류의 게놈은 인간화된 CD47 폴리펩티드를 암호화하는 인간화된 CD47 유전자를 포함하고,
 인간화된 CD47 유전자는 인간 CD47 유전자의 엑손 2-7 및 설치류 CD47 유전자의 엑손 7의 하류 엑손을
 포함하고;
 인간화된 CD47 폴리펩티드는 인간 CD47 폴리펩티드의 일부, 및 설치류 CD47 폴리펩티드의 세포내 부분을 포함하
 고;
 인간 CD47 폴리펩티드의 일부는 인간 CD47 폴리펩티드의 세포외 도메인 및 막관통 도메인을 포함하고, 인간
 CD47 유전자의 엑손 2-7에 의해 암호화되고;
 설치류 CD47 폴리펩티드의 세포내 부분은 설치류 CD47 유전자의 엑손 7의 하류 엑손에 의해 암호화되고;
 인간화된 CD47 유전자는 내인성 설치류 CD47 유전자좌에서 내인성 설치류 CD47 프로모터에 작동가능하게 연결되
 고;
 설치류는 마우스 또는 랫트인,
 인간 CD47을 표적으로 하는 약물의 온 타겟(on-target) 독성을 평가하는 방법.

청구항 7

제6 항에 있어서, 인간화된 CD47 유전자는 내인성 설치류 CD47 유전자좌에서 내인성 설치류 CD47 유전자의 엑손 2-7을 포함하는 게놈 단편을 인간 CD47 유전자의 엑손 2-7을 포함하는 게놈 단편으로 대체하여 형성되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

제6 항에 있어서, 인간화된 CD47 유전자는 내인성 설치류 CD47 유전자의 엑손 1, 인간 CD47 유전자의 엑손 2-7, 및 내인성 CD47 유전자의 엑손 7의 하류 엑손을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

제6 항에 있어서, 설치류는 인간 SIRP α 폴리펩티드의 세포외 도메인 및 내인성 설치류 SIRP α 폴리펩티드의 세포내 도메인을 포함하는 SIRP α 폴리펩티드를 암호화하는 SIRP α 유전자를 포함하며, SIRP α 폴리펩티드는 CD47 과 상호작용하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

제9 항에 있어서, SIRP α 유전자는 내인성 설치류 SIRP α 유전자의 엑손 1, 5, 6, 7 및 8 및 인간 SIRP α 유전자의 엑손 2-4를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11

인간 CD47을 표적으로 하는 약물의 오프 타겟(off-target) 독성을 평가하는 방법으로서,
 인간화된 CD47 폴리펩티드를 발현하는 설치류에게 약물을 투여하는 단계; 및
 약물의 오프 타겟 독성과 관련된 하나 이상의 파라미터에 대한 검정을 수행하는 단계
 를 포함하고,
 여기서,
 설치류의 게놈은 인간화된 CD47 폴리펩티드를 암호화하는 인간화된 CD47 유전자를 포함하고,
 인간화된 CD47 유전자는 인간 CD47 유전자의 엑손 2-7 및 설치류 CD47 유전자의 엑손 7의 하류 엑손을

포함하고;

인간화된 CD47 폴리펩티드는 인간 CD47 폴리펩티드의 일부, 및 설치류 CD47 폴리펩티드의 세포내 부분을 포함하고;

인간 CD47 폴리펩티드의 일부는 인간 CD47 폴리펩티드의 세포의 도메인 및 막관통 도메인을 포함하고, 인간 CD47 유전자의 엑손 2-7에 의해 암호화되고;

설치류 CD47 폴리펩티드의 세포내 부분은 설치류 CD47 유전자의 엑손 7의 하류 엑손에 의해 암호화되고;

인간화된 CD47 유전자는 내인성 설치류 CD47 유전자좌에서 내인성 설치류 CD47 프로모터에 작동가능하게 연결되고;

설치류는 마우스 또는 랫트인,

인간 CD47을 표적으로 하는 약물의 오프 타겟(off-target) 독성을 평가하는 방법.

청구항 12

제11 항에 있어서, 인간화된 CD47 유전자는 내인성 설치류 CD47 유전자좌에서 내인성 설치류 CD47 유전자의 엑손 2-7을 포함하는 게놈 단편을 인간 CD47 유전자의 엑손 2-7을 포함하는 게놈 단편으로 대체하여 형성되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 13

제11 항에 있어서, 인간화된 CD47 유전자는 내인성 설치류 CD47 유전자의 엑손 1, 인간 CD47 유전자의 엑손 2-7, 및 내인성 CD47 유전자의 엑손 7의 하류 엑손을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 14

제11 항에 있어서, 설치류는 인간 SIRP α 폴리펩티드의 세포의 도메인 및 내인성 설치류 SIRP α 폴리펩티드의 세포내 도메인을 포함하는 SIRP α 폴리펩티드를 암호화하는 SIRP α 유전자를 포함하며, SIRP α 폴리펩티드는 CD47과 상호작용하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 15

제14 항에 있어서, SIRP α 유전자는 내인성 설치류 SIRP α 유전자의 엑손 1, 5, 6, 7 및 8 및 인간 SIRP α 유전자의 엑손 2-4를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 16

제1 항 내지 제15 항 중 어느 한 항에 있어서, 인간 CD47을 표적으로 하는 약물은 CD47 길항제인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 17

제16 항에 있어서, CD47 길항제는 항-CD47 항체인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 18

제1 항 내지 제15 항 중 어느 한 항에 있어서, 인간 CD47을 표적으로 하는 약물은 CD47 작용제인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 19

제1 항 내지 제5 항 중 어느 한 항에 있어서, 약물은 항-CD47 항체이고, 검정은 설치류에서 항체의 약동학적 클리어런스를 결정하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 20

삭제

- 청구항 21
- 삭제
- 청구항 22
- 삭제
- 청구항 23
- 삭제
- 청구항 24
- 삭제
- 청구항 25
- 삭제
- 청구항 26
- 삭제
- 청구항 27
- 삭제
- 청구항 28
- 삭제
- 청구항 29
- 삭제
- 청구항 30
- 삭제
- 청구항 31
- 삭제
- 청구항 32
- 삭제
- 청구항 33
- 삭제
- 청구항 34
- 삭제
- 청구항 35
- 삭제
- 청구항 36
- 삭제

- 청구항 37
- 삭제
- 청구항 38
- 삭제
- 청구항 39
- 삭제
- 청구항 40
- 삭제
- 청구항 41
- 삭제
- 청구항 42
- 삭제
- 청구항 43
- 삭제
- 청구항 44
- 삭제
- 청구항 45
- 삭제
- 청구항 46
- 삭제
- 청구항 47
- 삭제
- 청구항 48
- 삭제
- 청구항 49
- 삭제
- 청구항 50
- 삭제
- 청구항 51
- 삭제
- 청구항 52
- 삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

청구항 67

삭제

청구항 68

삭제

- 청구항 69
삭제
- 청구항 70
삭제
- 청구항 71
삭제
- 청구항 72
삭제
- 청구항 73
삭제
- 청구항 74
삭제
- 청구항 75
삭제
- 청구항 76
삭제
- 청구항 77
삭제
- 청구항 78
삭제
- 청구항 79
삭제
- 청구항 80
삭제
- 청구항 81
삭제
- 청구항 82
삭제
- 청구항 83
삭제
- 청구항 84
삭제

청구항 85

삭제

청구항 86

삭제

청구항 87

삭제

청구항 88

삭제

청구항 89

삭제

청구항 90

삭제

청구항 91

삭제

청구항 92

삭제

청구항 93

삭제

청구항 94

삭제

청구항 95

삭제

청구항 96

삭제

청구항 97

삭제

청구항 98

삭제

청구항 99

삭제

청구항 100

삭제

청구항 101

삭제

청구항 102

삭제

청구항 103

삭제

청구항 104

삭제

청구항 105

삭제

청구항 106

삭제

청구항 107

삭제

청구항 108

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원에 대한 교차 참조

[0002] 본 출원은 전체가 본원에 참조로 포함되는 2014년 12월 5일 출원된 미국 특허 가출원 제62/087,992호의 이익을 주장한다.

[0003] 참조로서 서열 목록 포함

[0004] 2015년 11월 23일에 생성되고, EFS-Web을 통해 미국 특허 상표청에 제출된 32584_10108W001_SequenceListing.txt로 명명된 96.0 KB의 ASCII 텍스트 파일 내 서열 목록이 참조로써 본원에 포함된다.

배경 기술

[0005] 암 치료법은 화학/방사선 요법, 호르몬 요법, 표적 요법, 및 면역요법의 네 가지 주요 범주로 나눌 수 있다. 비록 의학 연구 및 개발의 집중적인 초점이 표적 요법에 맞춰져 있고 현저한 개선이 이루어졌지만, 암은 세계적으로 환자 및 의료 산업의 주요 과제로 남아 있다. 이러한 주요 과제는, 부분적으로, 선천성 및 후천성 면역계의 모니터링 기전을 회피하는 암세포의 능력에 기인하는데, 이는 부분적으로 식세포 클리어런스 역제의 결과이다. 현재, 암세포의 식세포 클리어런스를 활성화하도록 고안된 새로운 암 치료법의 치료 가능성을 최적으로 결정하고 암세포가 대식세포와 식세포에 억제 신호를 제공하는 방법의 분자적 측면을 결정하는 생체내 시스템은 존재하지 않는다. 이러한 시스템은 식균촉진(pro-phagocytic) 신호를 활성화시켜 항종양 환경을 제공하는 것을 목표로 하는 새로운 암 치료법의 확인 및 생체내 식균작용 및 대식세포 기능 검정을 위한 공급원을 면역계에 제공한다.

발명의 내용

- [0006] 본 발명은 새로운 암 치료제를 확인하고 개발하기 위한 개선된 시스템이 가능하도록 비인간 동물을 조작하는 것이 바람직하다는 인식을 포함한다. 본 발명은 또한, 인간 조혈 줄기 세포의 개선된 생착이 가능하도록 비인간 동물을 조작하는 것이 바람직하다는 인식을 포함한다. 아울러, 본 발명은 또한, 인간화 CD47 유전자를 갖고/갖거나 인간 또는 인간화 CD47 폴리펩티드를 발현, 함유, 또는 생산하는 비인간 동물이, 예를 들어 CD47의 차단과 관련된 전신 독성을 극복하고 종양 세포의 CD47-매개 식균작용 억제를 극복하는 암 치료제의 확인 및 개발에 사용하기에 바람직하고, 더 많은 수의 인간 세포 유형의 항상성 증가를 제공하는 인간 조혈 줄기 세포의 생착을 위한 보다 효율적인 생체내 시스템을 제공한다는 인식을 포함한다.
- [0007] 일부 구현예에서, 본 발명은 두 가지 상이한 종(예를 들어, 인간 및 비인간)으로부터의 유전 물질을 포함하는 CD47 유전자를 포함하는 계놈을 갖는 비인간 동물을 제공한다. 일부 구현예에서, 본원에 기술된 비인간 동물의 CD47 유전자는, 인간 및 비인간 부분을 함유하는 CD47 폴리펩티드를 암호화하며, 인간 및 비인간 부분은 서로 연결되어 있고 기능적 CD47 폴리펩티드를 형성한다.
- [0008] 일부 구현예에서, 본 발명의 비인간 동물은 내인성 프로모터에 작동가능하게 연결된 내인성 부분 및 인간 부분을 포함하는 CD47 유전자를 포함한다.
- [0009] 일부 구현예에서, 내인성 부분은 내인성 CD47 유전자의 엑손 1 및 엑손 7의 하류 엑손을 포함한다. 일부 특정 구현예에서, 내인성 CD47 유전자의 엑손 1 및 엑손 7의 하류 엑손은 표 3에 나타난 마우스 CD47 유전자의 해당 엑손 1 및 엑손 7의 하류 엑손과 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 적어도 98% 동일하다. 일부 구현예에서, 내인성 CD47 유전자의 엑손 1 및 엑손 7의 하류 엑손은 표 3에 나타난 마우스 CD47 유전자의 해당 엑손 1 및 엑손 7의 하류 엑손과 동일하다.
- [0010] 일부 구현예에서, 인간 부분은 인간 CD47 폴리펩티드의 아미노산 16~292를 암호화한다. 일부 구현예에서, 인간 부분은 인간 CD47 폴리펩티드의 아미노산 16~292를 암호화한다. 일부 구현예에서, 인간 부분은 인간 CD47 폴리펩티드의 아미노산 16~141을 암호화한다. 일부 구현예에서, 인간 부분은 인간 CD47 폴리펩티드의 아미노산 16~127을 암호화한다. 일부 구현예에서, 인간 부분은 인간 CD47 유전자의 엑손 2~7을 포함한다.
- [0011] 일부 구현예에서, 인간 CD47 유전자의 엑손 2~7은 표 3에 나타난 인간 CD47 유전자의 해당 엑손 2~7과 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 적어도 98% 동일하다. 일부 구현예에서, 인간 CD47 유전자의 엑손 2~7은 표 3에 나타난 인간 CD47 유전자의 해당 엑손 2~7과 동일하다.
- [0012] 일부 구현예에서, 본 발명의 비인간 동물은 인간 CD47 폴리펩티드의 세포의 부분 및 내인성 CD47 폴리펩티드의 세포내 부분을 포함하는 CD47 폴리펩티드를 발현한다. 일부 구현예에서, CD47 폴리펩티드는 인간 CD47 폴리펩티드의 막관통 부분을 포함한다. 다른 구현예에서, CD47 폴리펩티드는 비인간 CD47 폴리펩티드의 막관통 부분을 포함한다. 일부 구현예에서, CD47 폴리펩티드는 비인간 동물의 세포에서 비인간 신호 펩티드로 번역된다. 일부 특정 구현예에서, 비인간 신호 펩티드는 설치류(예를 들어, 마우스 또는 랫트) 신호 펩티드이다.
- [0013] 일부 구현예에서, 본 발명의 CD47 폴리펩티드는 내인성 비인간 CD47 유전자로부터 발현된다.
- [0014] 일부 구현예에서, 내인성 CD47 폴리펩티드의 세포내 부분은 표 3에 나타난 마우스 CD47 폴리펩티드의 세포질내 꼬리와 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 적어도 98% 동일한 아미노산 서열을 갖는 세포질내 꼬리를 포함한다. 일부 구현예에서, 내인성 CD47 폴리펩티드의 세포내 부분은 표 3에 나타난 마우스 CD47 폴리펩티드의 세포질내 꼬리와 동일한 아미노산 서열을 갖는 세포질내 꼬리를 포함한다.
- [0015] 일부 구현예에서, 인간 CD47 폴리펩티드의 세포의 부분은 인간 CD47 폴리펩티드의 잔기 19~141에 상응하는 아미노산을 포함한다. 일부 구현예에서, 인간 CD47 폴리펩티드의 세포의 부분은 인간 CD47 폴리펩티드의 잔기 19~127에 상응하는 아미노산을 포함한다. 일부 구현예에서, 인간 CD47 폴리펩티드의 세포의 부분은 표 3에 나타난 인간 CD47 폴리펩티드의 세포의 부분의 해당 아미노산 서열과 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 적어도 98% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 인간 CD47 폴리펩티드의 세포의 부분은 표 3에 나타난 인간 CD47 폴리펩티드의 세포의 부분의 해당 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 포함한다.
- [0016] 일부 구현예에서, 본 발명은 본원에 기술된 비인간 동물의 CD47 유전자에 의해 암호화된 CD47 폴리펩티드를 제

공한다. 일부 특정 구현예에서, 암호화된 CD47 폴리펩티드는 서열 번호 17, 서열 번호 18, 서열 번호 19 또는 서열 번호 20과 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 적어도 98% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일부 특정 구현예에서, 암호화된 CD47 폴리펩티드는 서열 번호 17, 서열 번호 18, 서열 번호 19 또는 서열 번호 20과 동일한 아미노산 서열을 포함한다.

- [0017] 일부 구현예에서, 본 발명은 인간 CD47 유전자의 하나 이상의 엑손에 작동가능하게 연결된 비인간 CD47 유전자의 하나 이상의 엑손을 포함하는 인간화 CD47 유전자를 제공한다. 일부 특정 구현예에서, 본 발명의 인간화 CD47 유전자는 CD47 폴리펩티드의 세포내 부분을 암호화하는 비인간 엑손 및 인간 CD47 폴리펩티드의 세포외 부분을 암호화하는 인간 엑손을 포함한다. 일부 구현예에서, 인간화 CD47 유전자는 또한, 인간 CD47 폴리펩티드의 막관통 부분을 암호화하는 인간 엑손을 포함한다. 일부 특정 구현예에서, 본 발명의 인간화 CD47 유전자는, 신호 펩티드를 전체적 또는 부분적으로 암호화하고 CD47 폴리펩티드의 세포내 부분을 암호화하는 비인간 엑손, 및 CD47 폴리펩티드의 세포외 부분 및 선택적으로 막관통 부분을 암호화하는 인간 엑손을 포함한다.
- [0018] 일부 구현예에서, 본 발명은 본원에 기술된 비인간 동물로부터 단리된 세포 또는 조직을 제공한다. 일부 구현예에서, 본 발명은 본원에 기술된 CD47 유전자를 포함하는 단리된 세포 또는 조직을 제공한다. 일부 구현예에서, 세포는 수상세포, 림프구(예컨대, B 또는 T 세포), 대식세포 및 단핵구로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 조직은 지방, 방광, 뇌, 가슴, 골수, 눈, 심장, 장, 신장, 간, 폐, 림프절, 근육, 췌장, 혈장, 혈청, 피부, 비장, 위, 흉선, 고환, 난자, 및 이의 조합으로부터 선택된다.
- [0019] 일부 구현예에서, 본 발명은 본원에 기술된 CD47 유전자를 포함하는 게놈을 가진 비인간 배아 줄기 세포를 제공한다. 일부 구현예에서, 비인간 배아 줄기 세포는 마우스 배아 줄기 세포이고 129 균주, C57BL/6 균주 또는 BALB/c 균주로부터 유래한다. 일부 구현예에서, 비인간 배아 줄기 세포는 마우스 배아 줄기 세포이고, 129 균주와 C57BL/6 균주의 혼합물로부터 유래한다.
- [0020] 일부 구현예에서, 본 발명은 비인간 동물을 제조하기 위한 본원에 기술된 비인간 배아 줄기 세포의 용도를 제공한다. 일부 특정 구현예에서, 비인간 배아 줄기 세포는 마우스 배아 줄기 세포이고, 본원에 기술된 CD47 유전자를 포함하는 마우스를 제조하는 데 사용된다. 일부 특정 구현예에서, 비인간 배아 줄기 세포는 랫트 배아 줄기 세포이고, 본원에 기술된 CD47 유전자를 포함하는 랫트를 제조하는 데 사용된다.
- [0021] 일부 구현예에서, 본 발명은 본원에 기술된 CD47 유전자를 포함하는 비인간 배아 줄기 세포를 포함하거나, 이로부터 제조되거나 수득되거나 생성된 비인간 배아를 제공한다. 일부 특정 구현예에서, 비인간 배아는 설치류 배아이다. 일부 구현예에서, 설치류 배아는 마우스 배아이다. 일부 구현예에서, 설치류 배아는 랫트 배아이다.
- [0022] 일부 구현예에서, 본 발명은 내인성 CD47 유전자로부터 인간 서열을 포함하는 CD47 폴리펩티드를 발현하는 비인간 동물을 제조하는 방법을 제공하며, 이 방법은, 인간 CD47 폴리펩티드를 전체적 또는 부분적으로 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 게놈 단편을 비인간 배아 줄기 세포 내 내인성 CD47 유전자에 삽입하는 단계; 인간 CD47 폴리펩티드를 전체적 또는 부분적으로 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 내인성 CD47 유전자를 포함하는 비인간 배아 줄기세포를 수득하는 단계; 및 인간 CD47 폴리펩티드를 전체적 또는 부분적으로 암호화하는 상기 뉴클레오티드 서열을 포함하는 비인간 배아 줄기 세포를 이용하여 비인간 동물을 생성하는 단계를 포함한다.
- [0023] 일부 구현예에서, 인간 서열은 인간 CD47 폴리펩티드의 잔기 19~141(또는 19~292)에 상응하는 아미노산을 포함한다. 일부 구현예에서, 인간 서열은 인간 CD47 폴리펩티드의 잔기 19~127에 상응하는 아미노산을 포함한다.
- [0024] 일부 구현예에서, 뉴클레오티드 서열은 인간 CD47 유전자의 엑손 2~7을 포함한다. 일부 구현예에서, 뉴클레오티드 서열은 하나 이상의 선택 마커를 포함한다. 일부 구현예에서, 뉴클레오티드 서열은 하나 이상의 부위 특이적 재조합 부위를 포함한다.
- [0025] 일부 구현예에서, 상기 방법은, 인간 SIRP α 폴리펩티드를 전체적 또는 부분적으로 암호화(예를 들어, 인간 SIRP α 폴리펩티드의 세포외 부분을 암호화)하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 게놈 단편을 비인간 배아 줄기 세포의 내인성 SIRP α 유전자에 삽입하는 단계를 더 포함한다. 일부 특정 구현예에서, 인간 SIRP α 폴리펩티드를 전체적 또는 부분적으로 암호화(예를 들어, 인간 SIRP α 폴리펩티드의 세포외 부분을 암호화)하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 게놈 단편은 내인성 CD47 유전자에 삽입되기 전에 비인간 배아 줄기 세포의 내인성 SIRP α 유전자에 삽입된다.
- [0026] 일부 구현예에서, 상기 방법은, 인간 CD47 폴리펩티드를 전체적 또는 부분적으로 암호화하는 뉴클레오티드 서열

을 포함하는 내인성 CD47 유전자를 포함하는 비인간 동물을, 인간 SIRP α 폴리펩티드의 세포의 부분(예컨대, 인간 SIRP α 폴리펩티드의 잔기 28~362에 상응하는 아미노산) 및 내인성 SIRP α 폴리펩티드의 세포내 부분을 포함하는 SIRP α 폴리펩티드를 암호화하는 SIRP α 유전자를 포함하는 계놈을 가진 제2 비인간 동물로 번식시키는 단계를 더 포함한다.

[0027] 일부 구현예에서, 본 발명은, 내인성 CD47 폴리펩티드의 세포내 부분에 연결된 인간 CD47 폴리펩티드의 세포의 부분을 암호화하는 CD47 유전자를 포함하는 계놈을 가진 비인간 동물을 제공하는 방법을 제공하며, 이 방법은 내인성 CD47 폴리펩티드의 세포내 부분에 연결된 인간 CD47 폴리펩티드의 세포의 부분을 암호화하는 CD47 유전자를 포함하도록 비인간 동물의 계놈을 변형시킴으로써 상기 비인간 동물을 제공하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, CD47 유전자는 내인성 비인간 CD47 폴리펩티드의 세포내 부분에 연결된 인간 CD47 폴리펩티드의 세포의 부분 및 막관통 부분을 포함하는 CD47 폴리펩티드를 암호화한다. 다른 구현예에서, CD47 유전자는 내인성 비인간 CD47 폴리펩티드의 막관통 부분 및 세포내 부분에 연결된 인간 CD47 폴리펩티드의 세포의 부분을 포함하는 CD47 폴리펩티드를 암호화한다.

[0028] 일부 구현예에서, 비인간 동물의 계놈을 변형시키는 단계는 비인간 배아 줄기 세포에서 수행된다. 일부 특정 구현예에서, 비인간 배아 줄기 세포는 설치류 배아 줄기 세포이고; 일부 구현예에서, 마우스 배아 줄기 세포이고; 일부 구현예에서, 랫트 배아 줄기 세포이다.

[0029] 일부 구현예에서, 상기 방법은 내인성 SIRP α 폴리펩티드의 세포내 부분에 연결된 인간 SIRP α 폴리펩티드의 세포의 부분(예컨대, 인간 SIRP α 폴리펩티드의 잔기 28~362에 상응하는 아미노산)을 암호화하는 SIRP α 유전자를 포함하도록 비인간 동물의 계놈을 변형시키는 단계를 더 포함한다. 일부 특정 구현예에서, 내인성 SIRP α 폴리펩티드의 세포내 부분에 연결된 인간 SIRP α 폴리펩티드의 세포의 부분(예컨대, 인간 SIRP α 폴리펩티드의 잔기 28~362에 상응하는 아미노산)을 암호화하는 SIRP α 유전자를 포함하도록 비인간 동물의 계놈을 변형시키는 단계는, 내인성 CD47 폴리펩티드의 세포내 부분에 연결된 인간 CD47 폴리펩티드의 세포의 부분 및 선택적으로 막관통 부분을 암호화하는 CD47 유전자를 포함하도록 비인간 동물의 계놈을 변형시키는 단계 전에 수행된다.

[0030] 일부 구현예에서, 상기 방법은 내인성 CD47 폴리펩티드의 세포내 부분에 연결된 인간 CD47 폴리펩티드의 세포의 부분을 암호화하는 CD47 유전자를 포함하는 계놈을 가진 비인간 동물을, 인간 SIRP α 폴리펩티드의 세포의 부분(예컨대, 인간 SIRP α 폴리펩티드의 잔기 28~362에 상응하는 아미노산) 및 내인성 SIRP α 폴리펩티드의 세포내 부분을 포함하는 SIRP α 폴리펩티드를 암호화하는 SIRP α 유전자를 포함하는 계놈을 가진 제2 비인간 동물로 번식시키는 단계를 더 포함한다.

[0031] 일부 구현예에서, 본 발명은 본원에 기술된 방법에 의해 수득할 수 있는 비인간 동물을 제공한다.

[0032] 일부 구현예에서, 본 발명은 인간 세포를 비인간 동물에 생착하는 방법을 제공하며, 이 방법은 내인성 CD47 폴리펩티드의 세포내 부분에 연결된 인간 CD47 폴리펩티드의 세포의 부분을 암호화하는 CD47 유전자를 포함하는 계놈을 가진 비인간 동물을 제공하는 단계; 및 하나 이상의 인간 세포를 상기 비인간 동물에 이식하는 단계를 포함한다. 일부 특정 구현예에서, 상기 방법은 상기 비인간 동물에서 하나 이상의 인간 세포의 생착을 검정하는 단계를 더 포함한다. 일부 특정 구현예에서, 검정 단계는 하나 이상의 인간 세포의 생착을 하나 이상의 야생형 비인간 동물 또는 내인성 CD47 폴리펩티드의 세포내 부분에 연결된 인간 CD47 폴리펩티드의 세포의 부분을 암호화하는 CD47 유전자를 포함하지 않는 계놈을 가진 하나 이상의 비인간 동물에서의 생착과 비교하는 단계를 포함한다.

[0033] 일부 구현예에서, 인간 세포는 조혈 줄기 세포이다. 일부 구현예에서, 인간 세포는 정맥내 이식된다. 일부 구현예에서, 인간 세포는 복강내 이식된다. 일부 구현예에서, 인간 세포는 피하 이식된다.

[0034] 일부 구현예에서, 본 발명은 인간 세포를 표적으로 하는 약물의 치료 효능을 평가하는 방법을 제공하며, 이 방법은 내인성 CD47 폴리펩티드의 세포내 부분에 연결된 인간 CD47 폴리펩티드의 세포의 부분을 암호화하는 CD47 유전자를 포함하는 계놈을 가진 비인간 동물을 제공하는 단계; 하나 이상의 인간 세포를 상기 비인간 동물에 이식하는 단계; 상기 비인간 동물에게 약물 후보물질을 투여하는 단계; 및 약물 후보물질의 치료 효능을 결정하기 위해 비인간 동물에서 인간 세포를 모니터링하는 단계를 포함한다.

[0035] 일부 구현예에서, 인간 세포는 암세포이고, 약물 후보물질은 항암제 후보물질이다. 일부 특정한 구현예에서, 약물 후보물질은 항체이다.

[0036] 일부 구현예에서, 비인간 동물은 인간 면역 세포를 더 포함한다. 일부 특정 구현예에서, 약물 후보물질은 인간

CD47와 이식된 인간 암세포의 항원에 결합하는 이중 특이성 항체이다.

- [0037] 일부 구현예에서, 본 발명은 내인성 CD47 폴리펩티드의 세포내 부분에 연결된 인간 CD47 폴리펩티드의 세포외 부분을 암호화하는 CD47 유전자를 포함하는 게놈을 가진 하나 이상의 세포를 제공하는 단계; 하나 이상의 세포를 표지 기질로 배양하는 단계; 및 하나 이상의 세포에 의해 표지 기질의 식균작용을 측정하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다. 일부 구현예에서, 기질은 형광으로 표지된다. 일부 구현예에서, 기질은 항체로 표지된다. 일부 구현예에서, 기질은 하나 이상의 적혈구로 표지된다. 일부 구현예에서, 기질은 하나 이상의 박테리아 세포로 표지된다. 일부 구현예에서, 기질은 하나 이상의 종양 세포로 표지된다.
- [0038] 일부 구현예에서, 본 발명은 내인성 CD47 폴리펩티드의 세포내 부분에 연결된 인간 CD47 폴리펩티드의 세포외 부분을 암호화하는 CD47 유전자를 포함하는 게놈을 가진 비인간 동물을 제공하는 단계; 비인간 동물을 항원에 노출시키는 단계; 및 비인간 동물의 하나 이상의 세포에 의해 항원의 식균작용을 측정하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다. 일부 구현예에서, 노출 단계는 형광으로 표지된 항원에 비인간 동물을 노출시키는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 노출 단계는 항원을 포함하는 하나 이상의 세포에 비인간 동물을 노출시키는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 노출 단계는 항원을 포함하는 하나 이상의 인간 세포 또는 항원을 포함하는 하나 이상의 박테리아 세포에 비인간 동물을 노출시키는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 노출 단계는 항원으로 형질전환된 하나 이상의 세포에 비인간 동물을 노출시켜 하나 이상의 형질전환된 세포의 표면 상에 항원이 발현되도록 하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 노출 단계는 항원을 포함하는 하나 이상의 종양 세포에 비인간 동물을 노출시키는 단계를 포함한다.
- [0039] 일부 구현예에서, 본 발명은 약물 또는 백신을 확인하거나 검증하는 방법을 제공하며, 이 방법은 내인성 CD47 폴리펩티드의 세포내 부분에 연결된 인간 CD47 폴리펩티드의 세포외 부분을 암호화하는 CD47 유전자를 포함하는 게놈을 가진 비인간 동물에게 약물 또는 백신을 전달하는 단계; 및 약물 또는 백신에 대한 면역 반응, 약물 또는 백신의 안전성 프로파일, 또는 질환 또는 병태에 미치는 효과 중 하나 이상을 모니터링하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 안전성 프로파일을 모니터링하는 단계는 비인간 동물이 약물 또는 백신의 전달 결과 부작용 또는 역효과를 나타내는지 결정하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 부작용 또는 역효과는 사망률, 치사율, 체중의 변화, 하나 이상의 효소(예를 들어, 간)의 수준의 변화, 하나 이상의 기관의 중량의 변화, 기능 소실(예를 들어, 감각, 운동, 기관 등), 하나 이상의 질환에 대한 감수성의 증가, 비인간 동물의 게놈에 대한 변화, 식품 섭취에서의 증가 또는 감소 및 하나 이상의 질환의 합병증으로부터 선택된다.
- [0040] 일부 구현예에서, 본 발명은 의료용으로 사용하기 위한 약물 또는 백신의 개발에서 본원에 기술된 비인간 동물의 용도, 예컨대 약제로서의 용도를 제공한다.
- [0041] 일부 구현예에서, 본 발명은 암 또는 신생물의 치료를 위한 약제의 제조에서 본원에 기술된 비인간 동물의 용도를 제공한다.
- [0042] 일부 구현예에서, 본 발명은 인간 세포를 표적으로 하는 치료 약물의 효능을 평가하기 위한 본원에 기술된 비인간 동물의 용도를 제공한다. 다양한 구현예에서, 본 발명의 비인간 동물에게 인간 세포를 이식하고, 상기 인간 세포를 표적으로 하는 약물 후보물질이 비인간 동물에 투여된다. 일부 구현예에서, 약물의 효능은 약물의 투여 후 비인간 동물에서 인간 세포를 모니터링함으로써 결정된다.
- [0043] 일부 구현예에서, 본 발명은 치료 또는 진단을 위한 약물(예컨대, 항체)의 개발 및/또는 확인에 사용하기 위한 본원에 기술된 비인간 동물 또는 세포를 제공한다.
- [0044] 일부 구현예에서, 본 발명은 암 또는 신생물의 치료, 예방 또는 개선을 위한 약물(예컨대, 항체)의 개발 및/또는 확인에 사용하기 위한 본원에 기술된 비인간 동물 또는 세포를 제공한다.
- [0045] 일부 구현예에서, 본 발명은 인간 CD47을 표적으로 하는 약물의 약동학을 평가하는 방법을 제공하며, 이 방법은 본원에 기술된 비인간 동물에게 약물을 투여하는 단계, 및 인간 CD47을 표적으로 하는 약물의 하나 이상의 약동학적 성질을 결정하기 위한 검정을 수행하는 단계를 포함한다.
- [0046] 일부 구현예에서, 본 발명은 인간 CD47을 표적으로 하는 약물의 온 타겟(on-target) 독성을 평가하는 방법을 제공하며, 이 방법은 본원에 기술된 비인간 동물에게 약물을 투여하는 단계, 및 약물의 온 타겟 독성과 관련된 하나 이상의 파라미터에 대한 검정을 수행하는 단계를 포함한다.
- [0047] 일부 구현예에서, 본 발명은 인간 CD47을 표적으로 하는 약물의 오프 타겟(off-target) 독성을 평가하는 방법을 제공하며, 이 방법은 본원에 기술된 비인간 동물에게 약물을 투여하는 단계, 및 약물의 오프 타겟 독성과 관련

된 하나 이상의 파라미터에 대한 검정을 수행하는 단계를 포함한다.

- [0048] 많은 구현예에서, 본원에 기술된 비인간 동물은 내인성 CD47 폴리펩티드의 세포내 부분에 연결된 인간 CD47 폴리펩티드의 세포외 부분을 암호화하는 CD47 유전자를 포함하는 게놈을 가진 설치류이며; 일부 구현예에서, 설치류는 마우스이고, 일부 구현예에서, 설치류는 랫트이다.
- [0049] 일부 구현예에서, 인간 CD47을 표적으로 하는 약물은 CD47 길항제이다. 일부 특정 구현예에서, CD47 길항제는 항-CD47 항체이다. 일부 구현예에서, 인간 CD47을 표적으로 하는 약물은 CD47 작용제이다.
- [0050] 다양한 구현예에서, 본 발명의 CD47 유전자는 본원에 기술된 CD47 유전자를 포함한다. 다양한 구현예에서, 본 발명의 CD47 폴리펩티드는 본원에 기술된 CD47 폴리펩티드를 포함한다.
- [0051] 다양한 구현예에서, 본 발명의 비인간 동물은 전장 내인성 비인간 CD47 폴리펩티드를 검출가능하게 발현하지 않는다. 다양한 구현예에서, 본 발명의 비인간 동물은 내인성 CD47 폴리펩티드의 세포외 부분을 검출가능하게 발현하지 않는다. 다양한 구현예에서, 본 발명의 비인간 동물은 내인성 CD47 폴리펩티드와 내인성 SIRP α 폴리펩티드 둘 다의 세포외 부분을 검출가능하게 발현하지 않는다.
- [0052] 다양한 구현예에서, 인간 CD47 폴리펩티드의 세포외 부분은 본원에 기술된 인간 CD47 폴리펩티드의 잔기 19~141에 반응하는 아미노산을 포함한다.
- [0053] 다양한 구현예에서, 인간 CD47 폴리펩티드의 N-말단 면역글로불린 V 도메인은 본원에 기술된 인간 CD47 폴리펩티드의 잔기 19~127에 반응하는 아미노산을 포함한다.
- [0054] 다양한 구현예에서, 본 발명의 비인간 동물, 세포, 조직, 배아 줄기 세포 및/또는 배아는 인간 SIRP α 폴리펩티드의 세포외 부분(예컨대, 인간 SIRP α 폴리펩티드의 잔기 28~362에 반응하는 아미노산) 및 내인성 SIRP α 폴리펩티드의 세포내 부분을 포함하는 SIRP α 폴리펩티드를 암호화하는 SIRP α 유전자를 더 포함하는 게놈을 갖는다.
- [0055] 다양한 구현예에서, 본 발명의 비인간 동물은 설치류이며; 일부 구현예에서는, 마우스; 일부 구현예에서는, 랫트이다.
- [0056] 본 출원에서 사용된 용어 “약” 및 “대량”은 동등하게 사용된다. 본 출원에서 사용된 임의의 수치는 약/대량을 사용하거나 사용하지 않더라도 당업자에 의해 이해되는 임의의 정상적인 변동을 포함하는 것을 의미한다.
- [0057] 본 발명의 다른 특징, 목적 및 장점은 다음의 상세한 설명에서 명백해진다. 그러나, 상세한 설명은 본 발명의 특정한 구현예를 나타내지만, 단지 예시로서 제공될 뿐 제한하고자 함이 아닌 것으로 이해해야 한다. 본 발명의 범주 내 다양한 변형예들 및 수정예들이 상세한 설명으로부터 당업자에게 명백해질 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0058] 특허 또는 출원 파일은 컬러로 작업된 적어도 하나의 도면을 포함한다. 컬러 도면이 있는 본 특허 또는 특허 출원 공개의 사본은 요청시 필요한 수수료를 납부하면 특허청에서 제공될 것이다.

다음의 도면들로 구성된 본원에 포함된 도면은 단지 예시적인 목적이며 제한하고자 하는 것이 아니다.

도 1은 비인간(예를 들어, 마우스)의 게놈 조직 및 인간 분화 클러스터 47(CD47) 유전자의 도해(비례 아님)를 나타낸다. 엑손은 각 엑손 아래에 번호로 표시되어 있다.

도 2는 비인간 분화 클러스터 47(CD47) 유전자의 인간화를 위한 예시적인 방법의 도해(비례 아님)를 나타낸다.

도 3은 비인간 분화 클러스터 47(CD47) 유전자의 인간화를 위한 예시적인 방법의 도해(비례 아님)를 나타낸다. 실시예 1에 기재된 검정에 사용된 프로브의 위치가 표시되어 있다.

도 4는 항-CD47 항체에 의해 검출된 인간화 CD47 마우스의 적혈구에서의 CD47 발현에 대한 예시적 히스토그램을 나타낸다. Ab A, Ab B, Ab C, Ab D 및 Ab E: 항-CD47 항체; hIgG4s: 작동인자 기능이 감소된 변형 Fc 영역을 가진 무관한 특이성의 인간 IgG4; hIgG4: 무관한 특이성을 가진 인간 IgG4 항체.

도 5는 항-CD47 항체에 의한 야생형(n=2) 및 인간화 CD47(n=2) 마우스의 마우스 적혈구의 예시적 혈구 응집을 나타낸다. WT: 야생형; HuCD47: 인간화 CD47; Ab A, Ab B, Ab C, Ab D 및 Ab E: 항-CD47 항체; hIgG4s: 작동인자 기능이 감소된 변형 Fc 영역을 가진 무관한 특이성의 인간 IgG4; hIgG4: 무관한 특이성을 가진 인간 IgG4 항체.

도 6은 시간(일, x축) 경과에 따른 항체 농도(mg/mL, y축)로 나타낸 인간화 CD47 마우스에서의 항-CD47 항체의 예시적 약동학적 프로파일을 나타낸다; Ab F, Ab G, Ab H 및 Ab I: 항-CD47 항체; hIgG4s: 작동인자 기능이 감소된 변형 Fc 영역을 가진 무관한 특이성의 인간 IgG4 항체.

도 7은 시간(일, x축) 경과에 따른 항체 농도(mcg/mL, y축)로 나타낸 인간화 CD47/SIRP α 마우스(CD47^{hu/huSIRP α})에서의 항-CD47 항체의 예시적 약동학적 프로파일을 나타낸다. Ab J, Ab F, Ab G 및 Ab I: 항-CD47 항체; hIgG4s: 작동인자 기능이 감소된 변형 Fc 영역을 가진 무관한 특이성의 인간 IgG4 항체.

도 8은 시간(일, x축) 경과에 따른 항체 농도(mcg/mL, y축)로 나타낸 인간화 CD47/SIRP α 마우스(CD47^{hu/huSIRP α})에서의 항-CD47 항체의 예시적 약동학적 프로파일을 나타낸다. Ab J, Ab F: 항-CD47 항체; Ab Fs: 작동인자 기능이 감소된 변형 Fc 영역을 가진 Ab F; Ab Fmono: Ab F의 1가 형태; hIgG4s: 작동인자 기능이 감소된 변형 Fc 영역을 가진 무관한 특이성의 인간 IgG4 항체.

도 9는 시간(일, x축) 경과에 따른 항체 농도(mcg/mL, y축)로 나타낸 야생형 마우스에서의 항-CD47 항체의 예시적 약동학적 프로파일을 나타낸다. 마우스 항-인간 항체 반응(MAHA)을 나타내는 마우스는 배제되었다. Ab J, Ab F, Ab I 및 Ab G: 항-CD47 항체; hIgG4s: 작동인자 기능이 감소된 변형 Fc 영역을 가진 무관한 특이성의 인간 IgG4 항체(별표: 15일 후의 모든 점들은 MAHA로 인해 hIgG4s 치료군으로부터 배제되었음); Ab J F(ab')₂: Ab J의 F(ab')₂ 단편.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

정의

[0059]

본 발명은 본원에 기술된 특정한 방법 및 실험 조건으로 제한되지 않는데, 이러한 방법 및 조건이 다양할 수 있기 때문이다. 또한 본 발명의 범주는 청구범위에 의해 정의되기 때문에 본원에서 사용된 용어는 단지 특정한 구현예를 설명하기 위한 것으로 제한하고자 하는 의도가 아닌 것으로 이해된다.

[0060]

다르게 정의되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 용어 및 어구는 용어 및 어구가 사용된 문맥으로부터 반대인 것이 명확하거나 확실하게 지시되지 않는 한 그러한 용어 및 어구가 당업계에서 달성하는 의미를 포함한다. 본원에 기술된 것과 동등하거나 유사한 임의의 방법 및 물질이 본 발명을 실행하거나 시험하기 위해 사용될 수 있지만, 특정한 방법 및 물질이 지금부터 기술된다. 본원에 언급된 모든 간행물은 참조로서 본원에 포함된다.

[0061]

관심 있는 하나 이상의 값에 대하여 본원에서 적용된 "대략"이라는 용어는 진술된 참조값과 유사한 값을 지칭한다. 특정한 구현예에서, "대략" 또는 "약"이라는 용어는 다르게 진술되거나 문맥으로부터 명백하지 않는 한 진술된 참조 값의 양 방향(초과 또는 미만)으로 25%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 이하 이내의 다양한 값을 지칭한다(이러한 수치가 가능한 값의 100%를 초과할 수 있는 경우는 제외).

[0062]

본원에 사용된 "생물학적 활성"이라는 용어는 시험관내 또는 생체내(예를 들어, 유기체 내) 생물학적 시스템에서 활성을 갖는 임의의 체제의 특성을 의미한다. 예를 들어, 유기체 내에 존재할 때, 유기체 내에서 생물학적 효과를 갖는 체제는 생물학적으로 활성인 것으로 간주된다. 단백질 또는 폴리펩티드가 생물학적으로 활성인 특정한 구현예에서, 단백질 또는 폴리펩티드의 적어도 하나의 생물학적 활성을 공유하는 단백질 또는 폴리펩티드의 부분은 통상적으로 "생물학적 활성" 부분으로 지칭된다.

[0063]

본원에 사용된 "유사한"이라는 용어는 서로 동일하지 않을 수 있지만 이들 사이에서 비교가 가능할 만큼 충분히 유사하여 관찰된 차이점 또는 유사점을 기초로 합리적으로 결론을 내릴 수 있는 2종 이상의 체제, 엔티티, 상황, 조건의 세트 등을 의미한다. 당업자는, 문맥 내에서 2종 이상의 이러한 체제, 엔티티, 상황, 조건의 세트 등에 대하여 임의의 주어진 상황에서 유사한 것으로 간주되는 데 어떠한 정도의 동일성이 필요한지를 이해할 것이다.

[0064]

본원에서 보존적 아미노산 치환을 설명하는 데 사용된 "보존적"이라는 용어는 유사한 화학적 성질(예를 들어, 전하 또는 소수성)을 지닌 측쇄 R기를 가지는 다른 아미노산 잔기에 의한 아미노산 잔기의 치환을 의미한다. 일반적으로, 보존적 아미노산 치환은 단백질의 관심 있는 기능적 성질, 예를 들어, 리간드에 결합하는 수용체의 능력을 실질적으로 변화시키지 않을 것이다. 유사한 화학적 성질을 갖는 측쇄를 가지는 아미노산의 균의 예는 다음을 포함한다: 지방족 측쇄, 예를 들어, 글리신, 알라닌, 발린, 류신, 및 이소류신; 지방족-하이드록실

[0065]

측쇄, 예를 들어 세린 및 트레오닌; 아미드 함유 측쇄, 예를 들어, 아스파라긴 및 글루타민; 방향족 측쇄, 예를 들어, 페닐알라닌, 티로신, 및 트립토판; 염기성 측쇄, 예를 들어, 라이신, 아르기닌, 및 히스티딘; 산성 측쇄, 예를 들어, 아스파르트산 및 글루탐산; 및, 황 함유 측쇄, 예를 들어, 시스테인 및 메티오닌. 보존적 아미노산 치환기는, 예를 들어, 발린/류신/이소류신, 페닐알라닌/티로신, 라이신/아르기닌, 알라닌/발린, 글루타메이트/아스파르테이트, 및 아스파라긴/글루타민을 포함한다. 일부 구현예에서, 보존적 아미노산 치환은, 예를 들어, 알라닌 스캐닝 돌연변이 유발에서 사용된 바와 같은 알라닌을 가지는 단백질 내 임의의 원래의 잔기의 치환일 수 있다. 일부 구현예에서, 보존적 치환은 참조로서 본원에 포함된 문헌(Gonnet *et al.* (1992) Exhaustive Matching of the Entire Protein Sequence Database, *Science* 256:1443-45)에 개시된 PAM250 로그 우도 매트릭스 내에서 양의 값을 가지는 것으로 만들어진다. 일부 구현예에서, 치환은 적당한 보존적 치환인데, 이러한 치환은 PAM250 로그 우도 매트릭스에서 음이 아닌 값을 가진다.

[0066] 본원에 사용된 "대조군"이라는 용어는 결과를 비교하는 표준이 되는 "대조군"이라는 당업계에서 이해되는 의미를 나타낸다. 통상적으로, 대조군은 변수들에 대한 결론을 내리기 위해 변수들을 분리하여 실험의 완전성을 높이기 위해 사용된다. 일부 구현예에서, 대조군은 비교자를 제공하기 위해 시험 반응 또는 검정과 동시에 수행되는 반응 또는 검정이다. 본원에서 사용된, "대조군"은 "대조군 동물"을 나타낼 수 있다. "대조군 동물"은 본원에 기술된 변형, 본원에 기술된 것과는 다른 변형을 가지거나 변형을 가지지 않을 수 있다(즉, 야생형 동물). 하나의 실험에서, "시험"(즉, 시험할 변수)이 적용된다. 제2 실험에서, "대조군," 시험할 변수가 적용되지 않는다. 일부 구현예에서, 대조군은 역사적 대조군(즉, 이전에 수행된 시험 또는 검정, 또는 이전에 알려진 양 또는 결과)이다. 일부 구현예에서, 대조군은 인쇄되거나 그렇지 않으면 저장된 기록이거나 이를 포함한다. 대조군은 양성 대조군 또는 음성 대조군일 수 있다.

[0067] 본원에 사용된 "파괴"라는 용어는 DNA 분자(예를 들어, 유전자 또는 유전자좌와 같은 내인성 상동성 서열)를 이용한 상동성 재조합 사건의 결과를 의미한다. 일부 구현예에서, 파괴는 DNA 서열(들)의 삽입, 결실, 치환, 대체, 미스센스 돌연변이, 또는 프레임 전환 또는 이들의 임의의 조합을 달성하거나 나타낼 수 있다. 삽입은 전체 유전자 또는 유전자의 단편, 예를 들어, 내인성 서열이 아닌 기원일 수 있는 엑손(예를 들어, 이종 서열)의 삽입을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 파괴는 유전자 또는 유전자 산물(예를 들어, 유전자에 의해 암호화된 단백질)의 발현 및/또는 활성을 증가시킬 수 있다. 일부 구현예에서, 파괴는 유전자 또는 유전자 산물의 발현 및/또는 활성을 감소시킬 수 있다. 일부 구현예에서, 파괴는 유전자의 서열 또는 암호화된 유전자 산물(예를 들어, 암호화된 단백질)을 바꿀 수 있다. 일부 구현예에서, 파괴는 유전자 또는 암호화된 유전자 산물(예를 들어, 암호화된 단백질)을 절단하거나 단편화할 수 있다. 일부 구현예에서, 파괴는 유전자 또는 암호화된 유전자 산물을 연장할 수 있는데; 일부 이러한 구현예에서, 파괴는 융합 단백질의 조립을 달성할 수 있다. 일부 구현예에서, 파괴는 유전자 또는 유전자 산물의 수준에 영향을 미칠 수 있지만 활성에는 영향을 미치지 않을 수 있다. 일부 구현예에서, 파괴는 유전자 또는 유전자 산물의 활성에는 영향을 미칠 수 있지만 수준에는 영향을 미치지 않을 수 있다. 일부 구현예에서, 파괴는 유전자 또는 유전자 산물의 수준에 유의한 효과를 가지지 않을 수 있다. 일부 구현예에서, 파괴는 유전자 또는 유전자 산물의 활성에 유의한 효과를 가지지 않을 수 있다. 일부 구현예에서, 파괴는 유전자 또는 유전자 산물의 수준 또는 활성 유의한 효과를 가지지 않을 수 있다.

[0068] "결정", "측정", "확인", "평가", "검정" 및 "분석"이라는 용어는 본원에서 임의의 형태의 측정을 지칭하기 위해 상호 교환적으로 사용되고, 요소의 존재 여부를 결정하는 것을 포함한다. 이러한 용어들은 정량적 및/또는 정성적 결정을 포함한다. 검정은 상대적이거나 절대적일 수 있다. "존재에 대한 검정"은 존재하는 어떤 것의 양을 결정하는 것 및/또는 존재 여부를 결정하는 것일 수 있다.

[0069] 본원에 사용된 "내인성 유전좌위" 또는 "내인성 유전자"라는 어구는 본원에 기술된 파괴, 결실, 대체, 변화, 또는 변형의 도입 전에 모 또는 참조 유기체에서 발견되는 유전자좌를 의미한다. 일부 구현예에서, 내인성 유전좌위는 자연계에서 발견되는 서열을 가진다. 일부 구현예에서, 내인성 유전좌위는 야생형 유전좌위이다. 일부 구현예에서, 참조 유기체는 야생형 유기체이다. 일부 구현예에서, 참조 유기체는 조작된 유기체이다. 일부 구현예에서, 참조 유기체는 (야생형이든 조작된 것이든) 실험실에서 배양된 유기체이다.

[0070] "내인성 프로모터"라는 어구는, 예를 들어, 야생형 유기체에서, 내인성 유전자와 자연적으로 연관된 프로모터를 의미한다.

[0071] "이중"이라는 용어는 상이한 근원으로부터의 제제 또는 엔티티를 의미한다. 예를 들어, 폴리펩티드, 유전자, 또는 유전자 산물에 관하여 사용되거나 특정한 세포 또는 유기체 내에 존재할 때, 이러한 용어는 관련된 폴리펩티드, 유전자, 또는 유전자 산물이: 1) 사람의 손에 의해 조작되었다; 2) 사람의 손에 의해(예를 들어, 유전자 조

작에 의해) 세포 또는 유기체(또는 이의 전구체)에 도입되었다; 그리고/또는 3) 관련 세포 또는 유기체(예를 들어, 관련 세포 유형 또는 유기체 유형)에 의해 자연적으로 생산되지 않거나 이에 존재하지 않는다는 것을 명확하게 한다.

[0072] 본원에 사용된 "숙주 세포"라는 용어는 이중(예를 들어, 외인성) 핵산 또는 단백질이 도입된 세포를 지칭한다. 본 개시를 읽는 당업자는 이러한 용어가 특정한 대상 세포를 언급하는 것 뿐 아니라 이러한 세포의 자손을 언급하기 위해 사용된다는 것을 이해할 것이다. 돌연변이 또는 환경적 영향에 의해 다음 세대에서 어떤 변형이 발생할 수 있기 때문에, 이러한 자손은, 사실, 모세포와 동일하지 않을 수 있지만, 본원에 사용된 "숙주 세포"라는 용어의 범주 내에 여전히 포함된다. 일부 구현예에서, 숙주 세포는 원핵 또는 진핵 세포이거나 이를 포함한다. 일반적으로, 숙주 세포는 세포가 지정된 계(Kingdom of life)에 관계없이 이중 핵산 또는 단백질을 수여받고/받거나 생산하기에 적합한 임의의 세포이다. 예시적인 세포는 원핵 세포 및 진핵 세포(단일 세포 또는 다세포), 박테리아 세포(예를 들어, 대장균, 바실러스 종, 스트렙토 마이세스 종의 균주 등), 마이코박테리아세포, 진균 세포, 효모 세포(예를 들어, *S.cerevisiae*, *S. pombe*, *P. pastoris*, *P. methanolica* 등), 식물 세포, 곤충 세포(예를 들어, SF-9, SF-21, 배칼로바이러스에 감염된 곤충 세포, *Trichoplusia ni* 등), 비인간 동물 세포, 인간 세포, 또는 세포 융합물, 예를 들어, 하이브리도마 또는 쿼드roma(quadroma)를 포함한다. 일부 구현예에서, 세포는 인간, 원숭이, 유인원, 햄스터, 랫트, 또는 마우스 세포이다. 일부 구현예에서, 세포는 진핵세포이고, 다음의 세포로부터 선택된다: CHO(예를 들어, CHOK1, DXB-11 CHO, Veggie-CHO), COS(예를 들어, COS-7), 망막 세포, Vero, CV1, 신장(예를 들어, HEK293, 293 EBNA, MSR 293, MDCK, HaK, BHK), HeLa, HepG2, WI38, MRC 5, Colo205, HB 8065, HL-60, (예를 들어, BHK21), Jurkat, Daudi, A431(상피), CV-1, U937, 3T3, L 세포, C127 세포, SP2/0, NS-0, MMT 060562, Sertoli 세포, BRL 3A 세포, HT1080 세포, 골수종 세포, 종양 세포, 및 전술된 세포로부터 유래한 세포주. 일부 구현예에서, 세포는 하나 이상의 바이러스 유전자, 예를 들어, 바이러스 유전자를 발현하는 망막 세포(예를 들어, PER.C6™ 세포)를 포함한다. 일부 구현예에서, 숙주 세포는 단리된 세포이거나 이를 포함한다. 일부 구현예에서, 숙주 세포는 조직의 일부이다. 일부 구현예에서, 숙주 세포는 유기체의 일부이다.

[0073] "인간화"라는 용어는, 자연계에서 비인간 동물에서 발견되는 특정 유전자 또는 단백질의 구조와 실질적으로 또는 동일하게 대응하는 부분을 포함하고, 관련된 특정 비인간 유전자 또는 단백질에서 발견되는 것과 상이한 대신 해당 인간 유전자 또는 단백질에서 발견되는 유사한 구조와 더욱 밀접하게 상응하는 부분도 포함하는 구조(즉, 뉴클레오티드 또는 아미노산 서열)를 가진 핵산 또는 단백질을 나타내기 위해 당업계에서 이해되는 의미에 따라 본원에서 사용된다. 일부 구현예에서, "인간화" 유전자는 인간 폴리펩티드(예를 들어, 인간 단백질 또는 이의 일부 - 예를 들어, 이의 특징적 부분)의 아미노산 서열과 같은 아미노산 서열을 실질적으로 가지는 폴리펩티드를 암호화하는 유전자이다. 하나의 예로서, 막 수용체의 경우, "인간화" 유전자는 인간 세포의 부분의 아미노산 서열과 같은 아미노산 서열을 갖는 세포의 부분 및 비인간(예를 들어, 마우스) 폴리펩티드의 서열과 같은 나머지 서열을 가지는 폴리펩티드를 암호화할 수 있다. 일부 구현예에서, 인간화 유전자는 인간 유전자의 DNA 서열의 적어도 일부를 포함한다. 일부 구현예에서, 인간화 유전자는 인간 유전자의 전체 DNA 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 인간화 단백질은 인간 단백질에서 나타나는 부분을 가지는 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 인간화 단백질은 인간 단백질의 전체 서열을 포함하고, 인간 유전자의 상동체 또는 오소로그에 상응하는 비인간 동물의 내인성 유전좌위로부터 발견된다.

[0074] 서열의 비교와 관련하여 본원에 사용된 "동일성"이라는 용어는 뉴클레오티드 및/또는 아미노산 서열 동일성을 측정하는 데 사용될 수 있는 당해 분야에 알려진 다수의 상이한 알고리즘에 의해 결정되는 동일성을 나타낸다. 일부 구현예에서, 본원에 기술된 동일성은 10.0의 오픈 갭 패널티, 0.1의 연장갭 패널티를 채용한 ClustalW v. 1.83(slow)정렬 및 Gonnet 유사성 매트릭스(MACVECTOR™ 10.0.2, MacVECTOR Inc., 2008)를 사용하여 결정된다.

[0075] 본원에 사용된 "단리된"이라는 용어는 (1) (자연계에서이든 실험실 세팅에서이든) 초기에 생산될 때 연관되었던 적어도 일부의 구성요소로부터 분리되고/되거나, (2) 사람의 손에 의해 설계, 생산, 제조 및/또는 제작된 물질 및/또는 엔티티를 의미한다. 단리된 물질 및/또는 엔티티는 초기에 연관되었던 다른 구성요소로부터 약 10%, 약 20%, 약 30%, 약 40%, 약 50%, 약 60%, 약 70%, 약 80%, 약 90%, 약 91%, 약 92%, 약 93%, 약 94%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98%, 약 99%, 또는 약 99%초과로 분리될 수 있다. 일부 구현예에서, 단리된 제제는 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 91%, 약 92%, 약 93%, 약 94%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98%, 약 99%, 또는 약 99%초과 순수하다. 본원에 사용된 바와 같이, 물질은 실질적으로 다른 구성요소가 없는 경우 "순수"하다. 일부 구현예에서, 당업자에게 이해되는 바와 같이, 물질은, 예를 들어, 하나 이상의 담체 또는 부형제(예를 들어, 완충액, 용매, 물 등)와 같은 어떤 다른 구성 요소와 조합된 후에도 여전히 "단리"되거나 심지어 "순수"한 것으로

간주될 수 있는데; 이러한 구현예에서, 물질의 단리 또는 순도 백분율은 이러한 담체 또는 부형제를 포함하지 않고 계산된다. 하나의 예로서, 일부 구현예에서, 자연계에서 발생하는 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드와 같은 생물학적 폴리머는: a) 파생의 기원 또는 근원으로 인해 자연계에서의 원래의 상태에서 동반되는 일부 또는 전체 구성요소와 연관되어 있는 경우; b) 자연계에서 이를 생산하는 종과 동일한 종의 다른 폴리펩티드 또는 핵산이 실질적으로 없는 경우; 또는 c) 자연계에서 이를 생산하는 종의 것이 아닌 세포 또는 다른 발현 시스템의 구성 요소에 의해 발현되거나 아니면 이와 연관되어 있는 경우에 "단리된" 것으로 간주된다. 따라서, 예를 들어, 일부 구현예에서, 화학적으로 합성되거나 자연계에서 폴리펩티드를 생산하는 세포 시스템과 상이한 세포 시스템에서 합성된 폴리펩티드는 "단리된" 폴리펩티드로 간주된다. 대안적으로 또는 추가적으로, 일부 구현예에서, 하나 이상의 정제 기술을 받은 폴리펩티드는, a) 자연계에서 폴리펩티드와 연관된 다른 구성요소; 및/또는 b) 초기에 생산될 때 폴리펩티드와 연관되었던 다른 구성 요소로부터 분리되어 있는 한 "단리된" 폴리펩티드로 간주될 수 있다.

[0076] 본원에 사용된 "비인간 동물"이라는 어구는 인간이 아닌 임의의 척추 동물 개체를 지칭한다. 일부 구현예에서, 비인간 동물은 원구류, 경골어, 연골 어류(예를 들어, 상어 또는 가오리), 양서류, 파충류, 포유류, 및 조류이다. 일부 구현예에서, 비인간 포유류는 영장류, 염소, 양, 돼지, 개, 소, 또는 설치류이다. 일부 구현예에서, 비인간 동물은 랫트 또는 마우스와 같은 설치류이다.

[0077] 본원에 사용된 "핵산"이라는 어구는, 넓은 의미에서, 올리고뉴클레오티드 사슬에 삽입되거나 삽입될 수 있는 임의의 화합물 및/또는 물질을 지칭한다. 일부 구현예에서, "핵산"은 인산디에스테르 결합을 통해 올리고뉴클레오티드 사슬에 삽입되거나 삽입될 수 있는 화합물 및/또는 물질이다. 문맥으로부터 명백해지는 바와 같이, 일부 구현예에서, "핵산"은 개별적인 핵산 잔기(예를 들어, 뉴클레오티드 및/또는 뉴클레오시드)를 의미하고; 일부 구현예에서, "핵산"은 개별적인 핵산 잔기를 포함하는 올리고뉴클레오티드 사슬을 의미한다. 일부 구현예에서, "핵산"은 RNA이거나 이를 포함하고; 일부 구현예에서, "핵산"은 DNA이거나 이를 포함한다. 일부 구현예에서, "핵산"은 하나 이상의 자연적인 핵산 잔기이거나 이를 포함하거나 이로 구성된다. 일부 구현예에서, "핵산"은 하나 이상의 핵산 유사체이거나 이를 포함하거나 이로 구성된다. 일부 구현예에서, 핵산 유사체는 인산디에스테르 골격을 활용하지 않는다는 점에서 "핵산"과 다르다. 예를 들어, 일부 구현예에서, "핵산"은 당해 분야에 알려지고 골격 내에 인산디에스테르 결합 대신 펩티드 결합을 가지는 하나 이상의 "펩티드 핵산"이거나, 이를 포함하거나 이로 구성되고, 본 발명의 범주 내인 것으로 간주된다. 대안적으로 또는 추가적으로, 일부 구현예에서, "핵산"은 인산디에스테르 결합보다는 하나 이상의 포스포로티오에이트 및/또는 5'-N-포스포라미디드 결합을 가진다. 일부 구현예에서, "핵산"은 하나 이상의 자연적인 뉴클레오시드(예를 들어, 아데노신, 티미딘, 구아노신, 시티딘, 우라실, 테옥시아데노신, 테옥시티미딘, 테옥시구아노신, 및 테옥시시티딘)이거나, 이를 포함하거나, 이로 구성된다. 일부 구현예에서, "핵산"은 하나 이상의 뉴클레오시드 유사체(예를 들어, 2-아미노아데노신, 2-티오티미딘, 이노신, 피롤로-피리미딘, 3-메틸 아데노신, 5-메틸시티딘, C-5 프로피닐-시티딘, C-5 프로피닐-우라실, 2-아미노아데노신, C5-브로모우라실, C5-플루오로우라실, C5-아이오도우라실, C5-프로피닐-우라실, C5-프로피닐-시티딘, C5-메틸시티딘, 2-아미노아데노신, 7-테자아데노신, 7-테자구아노신, 8-옥소아데노신, 8-옥소구아노신, O(6)-메틸구아닌, 2-티오시티딘, 메틸화 염기, 삽입 염기, 및 이의 조합)이거나, 이를 포함하거나 이로 구성된다. 일부 구현예에서, "핵산"은 천연 핵산의 당에 비해 하나 이상의 변형된 당(예를 들어, 2'-플루오로리보스, 리보스, 2'-테옥시리보스, 아라비노스, 및 핵소스)을 포함한다. 일부 구현예에서, "핵산"은 RNA 또는 단백질과 같은 기능적 유전자 산물을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 가진다. 일부 구현예에서, "핵산"은 하나 이상의 인트론을 포함한다. 일부 구현예에서, "핵산"은 자연적인 근원으로부터의 하나 이상의 단리체, 상보적인 주형에 기반한 중합에 의한 효소적 합성(생체내 또는 시험관내), 재조합 세포 또는 시스템에서의 재생산, 및 화학적 합성에 의해 제조된다. 일부 구현예에서, "핵산"은 적어도 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, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000개 이상의 잔기 길이이다. 일부 구현예에서, "핵산"은 단일 가닥이고; 일부 구현예에서, "핵산"은 이중 가닥이다. 일부 구현예에서, "핵산"은 폴리펩티드를 암호화하는 서열에 상보적이거나 폴리펩티드를 암호화하는 적어도 하나의 요소를 포함하는 뉴클레오티드 서열을 가진다. 일부 구현예에서, "핵산"은 효소 활성을 가진다.

[0078] 본원에 사용된 "작동가능하게 연결된"이라는 어구는 기술된 구성 요소를 의도된 방식으로 기능하도록 할 수 있는 하는 관계에 있는 병치를 의미한다. 코딩 서열에 "작동가능하게 연결된" 조절 서열은 코딩 서열의 발현이 조절 서열과 호환가능한 조건 하에 달성되도록 연결된다. "작동가능하게 연결된" 서열은 관심 있는 유전자에 인접한 발현 조절 서열 및 관심 있는 유전자를 조절하기 위해 일정한 거리에서 또는 트랜스로 작용하는 발현 조절

서열을 포함한다. 본원에 사용된 "발현 조절 서열"이라는 용어는 발현 조절 서열에 연결된 코딩 서열의 발현 및 가공을 수행하는 데 필요한 폴리뉴클레오티드 서열을 지칭한다. "발현 조절 서열"은 다음을 포함한다: 적절한 전사 개시, 종결, 프로모터 및 인핸서 서열; 스플라이싱 및 폴리아데닌화 신호와 같은 효율적인 RNA 가공 신호; 세포질 mRNA를 안정화하는 서열; 번역 효율을 증진하는 서열; 단백질 안정성을 증진하는 서열(즉, 코작 공통(Kozak consensus) 서열); 및 원하는 경우, 단백질 분비를 증진하는 서열. 이러한 조절 서열의 성질은 숙주 유기체에 따라 다르다. 예를 들어, 원핵생물에서, 이러한 조절 서열은 일반적으로 프로모터, 리보솜 결합 부위, 및 전사 종결 서열을 포함하는 반면, 진핵생물에서, 통상적으로, 이러한 조절 서열은 프로모터 및 전사 종결 서열을 포함한다. "조절 서열"이라는 용어는 존재하는 것이 발현 및 가공에 필수적인 구성 요소를 포함하는 것으로 의도되고, 존재하는 것이 유리한 추가적인 구성 요소, 예를 들어, 리더 서열 및 융합 파트너 서열을 포함할 수도 있다.

[0079] 본원에 사용된 "폴리펩티드"라는 용어는 아미노산의 임의의 폴리머 사슬을 의미한다. 일부 구현예에서, 폴리펩티드는 자연계에서 발생하는 아미노산 서열을 가진다. 일부 구현예에서, 폴리펩티드는 자연계에서 발생하지 않는 아미노산 서열을 가진다. 일부 구현예에서, 폴리펩티드는 서로 별개로 자연계에서 발생하는 부분(즉, 2종 이상의 상이한 유기체로부터, 예를 들어, 인간 및 비인간 부분)을 함유하는 아미노산 서열을 가진다. 일부 구현예에서, 폴리펩티드는 사람의 손의 작용을 통해 설계되고/되거나 생산된 조작된 아미노산 서열을 가진다.

[0080] 본원에 사용된 "재조합"이라는 용어는 재조합 수단에 의해 설계, 조작, 제조, 발현, 생성 또는 단리된 폴리펩티드(예를 들어, 본원에 기재된 CD47 폴리펩티드), 예컨대 숙주 세포에 형질감염된 재조합 발현 벡터를 사용하여 발현된 폴리펩티드, 재조합, 조합 인간 폴리펩티드 라이브러리로부터 단리된 폴리펩티드(Hoogenboom H. R., (1997) *TIB Tech.* 15:62-70; Azzazy H., 및 Highsmith W. E., (2002) *Clin. Biochem.* 35:425-445; Gaviglondo J. V., 및 Larrick J. W. (2002) *BioTechniques* 29:128-145; Hoogenboom H., 및 Chames P. (2000) *Immunology Today* 21:371-378), 인간 면역글로불린 유전자에 대해 유전자 이식된 동물(예컨대, 마우스)로부터 단리된 항체(예를 들어, Taylor, L. D., et al. (1992) *Nucl. Acids Res.* 20:6287-6295; Kellermann S-A., 및 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 참조) 또는 선택된 서열 요소들을 서로 스플라이싱하는 것을 포함하는 임의의 다른 수단에 의해 제조, 발현, 생성 또는 단리된 폴리펩티드를 나타내는 것으로 의도된다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 이러한 선택된 서열 요소는 자연계에서 발견된다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 이러한 선택된 서열 요소는 인실리코(*in silico*)로 설계된다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 이러한 선택된 서열 요소는, 예를 들어, 자연 또는 합성 공급원으로부터의 알려진 서열 요소의 돌연변이 유발(예를 들어, 생체내 또는 시험관내)에 기인한다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 재조합 폴리펩티드는 관심 있는 근원 유기체(예를 들어, 인간, 마우스 등)의 게놈에서 발견되는 서열로 이루어진다. 일부 구현예에서, 재조합 폴리펩티드는 (예를 들어, 비인간 동물 내에서, 예를 들어, 시험관내 또는 생체내) 돌연변이 유발에 기인한 아미노산 서열을 가지므로, 재조합 폴리펩티드의 아미노산 서열은 폴리펩티드 서열로부터 기원하고 이와 관련되지만 비인간 동물 생체내의 게놈 내에는 자연적으로 존재하지 않을 수 있는 서열이다.

[0081] "대체"라는 용어는 숙주 유전좌위(예를 들어, 게놈)에서 발견되는 "대체된" 핵산 서열(예를 들어, 유전자)이 그 유전좌위로부터 제거되고 다른 "대체" 핵산이 그 자리에 위치하는 과정을 나타내기 위해 본원에 사용된다. 일부 구현예에서, 대체된 핵산 서열 및 대체 핵산 서열은, 예를 들어 이들은 서로 상동성이고/이거나 해당 요소(예를 들어, 단백질-코딩 요소, 조절 요소 등)를 함유한다는 점에서 서로 유사하다. 일부 구현예에서, 대체된 핵산 서열은 프로모터, 인핸서, 스플라이싱 공여 부위, 스플라이싱 수용 부위, 인트론, 엑손, 미번역 영역(UTR) 중 하나 이상을 포함한다; 일부 구현예에서, 대체 핵산 서열은 하나 이상의 코딩 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 대체 핵산 서열은 대체된 핵산 서열의 상동체이다. 일부 구현예에서, 대체 핵산 서열 대체된 서열의 오소로그이다. 일부 구현예에서, 대체 핵산 서열은 인간 핵산 서열이거나 이를 포함한다. 일부 구현예에서, 대체 핵산 서열이 인간 핵산 서열이거나 이를 포함하는 경우를 포함하여, 대체된 핵산 서열은 설치류 서열(예를 들어, 마우스 또는 랫트 서열)이거나 이를 포함한다. 이렇게 배치된 핵산 서열은 이렇게 배치된 서열을 획득하기 위해 사용된 근원 핵산 서열의 일부(예를 들어, 프로모터, 인핸서, 5'- 또는 3'-미번역 영역 등)인 하나 이상의 조절 서열을 포함할 수 있다. 예를 들어, 다양한 구현예에서, 대체는 이렇게 배치된 핵산 서열(이중 서열을 포함)로부터 유전자 산물의 생산을 초래하지만 내인성 서열의 발현을 초래하지 않는 내인성 서열의 이중 서열로의 치환이다; 대체는 내인성 서열에 의해 암호화된 단백질과 유사한 기능을 갖는 단백질을 암호화하는 핵산 서열로 내인성 게놈 서열이 치환되는 것이다(예를 들어, 내인성 게놈 서열은 CD47 단백질을 암호화하고, DNA 단편은 하나 이상의 인간 CD47 단백질을 암호화한다). 다양한 구현예에서, 내인성 유전자 또는 이의 단편은 상응하는 인간

유전자 또는 이의 단편으로 대체된다. 상응하는 인간 유전자 또는 이의 단편은 대체된 내인성 유전자 또는 이의 단편의 오소로그이거나 구조 및/또는 기능에서 이와 실질적으로 유사하거나 이와 동일한 인간 유전자 또는 단편이다.

[0082] 본원에 사용된 "분화 클러스터 47 단백질" 또는 "CD47 단백질"이란 어구는 면역글로불린 상과에 속하고 세포의 아미노-말단 면역글로불린 V 도메인, 5개의 막관통 도메인 및 짧은 카르복실-말단 세포내 꼬리를 가진 다중 통과 막관통 단백질을 의미한다. CD47은 세포 표면 상에 발현되고, 예를 들어 인테그린, SIRP α 및 트롬보스폰딘-1(TSP-1)과 같은 막 표면 단백질 간의 상호작용에 관여한다. CD47은 정상 조직에서 발현되고 많은 인간 암에서 상향 조절된다. CD47은, 예를 들어 세포자멸, 증식, 부착 및 이동과 같은 여러 세포 과정에 관여하는 것으로 나타났다. 여러 텍일적으로 스플라이싱된 CD47 이소형이 마우스와 인간 사이에 확인되었다. 예시로서, 마우스 및 인간 CD47 유전자의 뉴클레오티드 및 아미노산 서열이 표 3에 제공되어 있다. 본 개시를 읽는 당업자는 게놈 내 하나 이상의 내인성 CD47 유전자(또는 전체)가 하나 이상의 이종 CD47 유전자(예를 들어, 다형성 변이체, 서브타입 또는 돌연변이체, 다른 종으로부터의 유전자, 인간화 형태 등)로 대체될 수 있다는 것을 인지할 것이다.

[0083] 본원에 사용된 "CD47 발현 세포"는 CD47 막관통 단백질을 발현하는 세포를 지칭한다. 일부 구현예에서, CD47 발현 세포는 그 표면에서 CD47 막관통 단백질을 발현한다. 일부 구현예에서, CD47 단백질은 세포의 표면에 발현된 CD47 막관통 단백질을 통해 세포-대-세포 상호작용을 매개하기에 충분한 양으로 세포의 표면에 발현된다. 예시적 CD47 발현 세포는 뉴런, 면역 세포, 케라틴세포 및 순환 세포를 포함한다. CD47 발현 세포는 면역 세포와 순환 세포의 상호작용을 조절하여 부착, 세포 증식 및/또는 세포자멸, 혈관 신생 및 염증과 같은 다양한 세포 과정을 조절한다. 일부 구현예에서, 본 발명의 비인간 동물은 비인간 동물의 하나 이상의 세포의 표면에 발현된 인간화 CD47 단백질을 통해 (본원에 기술된) 다양한 세포 과정의 조절을 보여준다.

[0084] "참조"라는 용어는 관심 있는 제제, 동물, 군, 개체, 모집단, 샘플, 서열 또는 값과 비교되는 표준 또는 대조 제제, 군, 개체, 모집단, 샘플, 서열 또는 값을 설명하기 위해 본원에 사용된다. 일부 구현예에서, 참조 제제, 군, 개체, 모집단, 샘플, 서열 또는 값은 관심 있는 제제, 군, 개체, 모집단, 샘플, 서열 또는 값의 시험 또는 결정과 실질적으로 동시에 시험 및/또는 결정된다. 일부 구현예에서, 참조 제제, 군, 개체, 모집단, 샘플, 서열 또는 값은, 선택적으로 유형 매체로 구현된, 역사적 참조이다. 일부 구현예에서, 참조는 대조군을 지칭할 수 있다. 본원에서 사용된, "참조" "참조 동물"을 지칭할 수 있다. "참조 동물"은 본원에 기술된 변형, 본원에 기술된 것과는 다른 변형을 가지거나 변형을 가지지 않을 수 있다(즉, 야생형 동물). 통상적으로, 당업자에 의해 이해될 수 있는 바와 같이, 참조 제제, 동물, 군, 개체, 모집단, 샘플, 서열 또는 값은 관심 있는 제제, 동물(예를 들어, 포유동물), 군, 개체, 모집단, 샘플, 서열 또는 값을 결정하거나 특성화하는 데 사용된 것과 유사한 조건 하에 결정되거나 특성화된다.

[0085] 본원에 사용된 "실질적으로"라는 용어는 관심 있는 특성 또는 성질의 전체 또는 거의 전체 범위 또는 정도를 나타내는 정성적인 조건을 의미한다. 생물학 분야의 숙련자는 생물학적 및 화학적 현상이 완료되고/되거나 완전성에 이르거나 절대 결과를 달성하거나 회피하는 것은 설사 있다고 하더라도 드물다는 것을 이해할 것이다. "따라서, 실질적으로"라는 용어는 많은 생물학적 및 화학적 현상에 내재적인 완전성의 잠재적 부족을 담아내기 위해 본원에서 사용된다.

[0086] 본원에 사용된 "실질적 상동"이라는 어구는 아미노산 또는 핵산 서열 간의 비교를 의미한다. 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 2개의 서열은 일반적으로, 상응하는 위치에 상동성 잔기를 함유하는 경우 "실질적 상동"인 것으로 간주된다. 상동성 잔기는 동일한 잔기일 수 있다. 대안적으로, 상동성 잔기는 적절하게는 유사한 구조적 및/또는 기능적 특성을 가진 동일하지 않은 잔기일 수 있다. 예를 들어, 당업자에게 잘 알려진 바와 같이, 특정 아미노산은 통상적으로 "소수성" 또는 "친수성" 아미노산, 및/또는 "극성" 또는 "비극성" 측쇄를 가지는 것으로 분류된다. 하나의 아미노산이 동일한 유형의 다른 것으로 치환되는 것은 흔히 "상동성" 치환으로 간주될 수 있다. 통상적인 아미노산 분류가 표 1 및 2에 요약되어 있다.

표 1

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

[0087]

표 2

불분명한 아미노산	3-글자	1-글자
아스파라긴 또는 아스파르트산	Asx	B
글루타민 또는 글루탐산	Glx	Z
류신 또는 이소류신	Xle	J
명시되지 않거나 알려지지 않은 아미노산	Xaa	X

[0088]

[0089]

당해 분야에 잘 알려진 바와 같이, 아미노산 또는 핵산 서열은 뉴클레오티드 서열에 대한 BLASTN 및 아미노산 서열에 대한 BLASTP, 갭 BLAST, 및 PSI-BLAST와 같이 상업적으로 입수가능한 컴퓨터 프로그램을 포함하여, 다양한 임의의 알고리즘을 사용하여 비교할 수 있다. 예시적인 이러한 프로그램은 문헌(Altschulet *al.* (1990) Basic local alignment search tool, *J. Mol. Biol.*, 215(3): 403-410; Altschulet *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; 및 Miseneret *al.* (eds.)(1999) *Bioinformatics Methods Protocols(Methods in Molecular Biology*, Vol. 132), *Humana Press*)에 기술되어 있다. 상동성 서열 확인 외에도, 전술된 프로그램은 통상적으로 상동성의 정도의 지표를 제공한다. 일부 구현예에서, 2개의 서열은 잔기의 관련 구간에 걸쳐 상응하는 잔기가 적어도 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상이 상동성인 경우 실질적으로 상동성인 것으로 간주된다. 일부 구현예에서, 관련 구간은 완전한 서열이다. 일부 구현예에서, 관련 구간은 적어도 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17개 이상의 잔기이다. 일부 구현예에서, 관련 구간은 완전한 서열을 따라 인접 잔기를 포함한다. 일부 구현예에서, 관련 구간은 완전한 서열을 따라 불연속 잔기를 포함한다. 일부 구현예에서, 관련 구간은 적어도 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50개 이상의 잔기이다.

[0090]

본원에 사용된 "실질적 동일성"이라는 어구는 아미노산 또는 핵산 서열 간의 비교를 의미한다. 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 2개의 서열은 일반적으로, 상응하는 위치에 동일한 잔기를 함유하는 경우 "실질적으로 동일"한 것으로 간주된다. 당해 분야에 잘 알려진 바와 같이, 아미노산 또는 핵산 서열은 뉴클레오티드 서열에 대한 BLASTN 및 아미노산 서열에 대한 BLASTP, 갭 BLAST, 및 PSI-BLAST와 같이 상업적으로 입수가능한 컴퓨터 프로

그램을 포함하여, 다양한 임의의 알고리즘을 사용하여 비교할 수 있다. 예시적인 이러한 프로그램은 문헌 (Altschulet *al.* (1990) Basic local alignment search tool, *J. Mol. Biol.*, 215(3): 403-410; Altschul *et al.*, *Methods in Enzymology*; Altschul *et al.* (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402; Baxevanis *et al.* (1998) *Bioinformatics: A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins*, Wiley; 및 Misener *et al.*, (eds.) (1999) *Bioinformatics Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology, Vol. 132)*, Humana Press)에 기술되어 있다. 동일한 서열 확인 외에도, 전송된 프로그램은 통상적으로 동일성의 정도의 지표를 제공한다. 일부 구현예에서, 2개의 서열은 잔기의 관련 구간에 걸쳐 상응하는 잔기가 적어도 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상이 동일한 경우 실질적으로 동일한 것으로 간주된다. 일부 구현예에서, 관련 구간은 완전한 서열이다. 일부 구현예에서, 관련 구간은 적어도 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50개 이상의 잔기이다.

[0091] 본원에 사용된 "표적화 벡터" 또는 "표적화 작제물"이라는 어구는 표적 영역을 포함하는 폴리뉴클레오티드 분자를 의미한다. 표적 영역은, 표적 세포, 조직 또는 동물 내 서열과 동일하거나 실질적으로 동일하고 상동성 재조합을 통해 세포, 조직 또는 동물의 게놈 내 위치에 표적화 작제물의 통합을 제공하는 서열을 포함한다. 부위 특이적 재조합효소 인식 부위(예를 들어, *loxP* 또는 *Frt* 부위)를 이용하여 표적화하는 표적 영역도 포함된다. 일부 구현예에서, 본 발명의 표적화 작제물은 특히 관심 있는 핵산 서열 또는 유전자, 선택가능한 마커, 제어 및 또는 조절 서열, 및 이러한 서열을 포함하는 재조합을 돕거나 촉진하는 단백질의 외인성 첨가를 통해 매개되는 재조합을 가능하게 하는 다른 핵산 서열을 더 포함한다. 일부 구현예에서, 본 발명의 표적화 작제물은, 전체적 또는 부분적으로, 관심 있는 유전자를 더 포함하고, 관심 있는 유전자는 내인성 서열에 의해 암호화된 단백질과 유사한 기능을 가지는 단백질을 전체적 또는 부분적으로 암호화하는 이중 유전자이다. 일부 구현예에서, 본 발명의 표적화 작제물은, 전체적 또는 부분적으로, 관심 있는 인간화 유전자를 더 포함하고, 관심 있는 인간화 유전자는 내인성 서열에 의해 암호화된 단백질과 유사한 기능을 가지는 단백질을 전체적 또는 부분적으로 암호화한다.

[0092] 본원에 사용된 "변이체"라는 용어는 참조 엔티티와 상당한 구조적 동일성을 나타내지만 참조 엔티티와 비교하여 하나 이상의 화학적 모이어티의 존재 또는 수준에서 참조 엔티티와 구조적으로 상이한 엔티티를 의미한다. 많은 구현예에서, "변이체"는 또한 참조 엔티티와 기능적으로 상이하다. 일반적으로, 특정 엔티티가 참조 엔티티의 "변이체"로 간주되는 것이 적절한지는 참조 엔티티와의 구조적 동일성의 정도에 기초한다. 당업자에게 이해되는 바와 같이, 임의의 생물학적 또는 화학적 참조 엔티티는 특정한 특징적인 구조적 요소를 가진다. "변이체"는, 정의에 의해, 하나 이상의 이러한 특징적 구조적 요소를 공유하는 별개의 화학적 엔티티이다. 몇 가지 예로서, 소분자는 특징적인 코어 구조적 요소(예를 들어, 거대고리 코어) 및/또는 하나 이상의 특징적인 팬던트 모이어티를 가질 수 있어서 소분자의 변이체는 코어 구조적 요소 및 특징적인 팬던트 모이어티를 공유하지만 다른 팬던트 모이어티 및/또는 코어 내 존재하는 결합의 유형(단일 대 이중, E 대 Z 등)이 다른 것이고, 폴리펩티드는 선형 또는 3차원 공간에서 서로에 대해 지정된 위치를 가지고/가지거나 특정한 생물학적 기능에 기여하는 복수의 아미노산으로 이루어진 특징적인 서열 요소를 가질 수 있고, 핵산은 선형 또는 3차원 공간에서 서로에 대해 지정된 위치를 가지는 복수의 뉴클레오티드 잔기로 이루어진 특징적인 서열 요소를 가질 수 있다. 예를 들어, "변이체 폴리펩티드"는 아미노산 서열에서의 하나 이상의 차이 및/또는 폴리펩티드 골격에 공유결합된 화학적 모이어티(예를 들어, 탄수화물, 지질 등)에서의 하나 이상의 차이의 결과 참조 폴리펩티드와 상이할 수 있다. 일부 구현예에서, "변이체 폴리펩티드"는 참조 폴리펩티드와 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 또는 99%의 전체 서열 동일성을 보인다. 대안적으로 또는 추가적으로, 일부 구현예에서, "변이체 폴리펩티드"는 참조 폴리펩티드와 적어도 하나의 특징적인 서열 요소를 공유하지 않는다. 일부 구현예에서, 참조 폴리펩티드는 하나 이상의 생물학적 활성을 가진다. 일부 구현예에서, "변이체 폴리펩티드"는 참조 폴리펩티드의 하나 이상의 생물학적 활성을 공유한다. 일부 구현예에서, "변이체 폴리펩티드"는 참조 폴리펩티드의 하나 이상의 생물학적 활성이 결여되어 있다. 일부 구현예에서, "변이체 폴리펩티드"는 참조 폴리펩티드와 비교하여 하나 이상의 생물학적 활성의 수준의 감소를 나타낸다. 많은 구현예에서, 관심 있는 폴리펩티드는 관심 있는 폴리펩티드가 특정한 위치에서의 소수의 서열 변경을 제외하고 모체의 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 가지는 경우 모 또는 참조 폴리펩티드의 "변이체"인 것으로 간주된다. 통상적으로, 모체와 비교하여 변이체 내 잔기의 20%, 15%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% 미만이 치환된다. 일부 구현예에서, "변이체"는 모체와 비교하여 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 또는 1개의 치환된 잔기를 가진다. 흔히, "변이체"는 매우 적은(예를 들어, 5, 4, 3, 2, 또는 1 미만)의 수의 치환된 기능적 잔기(즉, 특정 생물학적 활성에 참여하는 잔기)를 가진다. 또한, "변이체"는 통상적으로 모체와 비교하여, 5, 4, 3, 2, 또는 1개 이하의 첨가 또는 결실을 가지며, 흔히 첨가 또는 결실을 갖지 않는다. 또한, 임의의 첨가 또는 결실은, 통상적으로 약 25,

약 20, 약 19, 약 18, 약 17, 약 16, 약 15, 약 14, 약 13, 약 10, 약 9, 약 8, 약 7, 약 6개 미만, 일반적으로는 약 5, 약 4, 약 3, 또는 약 2개 미만의 잔기이다. 일부 구현예에서, 모 또는 참조 폴리펩티드는 자연계에서 발견되는 것이다. 당업자에게 이해되는 바와 같이, 관심 있는 특정 폴리펩티드의 복수의 변이체는 관심 있는 폴리펩티드가 특히 감염원 폴리펩티드인 경우 자연계에서 흔히 발견될 수 있다.

[0093] 본원에 사용된 "백터"라는 용어는 결합된 다른 핵산을 이송할 수 있는 핵산 분자를 의미한다. 일부 구현예에서, 백터는 진핵 및/또는 원핵세포와 같은 숙주 세포에서 백터에 연결된 핵산의 염색체의 복제 및/또는 발현을 할 수 있다. 작동가능하게 연결된 유전자의 발현을 유도할 수 있는 백터를 본원에서 "발현 백터"로 지칭한다.

[0094] 본원에 사용된 "야생형"이라는 용어는 "정상"(돌연변이, 질환, 변경 등과 대조됨) 상태 또는 맥락에서 자연계에서 발견되는 구조 및/또는 활성을 갖는 엔티티를 나타내는 당업계에서 이해되는 의미를 갖는다. 당업자는 야생형 유전자 및 폴리펩티드가 흔히 여러 상이한 형태(예를 들어, 대립유전자)로 존재한다는 것을 이해할 것이다.

[0095] **특정 구현예의 상세한 설명**

[0096] 본 발명은 특히, 암 치료, 이식 생착, 활성화 및 식균작용 및 신호 전달의 검정용 CD47 길항제(예를 들어, 항-CD47 항체)의 치료 효능을 결정하기 위한 분화 클러스터 47(CD47) 유전자를 암호화하는 인간화 유전 물질을 갖는 개선 및/또는 조작된 비인간 동물을 제공한다. 이러한 비인간 동물은 CD47 길항제의 치료 효능 및 CD47 차단에 대한 가능성 결정에 있어서의 개선을 제공할 것으로 예상된다. 또한, 이러한 비인간 동물은 인간 세포의 이식 생착 개선을 제공할 것으로 예상된다. 따라서, 본 발명은 다양한 암의 치료뿐만 아니라 비인간 동물에서 인간 조혈 세포를 유지하기 위한 항-CD47 요법의 개발에 특히 유용하다. 특히, 본 발명은 비인간 동물의 세포 표면에서 인간화 CD47 단백질의 발현을 초래하는 쥐과 동물 CD47 유전자의 인간화를 포함한다. 이러한 인간화 CD47 단백질은 중앙 세포의 식균작용을 활성화시키는 항-CD47 치료제의 효능을 결정하기 위한 인간 CD47⁺ 세포의 공급원을 제공하는 능력을 갖는다. 또한, 이러한 인간화 CD47 단백질은 생착된 인간 세포의 표면에 존재하는 다른 세포 표면 단백질 및 리간드(예를 들어, SIRPα)의 결합을 통해, 생착된 인간 세포를 인지하는 능력을 갖는다. 일부 구현예에서, 본 발명의 비인간 동물은 비인간 동물의 세포 표면에 발현된 인간화 CD47 단백질을 통한 CD47 신호전달의 차단을 통해 식균작용을 활성화할 수 있다. 일부 구현예에서, 본 발명의 비인간 동물은 이식된 인간 조혈 세포를 수용할 수 있고; 일부 구현예에서, 이러한 비인간 포유동물은 인간 세포를 포함하는 면역계를 개발 및/또는 보유한다. 일부 구현예에서, 인간화 CD47 단백질은 인간 CD47 단백질의 N-말단 면역글로불린 V 도메인에 상응하는 서열을 가진다. 일부 구현예에서, 인간화 CD47 단백질은 인간 CD47 단백질의 세포의 부분 및 막관통 부분을 포함하는 인간 CD47 단백질의 N-말단 부분에 상응하는 서열을 가지며, 세포의 부분은 인간 CD47 단백질의 N-말단 면역글로불린 V 도메인을 포함하고, 막관통 부분은 인간 CD47 단백질의 5개의 막관통 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, 인간화 CD47 단백질은 비인간 동물(예를 들어, 쥐과 동물) CD47 단백질의 세포질내 꼬리에 상응하는 서열을 가진다. 일부 구현예에서, 인간화 CD47 단백질은 인간 CD47 단백질의 아미노산 잔기 19~292(또는 19~141, 또는 19~127)에 상응하는 서열을 가진다. 일부 구현예에서, 본 발명의 비인간 동물은 비인간 동물 및 이종 종(예를 들어, 인간)으로부터의 유전 물질을 함유하는 내인성 CD47 유전자를 포함한다. 일부 구현예에서, 본 발명의 비인간 동물은 인간화 CD47 유전자를 포함하고, 인간화 CD47 유전자는 인간 CD47 유전자의 N-말단 면역글로불린 V 도메인을 포함하는 세포의 부분을 암호화하는 인간 CD47 유전자의 엑손을 포함한다. 일부 구현예에서, 인간화 CD 유전자는 인간 CD47 엑손, 예를 들어 인간 CD47 단백질의 세포의 부분 및 막관통 부분을 포함하는 인간 CD47 단백질의 N-말단 부분을 암호화하는 엑손 2~7을 포함하고, 세포의 부분은 인간 CD47 단백질의 N-말단 면역글로불린 V 도메인을 포함하고, 막관통 부분은 인간 CD47 단백질의 5개의 막관통 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, 인간화 CD47 유전자는 신호 펩티드를 전체적 또는 부분적으로 암호화하고 비인간 CD47 단백질의 세포질내 꼬리를 암호화하는 비인간 CD47 엑손을 포함한다. 일부 구현예에서, 인간화 CD47 유전자는 비인간 CD47 엑손 1 및 세포질내 꼬리 및 3' UTR을 암호화하는 엑손 7의 하류 엑손(들)을 포함한다. 이소형에 따라, 모든 이소형에 대해 정지 코돈 및 3' UTR이 마지막 엑손에 존재하면서, 엑손 7의 하류에 하나 이상의 엑손이 있을 수 있다. 예를 들어, 표 3에 나타난 마우스 및 인간 CD47의 이소형 2는 엑손 8 및 9로 표시한, 엑손 7 하류의 2개의 엑손을 가진다.

[0097] 본 발명의 다양한 양태는 다음의 섹션에서 상세히 설명된다. 섹션의 용도는 본 발명을 제한하고자 하는 것이 아니다. 각각의 섹션은 본 발명의 임의의 양태에 적용될 수 있다. 본 출원에서, "또는"의 사용은 달리 명시하지 않는 한 "및/또는"을 의미한다.

[0098] **분화 클러스터 47(CD47) 유전자**

[0099] 원래 면역 세포 상의 인테그린으로부터 신호 전달 역할 때문에 인테그린 관련 단백질(IAP)로 명명된 CD47은 N-

말단 면역글로불린 V(IgV) 도메인, 5개의 막관통 도메인, 및 짧은 C-말단 세포질내 꼬리를 포함하는 막관통 단백질이다. 세포질내 꼬리는 확인된 4개의 택일적으로 스플라이싱된 이소형에 따라 길이가 다르다. CD47(또는 IAP)은 초기에 모든 조직(이소형 2), 뉴런(이소형 4) 및 케라틴세포 및 대식세포(이소형 1; Reinhold *et al.* (1995) *J. Cell Sci.* 108:3419-3425 참조) 상에서 발현되는 것으로 설명되었다. 4개의 이소형 중 두 번째로 긴 세포질내 꼬리를 가진 이 형태에도 불구하고 이소형 3에 대해서는 거의 알려지지 않았다. 인테그린 외에도, CD47은, 몇몇 다른 세포 표면 단백질, 예컨대 트롬보스폰딘 및 SIRP과의 구성원과 상호작용하는 것으로 알려져 있다. 가장 주목할만한 것은, CD47이 SIRP α와 상호작용하며, 예를 들어 식균작용 및 T 세포 활성화의 억제와 같은 다양한 세포-대-세포 반응을 조절하는 양방향 신호전달을 유도한다는 것이다. 실제로, CD47-SIRP α 상호작용은 면역 감시를 회피할 수 있는 능력을 종양 세포에 제공하는 역할에 대해 최근 몇 년간 집중되어 왔다. SIRP α에 결합하는 CD47은 일반적으로 정상 세포에 대한 항포식 신호("먹지마")를 통해 보호를 제공한다. 그러나, CD47을 포함하여, 종양 또한 항포식 신호를 발현하여 식균작용에 의한 파괴를 피하는 것으로 밝혀졌다. 흥미롭게도, CD47은 몇몇 혈액암에서 상향조절되고 종양의 성장 및 전파 모두에 기여하는 것으로 알려져 있다(Chao *et al.* (2012) *Curr Opin Immunol.* 24(2): 225-232).

[0100] 암의 새로운 치료로서 CD47을 표적화하는 완전한 효과 및 CD47-SIRP α 경로는 알려져 있지 않으며, 일부 가능한 유독성이 조사되었다. 미래의 암 치료를 위한 보다 나은 표적 요법을 개발하기 위해 CD47 신호전달 및 CD47-SIRP α 경로를 더 철저하고 상세히 이해하는 것이 필요하다.

[0101] **CD47 서열**

[0102] 마우스 및 인간에 대한 예시적 CD47 서열을 표 3에 제시한다. mRNA 서열의 경우, 굵은 글씨체는 코딩 서열을 나타내며, 표시된 경우, 연속 엑손은 교대로 밑줄 친 텍스트로 구분된다. 마우스 및 인간 단백질 서열의 경우, 신호 펩티드는 밑줄이 그어져 있고, 세포의 서열은 굵은 글씨체로 표시되어 있고, 세포내 서열은 이탤릭체로 표시되어 있다. 인간화 단백질 서열의 경우, 비인간 서열은 일반 글꼴로 표시되어 있고, 인간 서열은 굵은 글씨체로 표시되어 있고, 신호 펩티드는 밑줄이 그어져 있다. 보여진 바와 같이, 이소형은 엑손의 수가 다르다. 예를 들어, 인간 CD47 유전자의 이소형 1~4는 각각 총 8, 9, 10 및 11개의 엑손을 가지며, 각 이소형의 엑손 2~7은 세포의 도메인 및 5개의 막관통 도메인을 암호화한다.

[0103] **표 3**

[0104] **마우스 CD47 mRNA 이소형 1(XM_006521810.1)**

[0105] GCCTACACCGGGAGAGCAGGGAGGAGGAGTTGGACTGAGGTTGGGCGGCTCCGAGGTCAGGGCGAGCTTGCCAGAGGGAGTAGAGAGCAGCGGGGCTGCG CAGGGACGCGTGGCGTGAGTTCCGGTGAGCGTGTGTGCCATGCTCCCGTCTTTCAGGCCGGCCAGGACACGAAGCCGGAAGAGAGCTGGCTGGAGGGAC GGGGGCCGTGAGCAGAGAGTGCAACCCGCGCAGCCCGGGGACAGGCTGATTCTTGGCGCTCTCCGCCGAGCCTGCCAGGGCTGGGTGTGAGGCTGGCGT CACGTCAACGAGCAGAGGCGGCCAGGCGGGGCGAGTGCAGCGTGCAGGGGCGGCGAGCAGCGCGCGCGCACCCCCGGGCGAGCTGGGCGGCCGCTCCT GCCTGTCACTGCTGCGGGCGTGTGGTCCGTTCCCTTGAAGCGCAGCGGAGGCGGGGCTGCTCCAGACACCTGCGGCGGCGACCCCCGGGCGGCG CGGAGATGTGGCCCTTGGCGGCGCGCTGTGTGGGCTCCTGCTGCTGCGGTTTCAGCTCAACTACTGTTTAGTAACGTCAACTCCATAGAGTTCACTTCAT GCAATGAAACTGTGGTCAATCCCTGTCATCGTCCGTAATGTGGAGGCGCAAAGCACCGAAGAAATGTTTGTGAAGTGAAGTTGAACAAATCGTATATTTTCA TCTATGATGGAATAAAAATAGCACTACTACAGATCAAACTTTACCAGTGCAAAATCTCAGTCTCAGACTTAATCAATGGCATTGCCTCTTTGAAAATGG ATAAGCGGATGCCATGGTGGGAACTACACTTGCAGAGTACAGAGTTATCCAGAGAAGGCAAACAGTTATAGAGTGAAAACCCGACGGCCTCAACA CTGACCAAGGATCAGCCTGTTCTTACGAGGAGGAGAAAGGAGTTGCAAATAGTTTCGTTGGTTTTCTCCAAATGAAAAGATCCTCATTGTTATTTTCCCAA TTTTGGCTATACTCCTGTTCTGGGAAAGTTTGGTATTTAACACTCAAATATAAATCCAGCCATACGAATAAGAGAATCATTCTGCTGCTCGTTGCCGGC TGGTGCTCACAGTCATCGTGGTGTGGAGCCATCCTTCTCATCCAGGAGAAAAGCCGTGAAGAATGCTTCTGGACTTGGCCTCATTGTAATCTCTACGG GGATATTAATACTACTTCACTAGTACAATGTGTTATGACAGCTTTTGAATGACCTCTTTCACCATTGCCATATTGATCACTCAAGTGTGGGCTACGTCCTTG CTTTGGTCCGGCTGTGCTCTGCATCATGGCATGTGAGCCAGTGCACGGCCCCCTTTTGATTTCAGGTTTGGGATCATAGCTCTAGCAGAACTACTTGGAT TAGTTTTATATGAAGTTTGCGAATAGGTAATATTATATACTAATAAAACATTTTAAGCTA (서열 번호: 1)

[0106] **마우스 CD47 아미노산 이소형 1(XP_006521873.1)**

[0107] MWPLAAALLLLGSCCGSAQLLFNVNSIEFTSCNETVIVPCIVRVEAQSTBEMFVKWLNKSYIFIYDGNKNSITTDQNFSAKISVSDLINGIASLKMDK RDAMVGNVYTCVTELSREGKTVIELKNRTAFNTDQGSACSYEEBKGGCKLVSWFSPNEKILIVIFPILAILLFWGKFGILTLKYKSSHTNKRIILLVAGLV LTVIVVVGAILLIPGEKPVKNASGLGLIVISTGILILLQYNVFMATFGMTSFTIAILITQVLGYVLALVGLCLCIMACEPVHGPLLISGLGIIALAELLGLV YMKFV(서열 번호: 2)

[0108] **마우스 CD47 mRNA 이소형 2(XM_006521811.1)**

- [0109] GCCTACACCGGGAGAGCAGGGAGGAGGAGTTGGACTGAGGTTGGGCGGCTCCGAGGTCCAGGGCGAGCTTGCCAGAGGGAGTAGAGAGCAGCGGGGCTGCG CAGGGACCGTGCCGTGAGTTCGGGTGAGCGTGTGTGCCATGCTCCCGTCTTTCAGGCCGGCCAGGACACGAAGCCGGAAGAGAGCTGGCTGGAGGGAC GGGGGCCGTGAGCAGAGAGTGCAACCCGCGCAGCCCCGGGGACAGGCTGATTCTTGGCGCTCTCCGCCGAGCCTGCCAGGGCTGGGTGTGAGGCTGGCGT CACGTCAACGAGCAGAGGCGCCAGGCGGGGCGAGTGC GCGTGC GCGGGGCGGAGCAGCGCGCGCGCGCACCCCCGGGCAGCCTGGGCGGCCGCTCCT GCCTGTCACTGTGCGGCGCTGTGGTCCGTTCCCTTGAAGGCAGCAGCGGAGGCGGGCTGCTCCAGACACCTGCGGCGGGACCCCCGGGCGCG CGGAGATGTGGCCCTTGGCGGGCGCTGTGTGGCTCCTGTGTGCGGTTCACTACTGTTTAGTAACGTCACTCCATAGAGTTCACTTCAT GCAATGAAACTGTGGTCAATCCCTGTCATCGTCCGTAATGTGGAGGCGAAAGCACCGAAGAAATGTTTGTGAAGTGAAGTTGAACAAATCGTATATTTTCA TCTATGATGAAATAAAAAATAGCACTACTACAGATCAAACTTTACCAGTGCAAAAATCTCAGTCTCAGACTTAATCAATGGCATTGCCTCTTTGAAAATGG ATAAGCGGATGCCATGGTGGGAAACTACACTTGCGAAGTGACAGAGTTATCCAGAGAAGGCAAAACAGTTATAGAGCTGAAAACCCGACGGTTTCGTGGT TTTCTCCAAATGAAAAGATCCTCATTGTTATTTTCCCAATTTTGGCTATACTCCTGTCTGGGAAAGTTGGTATTTAACACTCAAATATAAATCCAGCC ATACGAATAAGAGAAATCATTCTGTCTCGTTGCCGGGCTGGTGTACAGTCACTGTGGTGTGGAGCCATCCTTCTCATCCAGGAGAAAAGCCCGTGA AGAATGCTTCTGGACTTGGCCTCATTGTAATCTCTACGGGGATATTAATACTACTTCAGTACAATGTGTTATGACAGCTTTTGAATGACCTCTTTCACCA TTGCCATATTGATCACTCAAGTGTGGCTACGTCCTTGTCTTGGTTCGGGCTGTGTCTCTGCATCATGGCATGTGAGCCAGTGCACGGCCCCCTTTGATTT CAGGTTTGGGATCATAGCTTAGCAGAACTACTTGGATTAGTTTATGAAGTTTGTGCTTCCAACCAGAGGACTATCCAACCTCTAGGAATAGGTAAT ATTATATACTTAATAAACATTTTAAAGCTA (서열 번호: 3)
- [0110] **마우스 CD47 아미노산 이소형 2(XP_006521874.1)**
- [0111] MWPLAAALLLGSCCGSAQLLFSNVNSIEFTSCNETVVIPIVRNVEAQSTEEMFVKWLNKSYIF IYDGNKNSTTTDQNFSAKISVSDLINGIASLKMDK RDAMVGNYTEVELSREGKTVIELKNRTVSWFSPNEKILIVIFPILAILLFWGKFGILTLKYKSSHTNKRI ILLL VAGLVLTIVVVGA ILLIPGEKPVKN ASGLGLIVISTGILILLQYNVMTAFGMTSFTIAILITQVLGYLALVGLCLCIMACEPVHGPLLISGLGIIALAE LLGLVYMKFVASNQRTIQPPRNR (서열 번호: 4)
- [0112] **마우스 CD47 mRNA 이소형 3(XM_006521807.1)**
- [0113] GCCTACACCGGGAGAGCAGGGAGGAGGAGTTGGACTGAGGTTGGGCGGCTCCGAGGTCCAGGGCGAGCTTGCCAGAGGGAGTAGAGAGCAGCGGGGCTGCG CAGGGACCGTGCCGTGAGTTCGGGTGAGCGTGTGTGCCATGCTCCCGTCTTTCAGGCCGGCCAGGACACGAAGCCGGAAGAGAGCTGGCTGGAGGGAC GGGGGCCGTGAGCAGAGAGTGCAACCCGCGCAGCCCCGGGGACAGGCTGATTCTTGGCGCTCTCCGCCGAGCCTGCCAGGGCTGGGTGTGAGGCTGGCGT CACGTCAACGAGCAGAGGCGCCAGGCGGGGCGAGTGC GCGTGC GCGGGGCGGAGCAGCGCGCGCGCGCACCCCCGGGCAGCCTGGGCGGCCGCTCCT GCCTGTCACTGTGCGGCGCTGTGGTCCGTTCCCTTGAAGGCAGCAGCGGAGGCGGGCTGCTCCAGACACCTGCGGCGGGACCCCCGGGCGCG CGGAGATGTGGCCCTTGGCGGGCGCTGTGTGGCTCCTGTGTGCGGTTCACTACTGTTTAGTAACGTCACTCCATAGAGTTCACTTCAT GCAATGAAACTGTGGTCAATCCCTGTCATCGTCCGTAATGTGGAGGCGAAAGCACCGAAGAAATGTTTGTGAAGTGAAGTTGAACAAATCGTATATTTTCA TCTATGATGAAATAAAAAATAGCACTACTACAGATCAAACTTTACCAGTGCAAAAATCTCAGTCTCAGACTTAATCAATGGCATTGCCTCTTTGAAAATGG ATAAGCGGATGCCATGGTGGGAAACTACACTTGCGAAGTGACAGAGTTATCCAGAGAAGGCAAAACAGTTATAGAGCTGAAAACCCGACGGCCTCAACA CTGACCAAGGATCAGCCTGTTCTTACGAGGAGGAGAAAGAGGTTGCAAATTAGTTTCGTGGTTTTCTCCAAATGAAAAGATCCTCATTGTTATTTTCCAA TTTTGGCTATACTCCTGTTCTGGGAAAGTTTGGTATTTAACACTCAAATATAAATCCAGCCATACGAATAAGAGAAATCATTCTGTCTCGTTGCCGGG TGGTGTACAGTCACTGTGGTGTGGAGCCATCCTTCTCATCCAGGAGAAAAGCCCGTGAAGAATGCTTCTGGACTTGGCCTCATTGTAATCTCTACGG GGATATTAATACTACTTCAGTACAATGTGTTATGACAGCTTTTGAATGACCTCTTTCACCATTGCCATATTGATCACTCAAGTGTGGCTACGTCCTTG CTTTGGTTCGGGCTGTGTCTCTGCATCATGGCATGTGAGCCAGTGCACGGCCCCCTTTTGGTTTCAGGTTTGGGGATCATAGCTCTAGCAGAACTACTTGGAT TAGTTTATATGAAGTTTGTGCTTCCAACCAGAGGACTATCCAACCTCTAGGAAAGCTGTAGAGGAACCCCTTAACGAATAGGTAATATTATATACTTA AAAAAACATTTTAAAGCTA (서열 번호: 5)
- [0114] **마우스 CD47 아미노산 이소형 3(XP_006521870.1)**
- [0115] MWPLAAALLLGSCCGSAQLLFSNVNSIEFTSCNETVVIPIVRNVEAQSTEEMFVKWLNKSYIF IYDGNKNSTTTDQNFSAKISVSDLINGIASLKMDK RDAMVGNYTEVELSREGKTVIELKNRTAFNDQGSACS YE E E K G G C K L V S W F S P N E K I L I V I F P I L A I L L F W G K F G I L T L K Y K S S H T N K R I I L L L V A G L V L T I V I V V G A I L L I P G E K P V K N A S G L G L I V I S T G I L I L L Q Y N V M T A F G M T S F T I A I L I T Q V L G Y L A L V G L C L C I M A C E P V H G P L L I S G L G I I A L A E L L G L V Y M K F V A S N Q R T I Q P P R K A V E E P L N E (서열 번호: 6)
- [0116] **마우스 CD47 mRNA 이소형 4(XM_006521808.1)**
- [0117] GCCTACACCGGGAGAGCAGGGAGGAGGAGTTGGACTGAGGTTGGGCGGCTCCGAGGTCCAGGGCGAGCTTGCCAGAGGGAGTAGAGAGCAGCGGGGCTGCG CAGGGACCGTGCCGTGAGTTCGGGTGAGCGTGTGTGCCATGCTCCCGTCTTTCAGGCCGGCCAGGACACGAAGCCGGAAGAGAGCTGGCTGGAGGGAC GGGGGCCGTGAGCAGAGAGTGCAACCCGCGCAGCCCCGGGGACAGGCTGATTCTTGGCGCTCTCCGCCGAGCCTGCCAGGGCTGGGTGTGAGGCTGGCGT CACGTCAACGAGCAGAGGCGCCAGGCGGGGCGAGTGC GCGTGC GCGGGGCGGAGCAGCGCGCGCGCGCACCCCCGGGCAGCCTGGGCGGCCGCTCCT GCCTGTCACTGTGCGGCGCTGTGGTCCGTTCCCTTGAAGGCAGCAGCGGAGGCGGGCTGCTCCAGACACCTGCGGCGGGACCCCCGGGCGCG CGGAGATGTGGCCCTTGGCGGGCGCTGTGTGGCTCCTGTGTGCGGTTCACTACTGTTTAGTAACGTCACTCCATAGAGTTCACTTCAT GCAATGAAACTGTGGTCAATCCCTGTCATCGTCCGTAATGTGGAGGCGAAAGCACCGAAGAAATGTTTGTGAAGTGAAGTTGAACAAATCGTATATTTTCA TCTATGATGAAATAAAAAATAGCACTACTACAGATCAAACTTTACCAGTGCAAAAATCTCAGTCTCAGACTTAATCAATGGCATTGCCTCTTTGAAAATGG ATAAGCGGATGCCATGGTGGGAAACTACACTTGCGAAGTGACAGAGTTATCCAGAGAAGGCAAAACAGTTATAGAGCTGAAAACCCGACGGCCTCAACA CTGACCAAGGATCAGCCTGTTCTTACGAGGAGGAGAAAGAGGTTGCAAATTAGTTTCGTGGTTTTCTCCAAATGAAAAGATCCTCATTGTTATTTTCCAA TTTTGGCTATACTCCTGTTCTGGGAAAGTTTGGTATTTAACACTCAAATATAAATCCAGCCATACGAATAAGAGAAATCATTCTGTCTCGTTGCCGGG TGGTGTACAGTCACTGTGGTGTGGAGCCATCCTTCTCATCCAGGAGAAAAGCCCGTGAAGAATGCTTCTGGACTTGGCCTCATTGTAATCTCTACGG GGATATTAATACTACTTCAGTACAATGTGTTATGACAGCTTTTGAATGACCTCTTTCACCATTGCCATATTGATCACTCAAGTGTGGCTACGTCCTTG CTTTGGTTCGGGCTGTGTCTCTGCATCATGGCATGTGAGCCAGTGCACGGCCCCCTTTTGGTTTCAGGTTTGGGGATCATAGCTCTAGCAGAACTACTTGGAT TAGTTTATATGAAGTTTGTGCTTCCAACCAGAGGACTATCCAACCTCTAGGAAAGCTGTAGAGGAACCCCTTAACGAATAGGTAATATTATATACTTA AAAAAACATTTTAAAGCTA (서열 번호: 5)

GCCTGTCACCTGCTGCGGCGTGTGGTCGGTCGTTCCCTGAAGGCAGCAGCGGAGGCGGCGGCTGCTCCAGACACCTGCGGCGGCGACCCCGGCGGG
 CGGAGATGTGGCCCTTGGCGGCGGCGTGTGTGGGCTCCTGCTGCTGCGGTTAGCTCAACTACTGTTAGTAACGTCACCTCCATAGAGTTCACTTCAT
 GCAATGAAACTGTGGTCATCCCTTGCATCGTCCGTAATGTGGAGGCGCAAAGCACCGAAGAAATGTTTGTGAAGTGAAGTTGAACAAATCGTATATTTCA
 TCTATGATGAAATAAAAATAGCACTACTACAGATCAAACTTTACCAGTGCAAAAATCTCAGTCTCAGACTTAATCAATGGCATTGCCTCTTTGAAAATGG
 ATAAGCGGATGCCATGGTGGGAAACTACACTTGCGAAGTGACAGAGTTATCCAGAGAAGGCAAAACAGTTATAGAGCTGAAAACCGCACGGTTTCGTGGT
 TTTCTCCAAATGAAAAGATCCTCATTGTTATTTCCCAATTTTGGCTATACTCCTGTCTGGGAAAGTTTGGTATTTAACACTCAAATATAAATCCAGCC
 ATACGAATAAGAGAATCATTCTGCTGCTGTTGCCGGGCTGGTCTCACAGTACGTTGGTGTGGAGCCATCTTCTCATCCAGGAGAAAAGCCCGTGA
 AGAATGCTTCTGACTTGGCCTCATTGTAATCTCTACGGGGATATTAATACTACTCAGTACAATGTTGTTATGACAGCTTTTGAATGACCTCTTCCACCA
 TTGCCATATTGATCACTCAAGTGTGGGCTACGCTCTGCTTTGGTCGGGCTGTGTCTGTCATCATGGCATGTGAGCCAGTGCACGGCCCCCTTTGATTT
 CAGGTTTGGGATCATAGCTTAGCAGAATACTTGGATTAGTTTATATGAAGTTTGTGCGTTCCAACCAGAGGACTATCCAACCTCTAGGAAAGCTGTAG
 AGGAACCCCTTAACGCATTTAAAGAGTCAAAGGAATGATGAATGACGAATAGGTAATATATATACTTAATAAAACATTTAAGCTA (서열 번호:
 7)

[0118] 마우스 CD47 아미노산 이소형 4(XP_006521871.1)

[0119] MWPLAALLLGSACCGSAQLLFSNVNSIEFTSCNETVIVPCIVRNVQAQSTEMFVKWLNKSYIFYDGNKNSITTDQNFSAKISVSDLINGIASLKMDK
 RDAMVGNVYCEVTELSREGKTVIELKNRTVSWFSPNEKILIVIFPILAILLFWGKFGILTLKYKSSHTNKRIILLVAGLVLTIVVVGAILLIPGKPKVN
 ASGLGLIVISTGILILLQYVNFMTAFGMSFTIAILITQVLGYVLALVGLCLIMACEPVHGPLLISGLGIIALAEGLLVYMKFVASNQRTIQPPRKAIVE
 PLNAFKESKGMNDE(서열 번호: 8)

[0120] 인간 CD47 mRNA 이소형 1(XM_005247909.1)

[0121] AGTGGGAGCGCGTGTGCGCGGCGGCGTGCAGCCTGGGCAGTGGGTCCTGCTGTGACGCGCGGCGGCGGTCGGTCTGCTGTAACGGCGGCGGCGGCTGCT
 GCTCCGGACACCTGCGGCGGCGGCGGCGACCCCGCGGCGGCGGAGATGTGGCCCTGGTAGCGGCGTGTGCTGGGCTCGGCGTGTGCGGATCAGCT
 CAGCTACTATTTAATAAAACAAATCTGTAGAAATCAGCTTTTGAATGACACTGTCGTCATTCCATGCTTTGTTACTAATATGGAGGCACAAAACACTACT
 GAAGTATACGTAAAGTGGAAATTTAAAGGAAGAGATATTTACACCTTTGATGGAGCTCTAAACAAGTCCACTGTCCCCACTGACTTTAGTAGTGAATAAAT
 GAAGTCTACAATTAATAAAGGAGATGCTCTTTGAAGATGGATAAGAGTGTGCTGTCTCACACACAGGAACTACACTTGTGAAGTAACAGAATTAACC
 AGAGAAGGTGAAACGATCATCGAGCTAAAATATCGTGTGTTTTCATGGTTTTCTCCAAATGAAAATATCTTATTGTTATTTTCCAAATTTTGTATACTC
 CTGTTCTGGGACAGTTTGGTATTAACACCTAAATATAGATCCGGTGGTATGGATGAGAAAACAATGCTTTACTTGTGTGACTAGTGTACTGCTGTC
 ATGTGATGTTGGAGCCATTCTTTTCTGCCAGGTGAATATTCATTAAGAATGCTACTGGCCTGGTTAATTGTGACTTCTACAGGGATATTAATATTA
 CTTCACTACTATGTTTATGACAGCGATTGGATTAACCTCCTTCGTCATGGCATATGGTTATTCAGGTGATAGCCTATATCCTCGCTGTGGTTGGACTG
 AGTCTCTGATTTGCGGCGTGTATACCAATGCATGGCCCTCTTCTGATTTAGGTTTGGAGTATCTTAGCTCTAGCACAATTACTGGACTAGTTTATATGAAA
 TTTGTGGAATAAACACGATAAGTTACTCCTCCATCTCAGTAATAAAAAATTAAGCTGTAATCAACCTTCTAGGTTTCTCTGTCTTAAATGGGTATTCAA
 AATGGGGATCTGTTGTATGTATGAAACACATACTCCTTAATTTACCTGTTGTTGAAACTGGAGAAATGATTGTCGGGCAACCGTTTATTTTTATGTT
 ATTTTTATTTGGTTGAGGATTTTTTATAAACAGTTTTACTTGTGTCATATTTTAAATTAATACTGCCATCACCTGCTGGGTCTTTGTTAGGTCATTT
 TCAGTACTAATAGGATAATCCAGGTAACCTTGAAGAGATGAGCAGTGAGTGACCGGAGTCTTTCTGCTTTAGCTTTGACAGTTCTAATTAAGATCA
 TTGAAGACCAGCTTCTCATAAATTTCTTTTTGAAAAAAGAAAGCATTGTACTAAGCTCCTCTGTAAGACAACATCTTAAATCTTAAAGGTGTTGTTA
 TCATGACTGGTGAGAGAAGAAAACATTTGTTTTTATAAATGGAGCATTATTTACAAAAAGCCATTGTTGAGAATTAGATCCACATCGTATAAATATCTA
 TTAACCATTCTAAATAAAGAGAATCCAGTGTGCTATGTCGAAGATCCTCTCTGGAGCTTTTTTGCATAGCAATTAAGGTGTGCTATTTGTCAGTAGCC
 ATTTTTTGCAGTGATTTGAAGACCAAGTTGTTTTACAGCTGTGTACCCTTAAAGGTTTTTTTTTATATGATTAAATCAATTTATCACTGTTTAAAG
 CTTTGAATATCTGCAATCTTTGCCAAGGACTTTTTTATTTAAAAAAAACATAACTTTGTAATATTACCCTGTAATATTATATATACTTAATAAAACATT
 TTAAGCTA(서열 번호: 9)

[0122] 인간 CD47 아미노산 이소형 1(XP_005247966.1)

[0123] MWPLVAALLLGSACCGSAQLLFNKTKSVEFTFCNDTVVIPCFTVNMEAQNTTEVYVWKWFKGRDIYTFDGLNKSIVPTDFSSAKIEVSQLLKGDASLKMDK
 SDAVSHGTNYTCEVTELTREGETIELKYRVVSWFSPNENILIVIFPIFAILLFWQFGIKTLKYRSGMDEKTIALLVAGLVIIVIVGAILFVPGEYSL
 KNATLGLLIVTSTGILILLHYVVFSTAIGLTSFVIAILVIQVIAYILAVVGLSLCIAACIPMHGPELLISGLSILALAQLLGLVYMKFVE

[0124] (서열 번호 10)

[0125] 인간 CD47 mRNA 이소형 2(NM_198793.2)

[0126] GGGGAGCAGGCGGGGAGCGGGCGGGAAGCAGTGGGAGCGCGTGTGCGCGGCGGCGTGCAGCCTGGGAGTGGTCTGCTGCTGTGACGCGCGGCGGCGGCTG
 GTCCTGCTGTAACGGCGGCGGCGGCTGCTGCTCCAGACACCTGCGGCGGCGGCGGCGACCCCGGCGGCGGCGGAGATGTGGCCCTGGTAGCGGCGCTG
 TTGCTGGGCTCGGCGTGTGCGGATCAGCTACTATTTAATAAAACAAATCTGTAGAAATCAGCTTTTGAATGACACTGTCGTCATTCCATGCTTT

GTTACTAATATGGAGGCACAAAACACTACTGAAGTATACGTAAGTGGAAATTTAAAGGAAGAGATATTTACACCTTTGATGGAGCTCTAAACAAGTCCACT
GTCCCACTGACTTTAGTAGTGCAAAAATTTGAAGTCTACAATTAATAAAGGAGATGCCTCTTTGAAGATGGATAAGAGTGTGTCTCACACACAGGA
AACTACACTTGTGAAGTAACAGAATTAACCAGAGAAGGTGAAACGATCATCGAGCTAAAATATCGTGTGTTTCATGGTTTTCTCAAATGAAAATATTCTT
ATTGTTATTTTCCCAATTTTGTCTATACTCCTGTTCTGGGGACAGTTTGGTATTAACAACCTTAAATATAGATCCGGTGGTATGGATGAGAAAAACAATTGCT
TFACTTGTGCTGGACTAGTGATCACTGTCAATTGTCTATTGTTGGAGCCATTCTTTTCGTCGCCAGGTGAATATTCATTAAGAATGCTACTGGCCTTGGTTTA
ATGTGACTTCTACAGGGATATTAATATTACTTCACTACTATGTGTTTAGTACAGCGATTGGATTAACCTCCTTCGTCATTGCCATATTGGTTATTACAGGTG
ATAGCCTATATCCTCGCTGTGGTTGGACTGAGTCTCTGTATTGCGGCGTGTATACCAATGCATGGCCCTCTCTGATTTCAGGTTTGAGTATCTTAGCTCTA
GCACAATTACTTGGACTAGTTTATATGAAATTTGTGGCTTCCAATCAGAAGACTATACAACCTCCTAGGAATAACTGAATTTAAAATATTAATTATGAATTT
TTGAGTATAATACCAATAAGCTTTAATTAGAGCAGAGTTTTAATTAAGTTTTAAATCAGTC

[0127] (서열 번호 11)

[0128] 인간 CD47 아미노산 이소형 2(NP_942088.1)

[0129] MWPLVAALLLGSACCGSAQLLFNKTKSVEFTFCNDTVVIPCFTVNM EAQNTTEVYVKWFKGRDIYTFD GALNKSTVPTDFSSAKIEVSQLLKGDASLKMDK
SDAVSHTGNYTCEVELTREGETI IELKYRVVSWFSPNENILIVIFPIFAILLFWGQFGIKTLKYRSGMDEKTIALLVAGLVITVIVIVGAILFVPEYSL
KNATLGLLIVTSTGILILLHYVVFSTAIGLTSFVIAILVIQVIAYILAVVGLSLCIAACIPMHGPLLISGLSILALAQLLGLVYMKFVASNQKTIQPPRNN
(서열 번호: 12)

[0130] 인간 CD47 mRNA 이소형 3(XM_005247908.1)

[0131] AGTGGGAGCGCGCTGCGCGCGGCCGTGCAGCCTGGCAGTGGGTCCTGCCTGTGACGCGCGCGCGCGGTGCGGTCTGCCTGTAACGCGCGCGCGGTGCT
GCTCCGGACACCTGCGCGCGCGCGCGACCCCGCGCGCGCGGAGATGTGGCCCTGGTAGCGCGCTGTTGCTGGGCTCGCGCTGCTGCGGATCAGCT
CAGCTACTATTTAATAAAAACAAATCTGTAGAATTCACGTTTTGTAATGACACTGTCGTCATTCCATGCTTTGTTACTAATATGGAGGCACAAAACACTACT
GAAGTATACGTAAAGTGGAAATTTAAAGGAAGAGATATTTACACCTTTGATGGAGCTCTAAACAAGTCCACTGTCGCCACTGACTTTAGTAGTGCAAAAAT
GAAGTCTACAATTAATAAAGGAGATGCCTCTTTGAAGATGGATAAGAGTGTGTCTCACACACAGGAACTACACTTGTGAAGTAACAGAATTAACC
AGAGAAGGTGAAACGATCATCGAGCTAAAATATCGTGTGTTTCATGGTTTTCTCAAATGAAAATATTCTTATTGTTATTTTCCCAATTTTGTCTATACTC
CTGTTCTGGGACAGTTTGGTATTAACAACCTTAAATATAGATCCGGTGGTATGGATGAGAAAACAATTGCTTTACTTGTGCTGGACTAGTGATCACTGTC
ATTGTCATTGTTGGAGCCATTCTTTTCGTCGCCAGGTGAATATTCATTAAGAATGCTACTGGCCTTGGTTAATTGTGACTTCTACAGGGATATTAATATTA
CTTCACTACTATGTGTTTAGTACAGCGATTGGATTAACCTCCTTCGTCATTGCCATATTGGTTATTCAGGTGATAGCCTATATCCTCGCTGTGGTTGGACTG
AGTCTCTGTATTGCGGCGTGTATACCAATGCATGGCCCTCTCTGATTTTCAGGTTTGAGTATCTTAGCTTAGCACAATTACTTGGACTAGTTTATATGAAA
TTTGTGGCTTCCAATCAGAAGACTATAACAACCTCCTAGGAAAGCTGTAGAGGAACCCCTTAATGAATAAACACAGATAAGTTTACTCCTCCATCTCAGTAATA
AAAATTAAGCTGTAATCAACCTTCTAGGTTTCTCTGTCTTAAATGGGTATTCAAAAATGGGATCTGTGGTGTATGTATGGAAACATACTCCTTAATT
TACCTGTTGTTGAAACTGGAGAAATGATTGTCGGCAACCGTTTTATTTTTATTGATTTTTATTGGTTGAGGGATTTTTTATAACAGTTTTACTTGTG
TCATATTTTTAAAATTAATAACTGCCATCACCTGCTGGGTCCTTTGTTAGGTCATTTTCAGTGACTAATAGGGATAATCCAGGTAACCTTTGAAGAGATGAGC
AGTGAGTGACCAGGCAGTTTTCTGCTTTAGCTTTGACAGTCTTAATTAAGATCATTGAAGACCAGCTTTCTCATAAATTTCTCTTTTTGAAAAAAGAA
AGCATTTGACTAAGCTCCTCTGTAAGACAACATCTTAAATCTTAAAAGTGTGTTATCATGACTGGTGAGAGAAGAAACATTTTGTTTTTATTAAATGGA
GCATTTTACAAAAAGCCATTGTTGAGAATTAGATCCACATCGTATAAATATCTATTAACCATCTAAATAAAGAGAACCTCCAGTGTGCTATGTGCAAG
ATCCTCTCTGGAGCTTTTTTGCATAGCAATTAAGGTGTGCTATTGTGTCAGTAGCCATTTTTTGCAGTGATTGAAGACCAAGTGTTTTACAGCTGTG
TTACCGTTAAAGTTTTTTTTTATATGATTAATCAATTTATCACTGTTTAAAGCTTTGAATATCTGCAATCTTTGCCAAGGTACTTTTTTATTTAAAA
AAAAACATAACTTTGTAATATTACCCTGTAATATTATATATACTTAATAAAAACATTTTAAGCTA(서열 번호: 13)

[0132] 인간 CD47 아미노산 이소형 3(XP_005247965.1)

[0133] MWPLVAALLLGSACCGSAQLLFNKTKSVEFTFCNDTVVIPCFTVNM EAQNTTEVYVKWFKGRDIYTFD GALNKSTVPTDFSSAKIEVSQLLKGDASLKMDK
SDAVSHTGNYTCEVELTREGETI IELKYRVVSWFSPNENILIVIFPIFAILLFWGQFGIKTLKYRSGMDEKTIALLVAGLVITVIVIVGAILFVPEYSL
KNATLGLLIVTSTGILILLHYVVFSTAIGLTSFVIAILVIQVIAYILAVVGLSLCIAACIPMHGPLLISGLSILALAQLLGLVYMKFVASNQKTIQPPRKA
VEEPLNE(서열 번호: 14)

[0134] 인간 CD47 mRNA 이소형 4(NM_001777.3)

[0135] GGGAGCAGCGGGGAGCGGGCGGAAGCAGTGGGAGCGCGCTGCGCGCGCGCGTGCAGCCTGGCAGTGGGTCCTGCCTGTGACGCGCGCGCGCGGTGCG
GTCCTGCCTGTAACGGCGCGCGCGGTGCTGCTCCAGACACCTGCGCGCGCGCGCGACCCCGCGCGCGCGCGGAGATGTGGCCCTGGTAGCGCGCGCTG
TTGCTGGGCTCGCGGTGCTGCGGATCAGCTCAGCTACTATTTAATAAAAACAAATCTGTAGAATTCACGTTTTGTAATGACACTGTCGTCATTCCATGCTTT
GTTACTAATATGGAGGCACAAAACACTACTGAAGTATACGTAAGTGGAAATTTAAAGGAAGAGATATTTACACCTTTGATGGAGCTCTAAACAAGTCCACT
GTCCCACTGACTTTAGTAGTGCAAAAATTTGAAGTCTACAATTAATAAAGGAGATGCCTCTTTGAAGATGGATAAGAGTGTGTCTCACACACAGGA

AACTACACTTGTGAAGTAACAGAATTAACCAGAGAAGGTGAAACGATCATCGAGCTAAAATATCGTGTGTTTCATGGTTTTCTCCAAATGAAAATATTCTT
ATTGTTATTTTCCCAATTTTTGTCTATACTCCTGTTCTGGGGACAGTTTGGTATTA AAAACACTTAAATATAGATCCGGTGGTATGGATGAGAAAACAATTGCT
TTACTTGTGCTGGACTAGTGATCACTGTCATTGTCATTGTTGGAGCCATTCTTTTCGTCGCCAGGTGAATATTCATTAAGAATGCTACTGGCCTTGGTTTA
ATTGTGACTTCTACAGGGATTAATATTACTTCACTACTATGTGTTTAGTACACCGATTGGATTAACCTCCTTCGTCATTGCCATATTGGTTATTGAGTG
ATAGCCTATATCCTCGCTGTGGTTGGACTGAGTCTCTGTATTGCGGCGTGTATACCAATGCATGGCCCTTCTGATTTCAGGTTTGGATATCTTAGCTCTA
GCACAATTACTTGGACTAGTTTATATGAAATTTGTGGCTTCCAATCAGAAGACTATACAACCTCCTAGGAAAGCTGTAGAGGAACCCCTTAATGCATTCAA
GAATCAAAAGGAATGATGAATGATGAATAACTGAATTTAAAATATTAATTATGAATTTTTGAGTATAATACCAATAAGCTTTTAATTAGAGCAGAGTTTT
 AATTAAGTTTTAAATCAGTC(서열 번호: 15)

[0136] 인간 CD47 아미노산 이소형 4(NP_001768.1)

[0137] MWPLVAALLLGSACCGSAQLLFNKTKSVEFTFCNDTVVIPCFTVNMEAQNTTEVYVKWFKGRDIYTFD GALNKSTVPTDFSSAKIEVSQLLKGDASLKMDK
SDAVSHTGNYTCEVTELTREGETI IELKYRVVSWFSPNENILIVIFPIFAILLFWGQFGIKTLKYRSGGMDEKTIALLVAGLVITVIVIVGAILFVPGEYSL
KNATLGLIVTSTGILILLHYVVFSTAIGLTSFVIAILVIQVIAYILAVVGLSLCIAACIPMHGPLLISGLSILALAQLLGLVYMKFVASNQRTIQPPRKAV
EEPLNAFKESKGMNDE(서열 번호: 16)

[0138] 인간화 CD47 아미노산 이소형 1

[0139] MWPLAAALLLGSACCGSAQLLFNKTKSVEFTFCNDTVVIPCFTVNMEAQNTTEVYVKWFKGRDIYTFD GALNKSTVPTDFSSAKIEVSQLLKGDASLKMDK
SDAVSHTGNYTCEVTELTREGETI IELKYRVVSWFSPNENILIVIFPIFAILLFWGQFGIKTLKYRSGGMDEKTIALLVAGLVITVIVIVGAILFVPGEYSL
KNATLGLIVTSTGILILLHYVVFSTAIGLTSFVIAILVIQVIAYILAVVGLSLCIAACIPMHGPLLISGLSILALAQLLGLVYMKFVASNQRTIQPPRNR
 (서열 번호: 17)

[0140] 인간화 CD47 아미노산 이소형 2

[0141] MWPLAAALLLGSACCGSAQLLFNKTKSVEFTFCNDTVVIPCFTVNMEAQNTTEVYVKWFKGRDIYTFD GALNKSTVPTDFSSAKIEVSQLLKGDASLKMDK
SDAVSHTGNYTCEVTELTREGETI IELKYRVVSWFSPNENILIVIFPIFAILLFWGQFGIKTLKYRSGGMDEKTIALLVAGLVITVIVIVGAILFVPGEYSL
KNATLGLIVTSTGILILLHYVVFSTAIGLTSFVIAILVIQVIAYILAVVGLSLCIAACIPMHGPLLISGLSILALAQLLGLVYMKFVASNQRTIQPPRNR
 (서열 번호: 18)

[0142] 인간화 CD47 아미노산 이소형 3

[0143] MWPLAAALLLGSACCGSAQLLFNKTKSVEFTFCNDTVVIPCFTVNMEAQNTTEVYVKWFKGRDIYTFD GALNKSTVPTDFSSAKIEVSQLLKGDASLKMDK
SDAVSHTGNYTCEVTELTREGETI IELKYRVVSWFSPNENILIVIFPIFAILLFWGQFGIKTLKYRSGGMDEKTIALLVAGLVITVIVIVGAILFVPGEYSL
KNATLGLIVTSTGILILLHYVVFSTAIGLTSFVIAILVIQVIAYILAVVGLSLCIAACIPMHGPLLISGLSILALAQLLGLVYMKFVASNQRTIQPPRKAV
EEPLNE(서열 번호: 19)

[0144] 인간화 CD47 아미노산 이소형 4

[0145] MWPLAAALLLGSACCGSAQLLFNKTKSVEFTFCNDTVVIPCFTVNMEAQNTTEVYVKWFKGRDIYTFD GALNKSTVPTDFSSAKIEVSQLLKGDASLKMDK
SDAVSHTGNYTCEVTELTREGETI IELKYRVVSWFSPNENILIVIFPIFAILLFWGQFGIKTLKYRSGGMDEKTIALLVAGLVITVIVIVGAILFVPGEYSL
KNATLGLIVTSTGILILLHYVVFSTAIGLTSFVIAILVIQVIAYILAVVGLSLCIAACIPMHGPLLISGLSILALAQLLGLVYMKFVASNQRTIQPPRKAV
EEPLNAFKESKGMNDE(서열 번호: 20)

[0146] 인간화 CD47비인간 동물

[0147] CD47 단백질을 암호화하는 비인간 동물의 내인성 유전자좌위의 유전자 변형으로 생긴 비인간 동물의 세포 표면에 인간화 CD47 단백질을 발현하는 비인간 동물이 제공된다. 본원에 기술된 적합한 예는 설치류, 특히, 마우스를 포함한다.

[0148] 인간화 CD47 유전자는, 일부 구현예에서, 이종 종(예를 들어, 인간)으로부터의 유전 물질을 포함하며, 인간화 CD47 유전자는 이종 종으로부터의 유전 물질의 암호화된 부분을 포함하는 CD47 단백질을 암호화한다. 일부 구현예에서, 본 발명의 인간화 CD47 유전자는 세포의 원형질막 상에 발현된 CD47 단백질의 세포외 부분을 암호화하는 이종 종의 게놈 DNA를 포함한다. 일부 구현예에서, 본 발명의 인간화 CD47 유전자는 세포의 원형질막 상에 발현된 CD47 단백질의 세포외 부분과 막관통 부분을 암호화하는 이종 종의 게놈 DNA를 포함한다. 상기 인간화 CD47 유전자를 함유하는 비인간 동물, 비인간 배아, 및 세포를 제조하기 위한 비인간 동물, 배아, 세포 및 표적화 작제물도 제공된다.

[0149] 일부 구현예에서, 내인성 CD47 유전자가 결실된다. 일부 구현예에서, 내인성 CD47 유전자가 변경되고, 내인성

CD47 유전자의 일부는 이중 서열(예를 들어, 전체적 또는 부분적으로 인간 CD47 서열)로 대체된다. 일부 구현예에서, 내인성 CD47 유전자 전부 또는 실질적으로 전부는 이중 유전자(예를 들어, 인간 CD47 유전자)로 대체된다. 일부 구현예에서, 이중 CD47 유전자의 일부는 내인성 CD47 유전좌위에서 내인성 비인간 CD47 유전자에 삽입된다. 일부 구현예에서, 이중 유전자는 인간 유전자이다. 일부 구현예에서, 내인성 CD47 유전자의 두 개의 카피 중 하나에 대해 변형 또는 인간화를 수행하여, 인간화 CD47 유전자에 대해 이형접합성인 비인간 동물을 생성한다. 다른 구현예에서, 인간화 CD47 유전자에 대하여 동형접합성인 비인간 동물이 제공된다.

- [0150] 본 발명의 비인간 동물은 내인성 비인간 CD47 유전좌위에서 전체적 또는 부분적으로 인간 CD47 유전자를 함유한다. 따라서, 이러한 비인간 동물은 이중 CD47 유전자를 갖는 것으로 설명될 수 있다. 내인성 CD47 유전좌위에서 대체, 삽입, 변형 또는 변경된 CD47 유전자는, 예를 들어, PCR, 웨스턴 블랏, 서던 블랏, 제한 단편 길이 다형성(RFLP), 또는 대립유전자의 획득 또는 소실 검정을 포함하는 다양한 방법을 사용하여 검출될 수 있다. 일부 구현예에서, 비인간 동물은 인간화 CD47 유전자에 대하여 이형접합성이다. 다른 구현예에서, 비인간 동물은 인간화 CD47 유전자에 대하여 동형접합성이다.
- [0151] 다양한 구현예에서, 본 발명에 따른 인간화 CD47 유전자는 표 3의 인간 CD47 유전자에 나타나는 제2, 제3, 제4, 제5, 제6 및 제7 엑손과 적어도 50%(예를 들어, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상) 동일한 서열을 갖는 제2, 제3, 제4, 제5, 제6 및 제7 엑손을 가지는 CD47 유전자를 포함한다.
- [0152] 다양한 구현예에서, 본 발명에 따른 인간화 CD47은 표 3의 마우스 CD47 유전자에 나타나는 각각의 엑손과 적어도 50%(예를 들어, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상) 동일한 서열을 갖는 제1 엑손 및 엑손 7의 하류 엑손(예를 들어, 이소형 2의 제8 및 제9 엑손)을 가지는 CD47 유전자를 포함한다.
- [0153] 다양한 구현예에서, 본 발명에 따른 인간화 CD47 유전자는 표 3의 마우스 CD47 유전자에 나타나는 5' 미번역 영역 및 3' 미번역 영역과 적어도 50%(예를 들어, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상) 동일한 서열을 갖는 5' 미번역 영역 및 3' 미번역 영역을 가지는 CD47 유전자를 포함한다.
- [0154] 다양한 구현예에서, 본 발명에 따른 인간화 CD47 유전자는 표 3의 인간 CD47 뉴클레오티드 코딩 서열에 나타나는 뉴클레오티드 코딩 서열과 적어도 50%(예를 들어, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상) 동일한 뉴클레오티드 코딩 서열을 가지는 CD47 유전자를 포함한다.
- [0155] 다양한 구현예에서, 본 발명의 비인간 동물에 의해 생산된 인간화 CD47 단백질은 표 3에 나타나는 인간 CD47 단백질의 세포외 부분과 적어도 50%(예를 들어, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상) 동일한 아미노산 서열을 갖는 세포외 부분을 가진다.
- [0156] 다양한 구현예에서, 본 발명의 비인간 동물에 의해 생산된 인간화 CD47 단백질은 표 3의 인간 CD47 단백질에 나타나는 아미노산 잔기 19~141과 동일한 아미노산 서열을 갖는 세포외 부분을 가진다.
- [0157] 다양한 구현예에서, 본 발명의 비인간 동물에 의해 생산된 인간화 CD47 단백질은 표 3에 나타나는 인간 CD47 단백질의 N-말단 면역글로불린 V 도메인과 적어도 50%(예를 들어, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상) 동일한 아미노산 서열을 갖는 N-말단 면역글로불린 V 도메인을 가진다.
- [0158] 다양한 구현예에서, 본 발명의 비인간 동물에 의해 생산된 인간화 CD47 단백질은 표 3의 인간 CD47 단백질에 나타나는 아미노산 잔기 19~127과 동일한 아미노산 서열을 갖는 N-말단 면역글로불린 V 도메인을 가진다.
- [0159] 다양한 구현예에서, 본 발명의 비인간 동물에 의해 생산된 인간화 CD47 단백질은 표 3에 나타나는 인간 CD47 단백질의 N-말단 면역글로불린 V 도메인 및 5개의 막관통 도메인과 적어도 50%(예를 들어, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상) 동일한 서열을 갖는 N-말단 면역글로불린 V 도메인 및 5개의 막관통 도메인을 가진다.
- [0160] 다양한 구현예에서, 본 발명의 비인간 동물에 의해 생산된 인간화 CD47 단백질은 표 3에 나타나는 마우스 CD47 단백질의 세포질내 꼬리와 적어도 50%(예를 들어, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상) 동일한 서열을 갖는 세포질내 꼬리를 가진다.

- [0161] 다양한 구현예에서, 본 발명의 비인간 동물에 의해 생산된 인간화 CD47 단백질은 표 3의 인간 CD47 단백질에 나타나는 아미노산 잔기 16~292와 적어도 50%(예를 들어, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상) 동일한 아미노산 서열을 가진다.
- [0162] 다양한 구현예에서, 본 발명의 비인간 동물에 의해 생산된 인간화 CD47 단백질은 표 3의 인간 CD47 단백질에 나타나는 아미노산 잔기 19~292와 적어도 50%(예를 들어, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상) 동일한 아미노산 서열을 가진다.
- [0163] 다양한 구현예에서, 본 발명의 비인간 동물에 의해 생산된 인간화 CD47 단백질은 표 3의 인간 CD47 단백질에 나타나는 아미노산 잔기 19~292와 동일한 아미노산 서열을 가진다.
- [0164] 다양한 구현예에서, 본 발명의 비인간 동물에 의해 생산된 인간화 CD47 단백질은 표 3에 나타나는 인간화 CD47 단백질의 아미노산 서열과 적어도 50%(예를 들어, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상) 동일한 아미노산 서열을 가진다.
- [0165] 다양한 구현예에서, 본 발명의 비인간 동물에 의해 생산된 인간화 CD47 단백질은 표 3에 나타나는 인간화 CD47 단백질의 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 가진다.
- [0166] 인간 프로모터 및 인간 조절 서열로부터 이러한 단백질을 발현하는 비인간 동물을 제조하기 위한 조성물 및 방법을 포함하여, 특이적 다형성 형태, 대립유전자 변이체(예를 들어, 단일 아미노산 차이) 또는 택일적으로 스플라이싱된 이소형을 포함하는, 인간화 CD47 단백질을 발현하는 비인간 동물을 제조하기 위한 조성물 및 방법이 제공된다. 일부 구현예에서, 내인성 프로모터 및 내인성 조절 서열로부터 이러한 단백질을 발현하는 비인간 동물을 제조하기 위한 조성물 및 방법이 또한 제공된다. 이러한 방법은 인간 CD47 단백질을 전체적 또는 부분적으로 암호화하는 유전 물질을 내인성 CD47 유전자에 상응하는 비인간 동물의 게놈 내 정확한 위치에 삽입하여 전체적 또는 부분적으로 인간인 CD47 단백질을 발현하는 인간화 CD47 유전자를 생성하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 이러한 방법은 인간 CD47 유전자의 엑손 2~7에 상응하는 게놈 DNA를 비인간 동물의 내인성 CD47 유전자에 삽입함으로써, 삽입된 엑손에 의해 암호화된 아미노산을 함유하는 인간 부분을 함유하는 CD47 단백질을 암호화하는 인간화 유전자를 생성하는 단계를 포함한다.
- [0167] 적절한 경우, 인간 CD47 단백질을 전체적 또는 부분적으로 암호화하는 유전 물질 또는 폴리뉴클레오티드 서열(들)의 코딩 영역은 비인간 동물에서의 발현에 최적화된 코돈을 포함하도록 변형될 수 있다(예를 들어, 미국 특허 번호 5,670,356 및 5,874,304 참조). 코돈 최적화 서열은 합성 서열이고, 바람직하게는 코돈 최적화되지 않은 모 폴리뉴클레오티드에 의해 암호화되는 동일한 폴리펩티드(또는 전장 폴리펩티드와 실질적으로 동일한 활성을 가지는 전장 폴리펩티드의 생물학적으로 활성인 단편)를 암호화한다. 일부 구현예에서, 인간 CD47 단백질을 전체적 또는 부분적으로 암호화하는 유전 물질의 코딩 영역은, 특정 세포 유형(예를 들어, 설치류 세포)을 위한 코돈 사용을 최적화하기 위해 변경된 서열을 포함할 수 있다. 예를 들어, 비인간 동물(예를 들어, 설치류)의 내인성 CD47 유전자에 삽입되는 인간 CD47 유전자의 엑손 2~7에 상응하는 게놈 DNA의 코돈은 비인간 동물의 세포에서의 발현에 최적화될 수 있다. 이러한 서열은 코돈 최적화 서열로 기술될 수 있다.
- [0168] 인간화 CD47 유전자 접근법은 내인성 유전자의 상대적으로 최소의 변형을 채용하고, 비인간 동물에서 자연적인 CD47 매개 신호 전달을 초래하는데, 다양한 구현예에서, CD47 서열의 게놈 서열이 단일 단편에서 변형되기 때문에, 이에 따라 필수 조절 서열을 포함함으로써 정상적인 기능성을 보유한다. 따라서, 이러한 구현예에서, CD47 유전자 변형은 다른 주위 유전자 또는 다른 내인성 CD47-상호작용 유전자(예를 들어, 트롬보스폰딘, SIRP, 인테그린 등)에 영향을 미치지 않는다. 또한, 다양한 구현예에서, 변형은 원형질막 상의 기능적 CD47 막관통 단백질의 조립에 영향을 미치지 않으며, 변형에 의해 영향을 받지 않은 단백질의 세포질 부분을 통한 순차적인 신호 전달 및 결합을 통해 정상적인 작동인자 기능을 유지한다.
- [0169] 내인성 컷과 동물 CD47 유전자 및 인간 CD47 유전자의 게놈 조직의 개략도(비례 아님)가 도 1에 제공된다. 인간 CD47 유전자의 엑손 2~7을 함유하는 게놈 단편을 사용하여 내인성 컷과 동물 CD47 유전자를 인간화하는 예시적인 방법이 도 2에 제공된다. 도시된 바와 같이, 인간 CD47 유전자의 엑손 2~7을 함유하는 게놈 DNA는 표적화 작제물에 의해 내인성 컷과 동물 CD47 유전자에 삽입된다. 이러한 게놈 DNA는 리간드 결합을 담당하는 인간 CD47 단백질의 세포외 부분 및 막관통 도메인(예를 들어, 아미노산 잔기 16~292)을 암호화하는 유전자의 부분을 포함한다.
- [0170] 내인성 CD47 유전좌위에서 인간화 CD47 유전자를 가지는 비인간 동물(예를 들어, 마우스)은 당해 분야에 알려진 임의의 방법에 의해 제조될 수 있다. 예를 들어, 선택가능한 마커 유전자로 인간 CD47 유전자를 전체적 또는 부

분적으로 도입하는 표적화 벡터가 제조될 수 있다. 도 2는 인간 CD47 유전자의 엑손 2~7의 삽입을 포함하는 마우스 게놈의 내인성 CD47 유전자위를 도시한다. 예시된 바와 같이, 표적화 작제물은 내인성 쥐과 동물 CD47 유전자의 엑손 2의 상류 서열(약 39 Kb)을 함유하는 5' 상동 암, 그 다음 인간 CD47 유전자의 엑손 2~7을 함유하는 게놈 DNA 단편(약 ~23.9 Kb), 약물 선택 카세트(예를 들어, *loxP* 서열이 양측에 위치한 네오마이신 내성 유전자; 약 5 Kb), 및 내인성 쥐과 동물 CD47 유전자의 엑손 7의 하류 서열을 함유하는 3' 상동 암(약 99 Kb)을 함유한다. 표적화 작제물은 자가 삭제 약물 선택 카세트(예를 들어, *loxP* 서열이 측면에 위치한 네오마이신 내성 유전자; 미국 특허 번호 8,697,851, 8,518,392 및 8,354,389(이들 모두는 본원에 참조로 포함) 참조)를 함유한다. 상동성 재조합시, 내인성 쥐과 동물 CD47 유전자의 엑손 2~7은 표적화 벡터에 함유된 서열(즉, 인간 CD47 유전자의 엑손 2~7)로 대체된다. 인간화 CD47 유전자가 생성되어, 인간 CD47 유전자의 엑손 2~7에 의해 암호화된 아미노산을 함유하는 인간화 CD47 단백질을 발현하는 세포 또는 비인간 동물을 만들어 낸다. 약물 선택 카세트는 발달 의존 방식으로 제거되는데, 즉, 상기 인간화 CD47 유전자를 함유하는 생식계열 세포를 갖는 마우스로부터 유래된 자손은 발달 중 분화된 세포로부터 선택가능한 마커를 제거할 것이다.

[0171] 본 발명의 비인간 동물은 전술한 바와 같이, 당해 분야에 알려진 방법을 이용하여 제조되어, 흔히 비인간 동물의 사용 목적에 따라 추가적인 인간 또는 인간화 유전자를 포함할 수 있다. 이러한 추가적 인간 또는 인간화 유전자의 유전 물질은 전술한 바와 같이 유전자 변형을 가진 세포(예를 들어, 배아 줄기 세포)의 게놈의 추가적 변형을 통해, 또는 원하는 대로 유전자 변형된 다른 균주를 이용한 당해 분야에 알려진 번식 기술을 통해 도입될 수 있다. 일부 구현예에서, 본 발명의 비인간 동물은 SIRP α (CD172a), IL-3, M-CSF, GM-CSF 및 TPO로부터 선택되는 하나 이상의 인간 또는 인간화 유전자를 더 포함하도록 제조된다. 일부 구현예에서, 본 발명의 비인간 동물은, 본원에 기술된 바와 같은, 표적화 벡터를 변형 균주로부터의 세포에 도입하여 제조될 수 있다. 하나의 예로서, 본원에 기술된 표적 벡터는, Rag2와 IL-2R γ 가 결핍되고 4개의 인간 사이토카인(Rag2^{-/-} IL2R γ c^{-/-}; M-CSF^{flū}; IL-3/GM-CSF^{flū}; hSIRP α^{tg}; TPO^{flū})을 포함하는 마우스에 도입될 수 있다. 일부 구현예에서, 본 발명의 비인간 동물은 인간 또는 인간화 신호 조절 단백질 알파(SIRP α) 유전자를 더 포함하도록 제조된다. 일부 구현예에서, 본 발명의 비인간 동물은 본원에 기술된 바와 같은 인간화 CD47 유전자, 및 이종 종(예를 들어 인간)으로부터의 유전 물질을 포함하며, 이 유전 물질은 SIRP α (CD172a), IL-3, M-CSF, GM-CSF 및 TPO로부터 선택되는 하나 이상의 이종 단백질을 전체적 또는 부분적으로 암호화한다. 일부 특정 구현예에서, 본 발명의 비인간 동물은 본원에 기술된 바와 같은 인간화 CD47 유전자 및 이종 종(예를 들어 인간)으로부터의 유전 물질을 포함하며, 이 유전 물질은 이종(예를 들어 인간) SIRP α (CD172a) 단백질을 전체적 또는 부분적으로 암호화한다. 일부 특정 구현예에서, 본 발명의 비인간 동물은 내인성 부분 및 인간 부분(예를 들어, 인간 SIRP α 유전자의 엑손 2~4)을 포함하는 SIRP α 유전자를 더 포함하고, 인간 부분은 인간 SIRP α 단백질의 세포외 도메인(예를 들어, 인간 SIRP α 단백질의 잔기 28~362에 상응하는 아미노산)을 암호화하고, 내인성 부분은 내인성 SIRP α 단백질의 세포내 도메인을 암호화하며; 일부 구현예에서, 인간 부분과 내인성 부분은 내인성 SIRP α 프로모터에 작동가능하게 연결된다.

[0172] 예를 들어, 본원에 기술된 바와 같이, 인간화 CD47 유전자를 포함하는 비인간 동물은 (예를 들어, 이종 교배 또는 다중 유전자 표적화 방식을 통해) 2010년 10월 4일 출원된 PCT/US2010/051339; 2013년 9월 6일 출원된 PCT/US2013/058448; 2013년 6월 14일 출원된 PCT/US2013/045788; 2014년 9월 23일 출원된 PCT/US2014/056910; 2014년 10월 15일 출원된 PCT/US2014/060568; 2014년 2월 14일 출원된 PCT/US2012/025040; 2012년 10월 29일 출원된 PCT/US2012/062379; 2014년 11월 10일 출원된 PCT/US2014/064806; 및 2014년 11월 10일 출원된 PCT/US2014/064810에 기재된 하나 이상의 변형을 더 포함할 수 있고; 이들 출원은 그 전체가 본원에 참조로 포함된다. 특정 구현예에서, 인간화 CD47 유전자(즉, 인간화 CD47 유전자가 인간 CD47 단백질로부터의 세포외 부분 및 설치류 CD47 단백질로부터의 세포내 부분을 갖는 CD47 폴리펩티드를 암호화하도록 내인성 설치류 CD47 유전자의 엑손 1 및 엑손 8 (및 임의의 하류 엑손)에 작동가능하게 연결된 인간 CD47 유전자의 엑손 2~7)를 포함하는 설치류는, 인간화 SIRP α 유전자(예를 들어, 인간화 SIRP α 유전자가 인간 SIRP α 단백질로부터의 세포외 부분(예를 들어, 잔기 28~362에 상응하는 아미노산) 및 설치류 SIRP α 단백질로부터의 세포내 부분을 갖는 SIRP α 폴리펩티드를 암호화하도록 내인성 설치류 SIRP α 유전자의 엑손 1 및 5~8에 작동가능하게 연결된 인간 SIRP α 유전자의 엑손 2~4)를 포함하는 설치류에 교배된다; 예를 들어, 본원에 참조로 포함된, 2014년 9월 23일 출원된 PCT/US2014/056910 참조.

[0173] 마우스(즉, 인간 부분 및 마우스 부분을 포함하는 CD47 단백질을 암호화하는 CD47 유전자를 가지는 마우스)에 인간화 CD47 유전자를 채용한 구현예가 본원에서 집중적으로 논의되지만, 인간화 CD47 유전자를 포함하는 다른 비인간 동물도 제공된다. 일부 구현예에서, 이러한 비인간 동물은 내인성 CD47 프로모터에 작동가능하게 연결된

인간화 CD47 유전자를 포함한다. 일부 구현예에서, 이러한 비인간 동물은 내인성 유전자좌위로부터 인간화 CD47 단백질을 발현하며, 인간화 CD47 단백질은 인간 CD47 단백질의 아미노산 잔기 16~292 (또는 19~141 또는 19~127)를 포함한다. 이러한 비인간 동물은, 예를 들어, 포유류, 예를 들어, 마우스, 랫트, 토끼, 돼지, 소(예를 들어, 젖소, 황소, 버팔로), 사슴, 양, 염소, 닭, 고양이, 개, 흰담비, 영장류(예를 들어, 마모셋, 붉은털 원숭이) 등을 포함하여, 본원에 개시된 CD47 단백질을 발현하도록 유전자 변형될 수 있는 임의의 동물을 포함한다. 예를 들어, 적합하게 유전자 변형가능한 ES 세포를 쉽게 구할 수 없는 비인간 동물의 경우, 유전자 변형을 포함하는 비인간 동물을 제조하기 위한 다른 방법이 채용된다. 이러한 방법은, 예를 들어, 비ES 세포 계능(예를 들어, 섬유아세포 또는 유도 다능성 세포)을 변형하는 단계 및 적합한 세포, 예를 들어, 핵이 없는 난모세포에 유전자 변형된 계능을 전달하기 위해 체세포 핵 전달(SCNT)을 채용하는 단계, 및 변형된 세포(예를 들어, 변형된 난모세포)를 배아를 형성하기에 적합한 조건 하에 비인간 동물에 잉태시키는 단계를 포함한다.

[0174] 비인간 동물 계능(예를 들어, 돼지, 젖소, 설치류, 닭 등의 계능)을 변형하기 위한 방법은, 예를 들어, 징크 핑거 뉴클레아제(ZFN) 또는 전사 활성화인자 유사 작동인자 뉴클레아제(TALEN)를 채용하여 계능이 인간화 CD47 유전자를 포함하도록 변형시키는 단계를 포함한다.

[0175] 일부 구현예에서, 본 발명의 비인간 동물은 포유동물이다. 일부 구현예에서, 본 발명의 비인간 동물은, 예를 들어, 뛰는쥐과(Dipodoidea) 또는 쥐상목(Muroidea) 상과의 작은 포유동물이다. 일부 구현예에서, 본 발명의 유전자 변형된 동물은 설치류이다. 일부 구현예에서, 본 발명의 설치류는 마우스, 랫트, 및 햄스터로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 본 발명의 설치류는 쥐상목 상과로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 본 발명의 유전자 변형된 동물은 칼로미스쿠스과(Calomyscidae)(예를 들어, 마우스 유사 햄스터), 비단털쥐과(Cricetidae)(예를 들어, 햄스터, 미국 랫트 및 마우스, 들쥐), 쥐과(Muridae)(트루 마우스 및 랫트, 게르빌루스쥐, 아프리카가시쥐, 크레스티드 랫트), 네소미스과(Nesomyidae)(클라이밍 마우스, 락 마우스(rock mice), 흰꼬리 랫트, 말라가시 랫트 및 마우스), 가시겨울잠쥐과(Platacanthomyidae)(예를 들어, 가시겨울잠쥐), 및 소경쥐과(Spalacidae)(예를 들어, 두더쥐, 대나무쥐, 및 동북)로부터 선택되는 과로부터 유래한다. 일부 특정 구현예에서, 본 발명의 유전자 변형된 설치류는 트루 마우스 또는 랫트(패밀리 쥐과), 게르빌루스쥐, 아프리카가시쥐, 크레스티드 랫트로부터 선택된다. 일부 특정 구현예에서, 본 발명의 유전자 변형된 마우스는 쥐과의 구성원으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 본 발명의 비인간 동물은 설치류이다. 일부 특정 구현예에서, 본 발명의 설치류는 마우스, 및 랫트로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 본 발명의 비인간 동물은 마우스이다.

[0176] 일부 구현예에서, 본 발명의 비인간 동물은 C57BL/A, C57BL/An, C57BL/GrFa, C57BL/KaLwN, C57BL/6, C57BL/6J, C57BL/6ByJ, C57BL/6NJ, C57BL/10, C57BL/10ScSn, C57BL/10Cr, 및 C57BL/01a로부터 선택되는 C57BL 균주의 마우스인 설치류이다. 일부 특정 구현예에서, 본 발명의 마우스는 129P1, 129P2, 129P3, 129X1, 129S1 (예를 들어, 129S1/SV, 129S1/SvIm), 129S2, 129S4, 129S5, 129S9/SvEvH, 129/SvJae, 129S6 (129/SvEvTac), 129S7, 129S8, 129T1, 129T2인 균주로 이루어진 균으로부터 선택되는 129 균주이다(예를 들어, Festing *et al.*, 1999, *Mammalian Genome* 10:836; Auerbach, W. *et al.*, 2000, *Biotechniques* 29(5):1024-1028, 1030, 1032 참조). 일부 특정 구현예에서, 본 발명의 유전자 변형된 마우스는 전술된 129 균주 및 전술된 C57BL/6 균주의 혼합이다. 일부 특정 구현예에서, 본 발명의 마우스는 전술된 129 균주의 혼합, 또는 전술된 BL/6 균주의 혼합이다. 일부 특정 구현예에서, 본원에 기술된 혼합의 129 균주는 129S6(129/SvEvTac) 균주이다. 일부 구현예에서, 본 발명의 마우스는 BALB 균주, 예를 들어, BALB/c 균주이다. 일부 구현예에서, 본 발명의 마우스는 BALB 균주 및 전술된 다른 균주의 혼합이다.

[0177] 일부 구현예에서, 본 발명의 비인간 동물은 랫트이다. 일부 특정 구현예에서, 본 발명의 랫트는 Wistar rat, LEA 균주, Sprague Dawley 균주, Fischer 균주, F344, F6, 및 Dark Agouti로부터 선택된다. 일부 특정 구현예에서, 본원에 기술된 랫트 균주는 Wistar, LEA, Sprague Dawley, Fischer, F344, F6, 및 Dark Agouti로 이루어진 균으로부터 선택되는 2가지 이상 균주의 혼합이다.

[0178] **인간화 CD47 유전자를 갖는 비인간 동물을 이용하는 방법**

[0179] CD47 돌연변이 및 유전자 이식 비인간 동물(예컨대, 미니 돼지) 및 세포는 보고되어 있다(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. 및 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). 이러한 동물은, 예를 들어 CD47 발현, 기능 및 조절의 분자적 측면을 결정하는 다양한 검정에 이용되어왔다. 상당한 종의 차이가 발견되었다. 실제, 비비만성 당뇨/중증 복합 면역결핍(NOD/SCID) 마우스는 인간 CD47과 상호작용할 수 있는 SIRP α 단백질을 발현하므로, 인간 면역계의 구성요소를 이용한 마우스 모델 개발에 광범위하게 이용되어왔다(예를 들어, Takenaka, K. *et al.* (2007) *Nat. Immunol.* 8(12):1313-1323 참조). 이러한 마우스에 존재하는 SIRP α 대립유전자는 다른 마우스 균주에 존재하는 대표적 SIRP α 대립유전자가 아니고, 일반적으로, 종들 사이에 CD47과 SIRP α 간의 교차 반응은 거의 없다. 또한, 마우스 세포 상의 CD47은 거의 완전한 이동성을 갖는 것으로 보고된 반면, 인간 세포 상의 CD47은 약 30~40%만을 보여준다(Bruce, L. *et al.* (2003) *Blood* 101:4180-4188; Mouro-Chanteloup, L. *et al.* (2000) *VoxSanguinis* 78:P030; Mouro-Chanteloup, L. *et al.* (2003) *Blood* 101:338-344). 따라서, NOD/SCID 마우스는 제한이 없는 것은 아니다. 예를 들어, 다계통의 인간 조혈 발달이 일부 유전적 배경에서 뒷받침될 수 있지만(예를 들어, BALB/c Rag2^{-/-} IL-2R γ c^{-/-}), 다른 세포 유형의 항상성은 비효율적이다(예를 들어, T 및 NK 세포; 예를 들어, Gimeno, R. *et al.* (2004) *Blood* 104:3886-3893; Traggiati, E. *et al.* (2004) *Science* 304:104-107; Legrand, N. *et al.* (2006) *Blood* 108:238-245 참조). 또한, CD47은 다른 세포 표면 단백질과 상호작용하고 양방향 신호전달을 제공하는 것으로도 알려져 있다. 따라서, 기존의 마우스는, 예를 들어 생착 및 식균작용과 같은 다양한 생물학적 과정에서 CD47 의존성 기능을 해명하기에는 비효율적인 생체내 시스템을 나타낸다. 또한, 기존 마우스는 CD47 표적 요법의 개발을 위한 차선의 생체내 시스템을 나타낸다.

[0180] 본 발명의 비인간 동물은 다양한 검정에 유용한 인간 CD47을 발현하는 생물학적 물질(예를 들어, 세포)의 개선된 생체내 시스템 및 근원을 제공한다. 다양한 구현예에서, 본 발명의 비인간 동물은 CD47의 표적화 및/또는 CD47-SIRP α 신호전달 치료제를 개발하는 데 사용된다. 다양한 구현예에서, 본 발명의 비인간 동물은 인간 CD47에 결합하는 후보 치료제(예를 들어, 항체)의 스크리닝 및 개발을 위해 사용된다. 다양한 구현예에서, 본 발명의 비인간 동물은 인간 SIRP α 와 인간 CD47의 상호작용을 차단하는 후보 치료제(예를 들어, 항체)의 스크리닝 및 개발을 위해 사용된다. 다양한 구현예에서, 본 발명의 비인간 동물은 본원에 기술한 비인간 동물의 세포 표면 상에서의 인간화 CD47의 길항제 및/또는 작용제의 결합 프로파일을 결정하는 데 사용된다. 일부 구현예에서, 본 발명의 비인간 동물은 인간 CD47에 결합하는 하나 이상의 후보 치료용 항체의 에피토프 또는 에피토프들을 결정하는 데 사용된다.

[0181] 다양한 구현예에서, 본 발명의 비인간 동물은 항-CD47 항체의 약동학적 프로파일을 결정하는 데 사용된다. 다양한 구현예에서, 본 발명의 하나 이상의 비인간 동물 및 하나 이상의 대조 또는 참조 비인간 동물은 각각 다양한 용량(예를 들어, 0.1 mg/kg, 0.2 mg/kg, 0.3mg/kg, 0.4 mg/kg, 0.5 mg/kg, 1 mg/kg, 2 mg/kg, 3 mg/kg, 4 mg/kg, 5 mg/mg, 7.5mg/kg, 10 mg/kg, 15 mg/kg, 20 mg/kg, 25 mg/kg, 30 mg/kg, 40 mg/kg, 또는 50 mg/kg 이상)의 하나 이상의 후보 치료용 항-CD47 항체에 노출된다. 후보 치료용 항체는 임의의 원하는 투여 경로를 통해(예를 들어, 피하, 정맥내, 근육내, 복강내) 투여될 수 있다. 혈액은 다양한 시점(예를 들어, 0시간, 6시간, 1일, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일, 7일, 8일, 9일, 10일, 11일, 또는 최대 30일 이상)에서 비인간 동물(인간화 및 대조군)로부터 단리된다. 총 IgG, 항치료 항체 반응, 응집 등을 포함하나 이에 제한되지 않는 다양한 검정이 본원에 기술된 비인간 동물로부터 수득한 샘플을 사용하여 투여된 후보 치료용 항체의 약동학적 프로파일을 결정하기 위해 수행될 수 있다.

[0182] 다양한 구현예에서, 본 발명의 비인간 동물은 세포 변화의 결과로서 유전자 발현에 미치는 효과 및 CD47 신호전달을 차단하거나 조절하는 치료 효과를 측정하기 위해 사용된다. 다양한 구현예에서, 본 발명의 비인간 동물 또는 이로부터 단리된 세포는 비인간 동물의 세포 표면에서 인간화 CD47 단백질(또는 CD47 단백질의 인간 부분)에 결합하는 후보 치료제에 노출되고, 이후 일정 시간 후, CD47 의존성 과정, 예를 들어, 부착, 혈관신생, 세포자멸, 염증, 이동, 식균작용, 종양(또는 종양 세포)의 증식 및 클리어런스에 미치는 효과를 분석한다.

[0183] 본 발명의 비인간 동물은 인간화 CD47 단백질을 발현하므로, 특히 길항제 또는 작용제가 인간 SIRP α 서열 또는 에피토프에 특이적인 경우, 예를 들어 CD47 길항제 또는 작용제의 결합 또는 기능을 검정하는 결합 및 기능적 검정에 사용하기 위한 인간화 CD47의 공급원으로서 역할을 하는 세포, 세포주, 및 세포 배양물이 생성될 수 있다. 다양한 구현예에서, 후보 치료용 항체에 결합된 CD47 에피토프는 본 발명의 비인간 동물로부터 단리된 세포를 사용하여 결정될 수 있다.

- [0184] 본 발명의 비인간 동물로부터의 세포는 단리되어 특별한 목적을 위해 사용될 수 있거나, 많은 세대 동안 배양물 내에 유지될 수 있다. 다양한 구현예에서, 본 발명의 비인간 동물로부터의 세포는 불멸화되고, 배양물 내에 무기한으로(예를 들어, 계대 배양으로) 유지된다.
- [0185] 다양한 구현예에서, 본 발명의 세포 및/또는 비인간 동물은 인간 CD47 신호전달을 조절하는 후보 치료제를 스크리닝하고 개발하기 위한 생존 및/또는 증식 검정(예를 들어, B 또는 T 세포를 이용)에 사용된다. CD47의 활성화 또는 소실은 세포 증식의 조절에 중요한 역할을 할 수 있고, CD47의 세포의 도메인의 특이적 에피토프의 활성화로 인해 CD47에 의한 세포자멸이 유도될 수 있으므로, 후보 CD47 조절제(예를 들어, 길항제 또는 작용제)는 본 발명의 비인간 동물의 세포 및/또는 본원에 기술된 비인간 동물을 사용하여 확인, 특성화 및 개발될 수 있다. 일부 구현예에서, 본 발명의 세포 및/또는 비인간 동물은 CD47의 존재 및 부재 하에 특이적 세포(들)(예를 들어, 암세포)의 증식 또는 세포자멸에 미치는 효과를 결정하기 위한 생존 또는 사멸 검정(들)에 사용된다.
- [0186] 다양한 구현예에서, 본 발명의 세포 및/또는 비인간 동물은 이식된 인간 세포에 대한 생리학적(예를 들어, 면역) 반응에서 CD47 매개 기능을 결정하기 위한 이종(예를 들어, 인간) 세포의 이종이식에 사용된다. 일부 구현예에서, 인간 CD47에 결합하거나 이의 하나 이상의 기능을 차단하는 후보 치료제는 본 발명의 비인간 동물에 을 특징으로 한다. 적합한 측정은 다양한 세포 검정, 증식 검정, 혈청 면역글로불린 분석(예를 들어, 항체 역가), 세포독성 검정, 및 리간드-수용체 상호작용의 특성화(예를 들어, 면역침전 검정)을 포함한다. 일부 구현예에서, 본 발명의 비인간 동물은 항원에 대한 면역 반응을 조절하는 CD47 매개 기능을 특성화하기 위해 사용된다. 일부 구현예에서, 항원은 신생물과 연관된다. 일부 구현예에서, 항원은 자가면역 질환 또는 병태와 연관된다. 일부 구현예에서, 항원은 치료가 필요한 한 명 이상의 인간 환자가 겪는 질환 또는 병태와 연관된 표적이다.
- [0187] 다양한 구현예에서, 본 발명의 비인간 동물은 새로운 림프구 및 그 면역 기능의 CD47 의존성 조절을 조절하는 화합물 또는 생물학적 제제의 치료 효능을 결정하기 위한 이식 또는 양자 전이 실험에 사용된다. 다양한 구현예에서, 본 발명의 비인간 동물에게 인간 B 세포를 이식한다.
- [0188] 다양한 구현예에서, 본 발명의 비인간 동물의 세포는 인간 CD47을 조절하는 후보 치료제를 스크리닝하고 개발하기 위한 세포 이동 또는 확산 검정에 사용된다. 이러한 과정은 상처 치유, 분화, 증식과 생존을 포함한 많은 세포 과정에 필요하다.
- [0189] 다양한 구현예에서, 본 발명의 비인간 동물의 세포는 식균작용의 CD47 의존성 조절을 조절하는 화합물 또는 생물학적 제제의 치료 가능성을 결정하기 위한 식균작용 검정에 사용된다.
- [0190] 다양한 구현예에서, 본 발명의 비인간 동물의 세포는 중앙 세포의 CD47 의존성 조절 및/또는 세포자멸을 조절하는 화합물 또는 생물학적 제제의 치료 가능성을 결정하기 위한 중앙 세포 성장(또는 증식) 검정에 사용된다.
- [0191] 다양한 구현예에서, 자가면역 질환 또는 병태는, 자가면역 질환 또는 병태의 하나 이상의 기능의 CD47 의존성 조절을 조절하는 화합물 또는 생물학적 제제의 치료 가능성을 결정하기 위한 생체내 시스템을 제공하기 위해 본 발명의 하나 이상의 비인간 동물에서 유도된다. 일부 구현예에서, 염증성 질환 또는 병태는 신생물과 연관된다.
- [0192] 다양한 구현예에서, 항-혈관신생 병태는, 항-혈관신생 조건의 하나 이상의 기능의 CD47 의존성 조절을 조절하는 화합물 또는 생물학적 제제의 치료 가능성을 결정하기 위한 생체내 시스템을 제공하기 위해 본 발명의 하나 이상의 비인간 동물에서 유도된다. 치료 효능을 결정하기 위해 평가될 수 있는 예시적 기능은 케모카인 발현, 일산화질소(NO) 자극 반응 및 혈류 회복을 포함한다.
- [0193] 본 발명의 비인간 동물은 약물 또는 백신의 분석을 위한 생체내 시스템을 제공한다. 다양한 구현예에서, 후보 약물 또는 백신이 본 발명의 하나 이상의 비인간 동물에게 전달된 다음, 약물 또는 백신에 대한 한 가지 이상의 면역 반응, 약물 또는 백신의 안전성 프로파일, 또는 질환 또는 병태에 대한 효과를 결정하기 위해 비인간 동물을 모니터링할 수 있다. 안전성 프로파일을 결정하기 위해 사용되는 예시적인 방법은 약물 또는 백신의 독성, 최적 용량 농도, 효능, 및 가능한 위험 인자의 측정을 포함한다. 이러한 약물 또는 백신은 이러한 비인간 동물에서 개선되고/되거나 개발될 수 있다.
- [0194] 본 발명의 비인간 동물은 인간 CD47을 표적으로 하는 약물의 약동학적 성질을 평가하기 위한 생체내 시스템을 제공한다. 다양한 구현예에서, 인간 CD47을 표적으로 하는 약물을 본 발명의 하나 이상의 비인간 동물에게 전달하거나 투여한 후 비인간 동물에 대한 약물의 효과를 결정하기 위해 비인간 동물(또는 이로부터 단리된 세포)에 대해 하나 이상의 검정을 수행하거나 이를 모니터링할 수 있다. 약동학적 성질은, 이에 제한되지는 않으나, 동

물이 어떻게 약물을 다양한 대사산물로 가공하는지(또는 독성 대사산물을 포함하는 하나 이상의 약물 대사산물의 존재 여부의 검출), 약물 반감기, 투여후 약물의 순환 수준(예를 들어, 약물의 혈청 농도), 항약물 반응(예를 들어, 항약물 항체), 약물 흡수 및 분포, 투여의 경로, 약물의 배출 및/또는 클리어런스의 경로를 포함한다. 일부 구현예에서, 약물(예를 들어, CD47 조절제)의 약동학 및 약력학적 성질이 본 발명의 비인간 동물의 사용을 통해 또는 본 발명의 비인간 동물에서 모니터링된다.

[0195] 본 발명의 비인간 동물은 CD47을 표적으로 하는 약물의 온 타겟 독성을 평가하기 위한 생체내 시스템을 제공한다. 다양한 구현예에서, CD47을 표적으로 하는 약물을 본 발명의 하나 이상의 비인간 동물에게 전달하거나 투여한 후 비인간 동물에 대한 약물의 온 타겟 독성 효과를 결정하기 위해 비인간 동물(또는 이로부터 단리된 세포)에 대해 하나 이상의 검정을 수행하거나 이를 모니터링할 수 있다. 통상적으로, 약물은 약물의 표적의 하나 이상의 기능을 조절하도록 의도된다. 하나의 예로서, CD47 조절제는 어떤 방식으로든 하나 이상의 세포의 표면에서의 CD47 분자와의 상호작용을 통해 CD47 매개 기능(예를 들어, CD47 유도 세포자멸)을 조절하도록 의도된다. 일부 구현예에서, 이러한 조절제는 조절제의 원하는 약리학적 작용(들)의 과장인 역효과를 가질 수 있다. 이러한 효과를 온 타겟 효과라고 한다. 예시적인 온 타겟 효과는 지나치게 높은 용량, 만성 활성화/불활성화, 및 부정확한 조직에서의 정확한 작용을 포함한다. 일부 구현예에서, 본 발명의 비인간 동물의 사용을 통해 또는 본 발명의 비인간 동물에서 확인된 CD47을 표적으로 하는 약물의 온 타겟 효과는 CD47의 이전에 알려지지 않은 기능(들)을 결정하기 위해 사용된다.

[0196] 본 발명의 비인간 동물은 CD47을 표적으로 하는 약물의 오프 타겟 독성을 평가하기 위한 생체내 시스템을 제공한다. 다양한 구현예에서, CD47을 표적으로 하는 약물을 본 발명의 하나 이상의 비인간 동물에게 전달하거나 투여한 후 비인간 동물에 대한 약물의 오프 타겟 독성 효과를 결정하기 위해 비인간 동물(또는 이로부터 단리된 세포)에 대해 하나 이상의 검정을 수행하거나 이를 모니터링할 수 있다. 오프 타겟 효과는 약물이 의도하지 않은 표적과 상호작용할 때 발생할 수 있다(예를 들어, 공통의 에피토프에 대한 교차반응성). 이러한 상호작용은 의도되거나 의도되지 않은 조직에서 발생할 수 있다. 하나의 실시예로서, 약물의 거울상 이미지 이성질체(거울상체)가 오프 타겟 독성 효과를 초래할 수 있다. 더욱이, 약물은 상이한 수용체 서브타입과 부적절하게 상호작용하고, 의도하지 않게 활성화시킬 수 있다. 예시적인 오프 타겟 효과는 부적절한 표적이 발견되는 조직에 구애받지 않고 부적절한 표적의 부적절한 활성화/저해를 포함한다. 일부 구현예에서, CD47을 표적으로 하는 약물의 오프 타겟 효과는 본 발명의 비인간 동물에 대한 약물의 투여의 효과를 하나 이상의 참조 비인간 동물과 비교하여 결정한다.

[0197] 일부 구현예에서, 검정의 수행은 약물이 투여된 비인간 동물의 표현형(예를 들어, 체중의 변화) 및/또는 유전자형에 미치는 효과를 결정하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 검정의 수행은 CD47 조절제(예를 들어, 길항제 또는 작용제)에 대한 로트 간(lot-to-lot) 가변성을 결정하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 검정의 수행은 본 발명의 비인간 동물 및 참조 비인간 동물에 투여된 CD47을 표적으로 하는 약물의 효과 간 차이를 결정하는 단계를 포함한다. 다양한 구현예에서, 참조 비인간 동물은 본원에 기술된 변형, 본원에 기술된 변형과는 상이한 변형(예를 들어, 파괴, 결실 또는 그렇지 않으면 비기능적 CD47 유전자를 가지는 변형)을 가지거나 변형을 가지지 않을 수 있다(즉, 야생형 비인간 동물).

[0198] CD47을 표적으로 하는 약물의 온 타겟 독성 및/또는 오프 타겟 독성의 약동학적 성질을 평가하기 위한 비인간 동물에서(또는 이로부터 단리된 세포에서 및/또는 이를 이용하여) 측정될 수 있는 예시적인 파라미터는, 이에 제한되지는 않으나, 응집, 자가포식, 세포 분열, 세포 사멸, 보체 매개 용혈, DNA 완결성, 약물 특이적 항체 역가, 약물 대사, 유전자 발현 어레이, 대사 활성, 미토콘드리아 활성, 산화적 스트레스, 식균작용, 단백질 생합성, 단백질 분해, 단백질 분비, 스트레스 반응, 표적 조직 약물 농도, 온 타겟 조직 약물 농도, 전사 활성 등을 포함한다. 다양한 구현예에서, 본 발명의 비인간 동물은 CD47 조절제의 약학적으로 유효한 용량을 결정하기 위해 사용된다.

[0199] 본 발명의 비인간 동물은 암에서 사용하기 위한 후보 치료제의 특성화 및 개발을 위한 개선된 생체내 시스템을 제공한다. 다양한 구현예에서, 본 발명의 비인간 동물에게 종양을 이식한 다음, 하나 이상의 후보 치료제가 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 후보 치료제는 다중 특이적 항체(예를 들어, 이중 특이적 항체) 또는 항체 각 테일을 포함할 수 있고; 일부 구현예에서, 후보 치료제는, 예를 들어, 순차적으로 또는 동시에 투여되는 단일 특이적 항체의 투여와 같은 병용 치료법을 포함한다. 종양은 비인간 동물 내 하나 이상의 위치에 확립되기에 충분한 시간을 허용할 수 있다. 종양 세포 증식, 성장 등은 후보 치료제(들)의 투여 전후에 측정될 수 있다. 후보 치료제의 세포독성은 또한 원하는 대로 비인간 동물에서도 측정될 수 있다.

- [0200] 본 발명의 비인간 동물은 양자 전이를 통해 인간 세포-대-세포 상호작용의 기작을 규명하는 개선된 생체내 시스템을 제공한다. 다양한 구현예에서, 고휘 종양 또는 다른 악성 종양의 박멸에 대한 효과를 결정하기 위해 본 발명의 비인간 동물에게 종양 이종이식편을 이식할 수 있고, 이어서 종양 침윤 림프구의 두 번째 이식이 양자 전이에 의해 비인간 동물에 이식될 수 있다. 이러한 실험은 비인간 동물의 내인성 CD47과의 경쟁없이 유일하게 존재하는 인간 CD47로 인하여 인간 세포로 수행될 수 있다. 대안적으로, 이러한 실험은 NOD/SCID 또는 BRG (BALB/c Rag2^{-/-} IL-2R γ c^{-/-}) 배경의 마우스 세포의 사용을 포함할 수 있다. 또한, 이종 이식에 사용하기 위한 치료제 및 의약품이 이러한 비인간 동물에서 개선 및/또는 개발될 수 있다.
- [0201] 본 발명의 비인간 동물은 생착을 통한 인간 조혈 줄기 세포의 유지 및 발달을 위한 개선된 생체내 시스템을 제공한다. 다양한 구현예에서, 본 발명의 비인간 동물은 비인간 동물 내 인간 줄기 세포의 개선된 발달 및 유지를 제공한다. 다양한 구현예에서, 분화된 인간 B 및 T 세포의 증가된 개체수가 비인간 동물의 혈액, 골수, 비장 및 흉선에서 관찰된다. 다양한 구현예에서, 최적의 T 및 NK 세포 항상성이 비인간 동물의 혈액, 골수, 비장 및 흉선의 세포에서 관찰된다. 다양한 구현예에서, 본 발명의 비인간 동물은 하나 이상의 참조 비인간 동물에 비해 적혈구(RBC)의 수준 또는 양의 증가를 보여준다.
- [0202] 본 발명의 비인간 동물은 인간 세포를 표적으로 하는 치료 약물의 효능을 평가하기 위해 채용될 수 있다. 다양한 구현예에서, 본 발명의 비인간 동물에게 인간 세포를 이식하고, 이러한 인간 세포를 표적으로 하는 약물 후보물질이 이러한 비인간 동물에 투여된다. 약물의 치료 효능이, 그런 다음, 약물의 투여 후 비인간 동물에서 인간 세포를 모니터링함으로써 결정된다. 비인간 동물에서 시험할 수 있는 약물은 인간 세포를 표적화(예를 들어, 이에 결합 및/또는 이에 작용) 함으로써 인간 질환 및 병태의 치료를 위한 의도된 치료 효과를 가지는 소분자 화합물, 즉, 분자량이 1500 kD, 1200 kD, 1000 kD, 또는 800 달톤 미만인 화합물, 고분자 화합물(예를 들어, 단백질, 예를 들어, 항체)을 포함한다.
- [0203] 일부 구현예에서, 약물은 항암제고 인간 세포는, 원발성 암의 세포 또는 원발성 암으로부터 확립된 세포주의 세포일 수 있는 암세포다. 이러한 구현예에서, 본 발명의 비인간 동물에게 인간 암세포를 이식하고, 항암제가 비인간 동물에 제공된다. 약물의 효능은 약물의 투여의 결과로서 비인간 동물에서 인간 암세포의 성장 또는 전이가 저해되는지를 평가함으로써 결정될 수 있다.
- [0204] 특정한 구현예에서, 항암제는, 인간 암세포의 항원에 결합하는 항체 분자이다. 특정한 구현예에서, 항암제는 인간 암세포의 항원 및 다른 인간 세포, 예를 들어, B 세포 및 T 세포와 같은 인간 면역계(또는 "인간 면역 세포") 세포의 항원에 결합하는 이종 특이적 항체이다.
- [0205] 일부 구현예에서, 본 발명의 비인간 동물은 인간 면역 세포 또는 인간 면역 세포로 분화하는 세포로 생착된다. 인간 면역 세포가 생착된 이러한 비인간 동물에게 인간 암세포를 이식하고, 인간 암세포의 항원 및 인간 면역 세포(예를 들어, T 세포)의 항원에 결합하는 이종 특이적 항체와 같이 항암제가 투여된다. 이종 특이적 항체의 치료 효능은 비인간 동물에서 인간 암 세포의 성장 또는 전이를 억제하는 능력에 기초하여 평가 될 수 있다. 특정 구현예에서, 본 발명의 비인간 동물은 인간 면역 세포(특히, T 세포, B 세포, NK 세포 포함)를 유발하는 인간 CD34⁺ 조혈 모세포로 생착된다. 비인간 동물에서 종양 성장을 억제하는 이종 특이 적 항체의 능력을 시험하기 위해, 인간 면역 세포가 생착된 이러한 비인간 동물에게 인간 B 세포 림프종 세포(예컨대, 라지 세포)가 이식되고 나서, 종양 항원(예를 들어, 정상 B 세포 및 CD20과 같은 특정 B 세포 악성 종양의 항원) 및 T 세포 수용체의 CD3 서브유닛에 결합하는 이종 특이적 항체가 투여된다.
- [0206] **실시예**
- [0207] 다음의 실시예는 당업자에게 본 발명의 방법 및 조성물을 어떻게 제조하고 사용하는지를 설명하기 위해 제공되며, 발명자가 그들의 발명으로 간주한 것의 범위를 제한하고자 하는 것이 아니다. 다르게 지시되지 않는 한, 온도는 섭씨로 나타내고, 압력은 상압 또는 거의 상압이다.
- [0208] **실시예 1. 내인성 분화 클러스터 47(CD47) 유전자의 인간화.**
- [0209] 본 실시예는 설치류(예를 들어, 마우스)와 같은 비인간 포유류에서 분화 클러스터 47(CD47)을 암호화하는 내인성 유전자를 인간화하는 예시적인 방법을 예시한다. 본 실시예에 기술된 방법은 임의의 인간 서열, 또는 원하는 인간 서열(또는 서열 단편)의 조합을 사용하여 비인간동물의 내인성 CD47 유전자를 인간화하기 위해 이용될 수 있다. 본 실시예에서는, 마우스의 내인성 CD47 유전자를 인간화하기 위해 박테리아 인공 염색체(BAC) 클론 RP11-69A17에 나타나는 인간 CD47 유전자를 이용한다.

- [0210] 내인성 CD47 유전자의 세포외 N-말단 IgV 도메인 및 5개의 막관통 도메인을 암호화하는 유전 물질의 인간화를 위한 표적화 벡터를 VELOCIGENE® 기술을 사용하여 제작하였다(예를 들어, 본원에 참조로 포함된, 미국 특허 번호 6,586,251 및 Valenzuela *et al.* (2003) High-throughput engineering of the mouse genome coupled with high-resolution expression analysis, *Nature Biotech.* 21(6):652-659 참조).
- [0211] 간략하게, 마우스 박테리아 인공 염색체(BAC) 클론 RP23-230L20(Invitrogen)을 변형하여 내인성 CD47 유전자의 엑손 2~7을 함유하는 서열을 제거하고, 인간 CD47 폴리펩티드의 아미노산 16~292를 암호화하는 인간 BAC 클론 RP11-69A17(Invitrogen)을 이용하여 인간 CD47 유전자의 엑손 2~7을 삽입하였다. 이소형 2의 엑손 1, 8 및 9 뿐만 아니라 5' 및 3' 미변역 영역(UTR)에 상응하는 게놈 DNA를 함유하는 내인성 DNA가 유지되었다. BAC 클론 RP11-69A17에 함유된 인간 CD47 서열의 서열 분석은 모든 CD47 엑손 및 슬라이싱 신호를 확인하였다. 서열 분석을 통해 서열이 참조 게놈 및 CD47 전사체 NM_001777.3 및 NM_198793.2와 일치하는 것으로 밝혀졌다. 내인성 CD47 유전자의 엑손 2~7에 상응하는 게놈 DNA(약 30.8 kb)를 BAC 클론 RP23-230L20에서 박테리아 세포 내 상동성 재조합에 의해 대체하여, BAC 클론 RP11-69A17로부터의 인간 CD47 유전자의 엑손 2~7에 해당하는 약 23.9 kb의 게놈 인간 DNA를 함유하는 DNA 단편 및 재조합효소 인지 부위가 측면에 있는 자가 삭제 네오마이신 카세트에 해당하는 약 4995 bp을 삽입하였다(*loxP*-hUb1-em7-Neo-pA-mPrm1-Crei-*loxP*; 본원에 참조로 포함된 미국 특허 번호 8,697,851, 8,518,392 및 8,354,389 참조). 자가 삭제 네오마이신 카세트를 인간 CD47 유전자의 엑손 2~7을 함유한 약 23.9 kb 인간 DNA 단편의 말단에 첨가하였다(도 2). 표적화 벡터는, 5'으로부터 3'으로, BAC 클론 RP23-230L20으로부터의 약 39 kb의 마우스 게놈 DNA를 함유하는 5' 상동 암, BAC 클론 RP11-69A17로부터의 약 29.3 kb의 인간 게놈 DNA(인간 CD 유전자의 엑손 2~7 함유), *loxP* 부위가 측면에 있는 자가 삭제 네오마이신 카세트, 및 BAC 클론 RP23-93N20으로부터의 약 98.8 kb의 마우스 게놈 DNA를 함유하였다. 상기 표적화 벡터로 박테리아 세포에서 상동성 재조합한 후, 마우스 5' UTR, 마우스 엑손 1, 인간 엑손 2~7, 마우스 엑손 8~9 및 마우스 3' UTR을 함유한 인간화 CD47 유전자를 만드는 변형된 RP23-230L20 BAC 클론을 생성하였다. 인간화 CD47의 4 가지 예상된 택일적 스플라이싱된 이소형의 단백질 서열은, 마우스 및 인간 DNA에 의해 암호화된 생성 마우스 아미노산 및 인간 아미노산을 나타낸 표 3에 제공된다.
- [0212] 상기 변형된 BAC 클론을 사용해 F1H4 (50% 129/S6/SvEv/Tac, 50% C57BL/6NTac; Auerbach, W. *et al.* (2000) *Biotechniques* 29(5):1024-8, 1030, 1032) 마우스 배아 줄기(ES) 세포를 전기천공하여, 엑손 2~7로부터 인간화된 내인성 CD47 유전자를 포함하는 변형된 ES 세포를 생성하였다. 인간화 CD47 유전자를 함유하는 양성으로 표적화된 ES 세포를 인간 CD47 서열(예를 들어, 엑손 2~7)의 존재를 검출하는 검정(앞서 언급한 Valenzuela *et al.*)으로 확인하였고 마우스 CD47 서열(예를 들어, 엑손 1, 8 및 9 및/또는 엑손 2~7)의 소실 및/또는 보유를 확인하였다. 표 4는 전술된 내인성 CD47 유전자의 인간화를 확인하기 위해 사용한 프라이머 및 프로브를 나타낸다(도 3). 상류 삽입점을 지나는 뉴클레오티드 서열은 다음을 포함하였는데, 삽입점에 존재하는 인간 CD47 서열에 인접하여 연결된 삽입점의 상류 내인성 마우스 서열(이탤릭체로 표시된 AsiSI 제한 부위와 함께 아래 괄호 안에 포함됨)을 나타낸다: (GCAGACATGA TTA~~CTTC~~GAGA GCTTTC~~AAAG~~ CTAGATACTG TACCTTGCAT ATTC~~CAACAC~~) *GCGATCGC* ATTTTAAAGAT TTTC~~CATCCT~~ AGTGGAAAGA TATGATTGTA TTCATCCTAT TTA~~CTTTGTA~~ TATTAAAGTA CAGTAGAACC TGCCACTTTT (서열 번호: 33). 자가 삭제 네오마이신 카세트의 5' 말단의 하류 삽입점을 지나는 뉴클레오티드 서열은 다음을 포함하였는데, 삽입점의 하류 카세트 서열(이탤릭체로 표시된 *loxP* 서열과 함께 아래 괄호 안에 포함됨)에 인접한 인간 CD47 게놈 서열을 나타낸다: GGATCCATTT TAAGTAATAG AATAGGATTT TTAATTGTTC CAGTGT~~TTCT~~ GTGATAGAGC TGTCC~~TGCAC~~ AGACCTGTTT (CTCGAGATAA *CTTCGTATAA TGTATGCTAT ACGAAGTTAT* ATGCATGGCC TCCGCGCCGG GTTTTGGCGC CTCCC~~GCGGG~~) (서열 번호: 34). 네오마이신 카세트의 3' 말단의 하류 삽입점을 지나는 뉴클레오티드 서열은 다음을 포함하였는데, 내인성 CD47 유전자의 엑손 7의 마우스 게놈 서열 3'(이탤릭체로 표시된 *loxP* 서열과 함께 아래 괄호 안에 포함됨)에 인접한 카세트 서열을 나타낸다: CATGTCTGGA *ATAACTTCGT ATAATGTATG CTATACGAAG* TTATGCTAGT AACTATAACG GTCCTAAGGT AGCGACTAGC (ATTAGTATGG AAGTCCGTC CACTGTCCAG GTTCCTCTG CGGAGCTCTT TGTCTCTCTG GACTCTGTAT ACACTGCTTG) (서열 번호: 35). 네오마이신 카세트의 제거 후(76 bp 잔존) 하류 삽입점을 지나는 뉴클레오티드 서열은 다음을 포함하였는데, 남은 카세트 서열 *loxP* 서열(이탤릭체로 표시된 *loxP* 서열과 함께 아래의 괄호 안에 포함됨)과 병치된 인간 및 마우스 게놈 서열을 나타낸다: GGATCCATTT TAAGTAATAG AATAGGATTT TTAATTGTTC CAGTGT~~TTCT~~ GTGATAGAGC TGTCC~~TGCAC~~ AGACCTGTTT (CTCGAGATAA *CTTCGTATAA TGTATGCTAT ACGAAGTTAT* GCTAGTAACT ATAACGGTCC TAAGGTAGCG ACTAGC)ATT AGTATGGAAG GTC~~CGTCCAC~~ TGTCAGGTT CCTCTTGGG AGCTCTTTGT CTCTCTGGAC TCTGTATACA CTGCTTGCAT (서열 번호: 36).
- [0213] 이어서, 인간 CD47 유전자의 엑손 2~7을 마우스의 내인성 CD47 유전자에 삽입을 포함하는 한배의 새끼를 생성하기 위해, 양성 ES 세포 클론을 사용해 암컷 마우스를 VELOCIMOUSE® 방법을 이용하여 이식하였다(예를 들어, 미

국 특허 번호 7,294,754 및 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 참조). 내인성 CD47 유전자의 엑손 2~7의 인간화를 지니는 마우스를 재확인하였고, 인간 CD47 유전자 서열의 존재를 검출하는 대립유전자 검정(앞서 언급한 Valenzuela *et al.*)의 변형을 이용하여 꼬리 조각으로부터 단리된 DNA의 유전형을 확인하였다. 새끼의 유전형을 확인하고 특성화를 위해 인간화 CD47 유전자 작제물에 대해 이형접합성인 동물군을 선택한다.

표 4

명칭	프라이머	서열(5'-3')	
7190mTU	정방향	TGCAGAAGTCACTAGGAGGAAT	(서열 번호: 21)
	프로브	TCAGTCAACTTCTTCTGGGTTGTTTCC	(서열 번호: 22)
	역방향	GTGCCAGACTCACTTTCTATCCA	(서열 번호: 23)
7190mTD	정방향	TGCTGCCAATATACGGCTTCTG	(서열 번호: 24)
	프로브	CAGCTCTCATAGCCAACACTATGGTGCC	(서열 번호: 25)
	역방향	TCAAGCAGAGCCTGGTTATCTG	(서열 번호: 26)
7190hTU	정방향	GTCGTCATTCCATGCTTTGTTAC	(서열 번호: 27)
	프로브	TGGAGGCACAAAACACTACTGAAGTATACG	(서열 번호: 28)
	역방향	GGACAGTGGACTTGTTTAGAGC	(서열 번호: 29)
7190hTD	정방향	GGCTTGGTGGCTGATTGTTCT	(서열 번호: 30)
	프로브	AGCACCCAAACTGATATGCCTGTATTTG	(서열 번호: 31)
	역방향	TGGGAACCTGGTGTTC AAGTCTA	(서열 번호: 32)

[0214]

[0215] 실시예 2. 마우스 적혈구에 의한 인간화 CD47 폴리펩티드의 발현.

[0216] 본 실시예는 실시예 1에 따라 인간화 CD47 유전자를 함유하도록 변형된 비인간 동물(예를 들어, 설치류)이 CD47 조절제(예를 들어, 항-CD47 항체)를 스크리닝하고, 예를 들어, 약동학 및 안전성 프로파일과 같은 다양한 특성을 결정하는 데 사용될 수 있다는 것을 보여준다. 본 실시예에서, 몇몇 항-CD47 항체는 본원에 기술된 인간화 CD47 폴리펩티드를 발현하는 실시예 1에 따라 제조된 설치류로부터 단리된 마우스 적혈구(RBC) 상에 스크리닝된다.

[0217] 간략하게, 인간화 CD47 마우스(n=2)의 전혈 2 mL를 15 mL 튜브에 옮기고 4°C에서 10분 동안 200xg로 원심분리하였다. 혈장과 백혈구연층을 흡인한 후 PBS 15 mL를 첨가하고 세포를 서서히 혼합하였다. 혼합물을 4°C에서 5분 동안 200xg로 다시 원심분리하였다. 상청액을 흡인하고 세포를 2회 더 세척하였다. 펠렛 RBC를 PBS 10 mL의 최종 부피로 재현 탁시켰다. 재현탁된 RBC를 4°C에서 10분 동안 200xg로 마지막 원심분리하였다. 압축된 RBC의 부피는 0.5 mL로 추정되었고 PBS로 0.5%의 농도로 희석시켰다(0.5 mL 압축 RBC/100 mL PBS). 실제 RBC 농도는 세포측정기 Auto T4로 측정하였다(1.5×10^7 /mL; Nexcelom Bioscience).

[0218] 0.5% 마우스 RBC 80 μ L를 96-웰 V 바닥 플레이트의 각 웰에 첨가하였다. 각 웰에 항-CD47 항체를 첨가하였다(33 nM에서 20 μ L). 플레이트를 가볍게 두드려 혼합하고 얼음에서 30분 동안 배양하였다. 이어서, 플레이트를 염색 완충액(2% FBS를 가진 PBS)으로 2회 세척하였다. 각 웰에 2차 항체 Fab-488(Alexa Fluor 488- 접합 AffiniPure 마우스 항-인간 IgG, F(ab')₂ 단편 특이적, Jackson Immuno Research)을 10 μ g/mL의 농도로 첨가하였다. 플레이트를 얼음에서 다시 30분 동안 배양한 다음, 염색 완충액으로 1회 세척하였다. 각 웰의 세포를 200 μ L의 염색 완충액에 재현탁하고 96-웰 필터 플레이트를 통해 여과하였다 BD ACCURI™ C6 시스템(BD Biosciences)을 이용하여 플레이트 내 세포를 분석하였다. 예시적인 결과가 도 4에 나타나 있다. 시험된 각 항체에 대한 이소형 대조군 이상의 평균 형광 강도(MFI)를 표 5에 나타내었다.

표 5

항체	MFI	이소형 대조군에 대한 배수
Ab A, hIgG4s	28898	258
Ab B, hIgG4s	27545	246
Ab C, hIgG4s	24620	220
Ab D, hIgG1	29882	267
Ab E, hIgG4	33423	298
대조군, hIgG4s	112	-
대조군, hIgG4	112	-

hIgG4s: 작동인자 기능이 감소된 변형 Fc 영역을 가진 인간 IgG4

- [0219]
- [0220] 도 4에 나타낸 바와 같이, 모든 항-CD47 항체는 인간화 CD47 마우스로부터의 RBC에 결합하였다. 종합하면, 본 실시예는 (1) 본원에 기술된 인간화 CD47 유전자를 함유하도록 조작된 비인간 동물(예를 들어, 설치류)은 비인간 동물의 세포(예를 들어, RBC) 표면에 인간화 CD47 폴리펩티드를 발현하며, (2) 이러한 세포는 CD47 조절제(예를 들어, CD47 항체)를 스크리닝하고 이러한 조절제의 약동학적 프로파일을 결정하는 데 유용하다는 것을 보여준다.
- [0221] **실시예 3. 인간화 CD47 폴리펩티드를 발현하는 마우스 적혈구의 혈구 응집.**
- [0222] 본 실시예는 실시예 1에 따라 인간화 CD47 유전자를 함유하도록 변형된 비인간 동물(예를 들어, 설치류)이 CD47 조절제(예를 들어, 항-CD47 항체)를 스크리닝하고, 예를 들어 약동학 및 안전성 프로파일과 같은 다양한 특성을 결정하기 위한 다양한 검정(예를 들어, 혈구응집검사)에 사용될 수 있다는 것을 더 보여준다. 본 실시예에서, 혈구 응집을 촉진시키는 항체 농도를 결정하기 위해 몇몇 항-CD47 항체는 본원에 기술된 인간화 CD47 폴리펩티드를 발현하는 마우스 적혈구(RBC) 상에 스크리닝된다.
- [0223] 간략하게, 야생형 및 인간화 CD47 마우스(n=2)로부터의 RBC를 실시예 2에 설명한 바와 같이 제조하였다. 96-웰 V 바닥 플레이트를 통해 웰 1~12에 20 μ L의 항-CD47 항체(5배 연속 희석)를 첨가한 다음, 플레이트의 모든 웰에 0.5% 마우스 RBC 80 μ L를 첨가하였다. 플레이트를 가볍게 두드려 혼합하고 실온(24-27°C)에서 30분 동안 배양하였다. 응집 종말점은 육안으로 관찰하였다(즉, 음성 샘플에서 RBC는 바닥에 가라앉는 반면, 양성 샘플에서 RBC는 응집한다). 예시적 결과를 도 5에 나타내었고, 헴-응집을 나타내는 웰을 네모로 나타내었다.
- [0224] 도 5에 나타낸 바와 같이, 야생형 마우스에서 렉틴만 응집을 일으켰다. 그러나, 실시예 1에 따라 제조된 2개의 인간화 CD47 설치류로부터의 RBC에서는 렉틴 외에도 2개의 항-CD47 항체(Ab E 및 Ab C)가 응집을 유도하였다. 이들 두 항체가 응집을 유도한 농도는 11 nM부터 시작되었다. 종합하면, 본 실시예는 본원에 기술된 인간화 CD47 유전자를 함유하도록 조작된 비인간 동물(예를 들어, 설치류)이 CD47 조절제(예를 들어, CD47 항체)의 하나 이상의 성질(예를 들어, 혈구 응집)을 평가하는 데 사용될 수 있다는 것을 보여준다.
- [0225] **실시예 4. 인간화 CD47 설치류에서 CD47 조절제의 약동학적 클리어런스.**
- [0226] 본 실시예는 실시예 1에 따라 인간화 CD47 유전자를 함유하도록 변형된 비인간 동물(예를 들어, 설치류)에서 CD47 조절제(예를 들어, 항-CD47 항체)의 약동학적 클리어런스를 평가하는 방법을 예시한다. 본 실시예에서, 야생형 및 인간화 CD47 설치류(예를 들어, 마우스)에게 항-CD47 항체를 투여하였고, ELISA 검정을 이용하여 항체의 혈청 수준을 결정하였다.
- [0227] 간략하게, 야생형(n=5) 또는 인간화 CD47에 동형접합성인 마우스(n=5; 본원에 기술된 것)에게 4가지 항-CD47 항체(Ab F, Ab G, Ab H 및 Ab I)와 IgG4s 이소형 대조 항체(IgG4s)를 투여하였다. 마우스의 유전적 배경은 75 % CD57BL/6과 25 % 129Sv였다. 5마리의 인간화 CD47 설치류에서 각 항체를 시험하였다. 모든 항체는 50 mg/kg의 투여량으로 피하 투여하였다. 항체 투여 1일 전에 하나의 사전 혈액을 수집하였다. 주사후 혈액을 6시간, 1일, 2일, 3일, 4일, 7일, 10일 및 14일에 수집하였다. 혈액의 혈청 분획을 분리하고 ELISA 면역분석법을 이용하여 전체 인간 항체 분석을 실시하였다.

[0228] 간략하게, 염소 항-인간 IgG 다중클론 항체(Jackson ImmunoResearch)를 96-웰 플레이트에 코팅하여 혈청 내 시험 인간 항체를 포획한 다음, 플레이트에 결합된 항체를 호스래디시 페록시다제에 접합된 염소 항-인간 IgG 다중클론 항체(Jackson ImmunoResearch)와 TMB 기질(BD Pharmingen)을 사용하여 검출하였다. 혈청 샘플을 6회 연속 희석하였고, 각 항체의 참조 표준을 12회 연속 희석하였다. 혈청 내 약물 항체 농도를 Graphpad Prism 소프트웨어를 사용해 생성된 참조 표준 곡선에 기반하여 계산하였다. 예시적인 결과가 도 6 및 표 6에 나타나 있다.

[0229] 데이터는 야생형 및 본원에 기술된 인간화 마우스에게 투여된 항체가 내성이 좋다는 것을 보여주었다. 종합하면, 본 실시예는 본 발명의 비인간 동물, 예를 들어 순환 약물 수준과 같은, CD47(예를 들어, 항-CD47 항체)을 표적으로 하는 약물의 하나 이상의 약동학적 성질을 평가하는 데 사용될 수 있다는 것을 보여준다. 또한, 본원에 기술된 비인간 동물은 투여 후 부작용을 확인함으로써, CD47을 표적으로 하는 약물의 독성을 평가하는 데 사용될 수 있다.

표 6

혈청 항체 농도 (µg/mL ± SEM)							
항체	6시간	1일	2일	3일	4일	7일	10일
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							
이소형	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
대조군							

[0230]

[0231] 실시예 5. 인간화 CD47/SIRP α 설치류에서 CD47 조절제의 약동학적 프로파일.

[0232]

본 실시예는 인간화 CD47(실시예 1에 따름) 및 SIRP α 유전자를 함유하도록 변형된 비인간 동물(예를 들어, 설치류)에서 CD47 조절제(예를 들어, 항-CD47 항체)의 약동학적 클리어런스를 평가하는 방법을 예시한다. 특히, 본원에 기술된 인간화 CD47 설치류는 내인성 부분 및 인간 부분을 함유하는 인간화 SIRP α 유전자를 더 함유하도록 변형되었고, 본원에 참조로 포함된 2014년 9월 23일 출원된 PCT/US14/56910에 기술된 바와 같이, 인간 부분은 인간 SIRP α 단백질의 세포외 도메인(예를 들어, 인간 SIRP α 단백질의 아미노산 28~362)을 암호화하고, 내인성 부분은 내인성 SIRP α 단백질의 세포내 도메인(예를 들어, 쥐와 동물 SIRP α 단백질의 막관통 및 세포내 부분을 암호화하는 아미노산)을 암호화한다. 인간화 SIRP α 마우스를 인간화 CD47 마우스에 교배하여 이중 인간화 CD47/SIRP α 마우스를 제조하였다. 본 실시예에서, 이중 인간화 CD47/SIRP α 설치류(예를 들어, 마우스)에게 다양한 항-CD47 항체를 투여하고 해당 약동학적 프로파일을 확인하였다.

[0233]

간략하게, 야생형(n=5) 및 인간화 CD47과 SIRP α 유전자에 동형접합성인 마우스(CD47^{hu/huSIRP α hu/hu}; 군당 n=5) 군에, 선택된 항-CD47 항체 및 IgG4 이소형 대조 항체(hIgG4s)를 투여하였다. 마우스의 유전적 배경은 75% CD57BL/6 및 25% 129Sv였다. 모든 항체는 50 mg/kg의 단일 피하 투여량으로 투여되었다. 항체 투여 1일 전에 하나의 사전 혈액을 수집하였다. 주사후 혈액을 6시간, 1일, 2일, 3일, 4일, 7일 및 10일에 수집하였다. 혈액의 혈청 분획을 분리하고 (전술한) ELISA 면역분석법을 이용하여 전체 인간 항체 분석을 실시하였다. 추가로, 적혈구 수를 결정하기 위해, 6시간, 1일, 2일, 3일, 4일, 7일 및 10일에 적혈구용적 수준을 측정하고, 필요에 따라 (6시간 및 소변 색깔이 황색에서 벗어났을 때) 소변 검사를 수행하였다. 예시적인 결과가 도 7-9에 나타나 있다.

[0234]

도 7 및 8에 나타난 바와 같이, 모든 항-CD47 항체는 CD47^{hu/huSIRP α hu/hu} 마우스에서 표적 매개 클리어런스를 나타내었고, 특히, 많은 항체가 유사한 약동학적 프로파일을 나타내었다. 또한, 하나의 항-CD47 항체(Ab F)의 1가 형태는 2가 등가물보다 더 큰 생체 이용률을 나타내었다(도 8). 본 발명자들은 인간화 CD47 및 이중 인간화 동물(즉, CD47^{hu/huSIRP α hu/hu} 마우스)을 이용한 여러 실험 중에서 항체에 대한 유사한 약동학적 프로파일을 관찰하였다.

[0235]

CD47^{hu/huSIRP α hu/hu} 마우스에서, Ab J는 시험된 다른 항-CD47 항체(Ab F, Ab G, Ab I 등)보다 적혈구용적 수준에 미치는 영향이 적었고, 대조군(hIgG4s)에 유사한 적혈구용적 수준의 변화를 가졌다. 2~4일차 적혈구용적의 측정

은 정상 범위(약 38.5~45.1%)로부터 가장 큰 하락을 나타내었고, 이는 Abs F, G 및 I 투여군을 포함하였다. 특히, Ab F의 1가 형태는 시험된 다른 항체와 비교하여 적혈구용적에 대한 효과 감소의 지연을 보여주었다. 본 발명자들은 다양한 치료군 중 적혈구용적 수준의 차이는 다양한 항체에 의해 인식되는 에피토프의 차이에 기인할 수 있다고 추론하였다. 또한, 선택된 항-CD47 항체가 투여된 마우스는 6시간째에 헴에 대한 양성 소변 덱스틱 검사를 나타내었다. 예를 들어, Ab J와 Ab F 치료군 각각은 1일 차에 헴에 대해 양성인 하나의 마우스를 가진 반면, 다른 모든 시점은 음성이었다. 어떤 치료군에서도 상당한 체중 감소(>20%)가 관찰되지 않았다.

[0236] 종합하면, 본 실시예는 본 발명의 비인간 동물이, 예를 들어 순환 약물 수준과 같은, CD47을 표적으로 하는 하나 이상의 약물(예를 들어, 하나 이상의 항-CD47 항체)의 약동학적 성질 및/또는 프로파일을 평가하기 위한 생체내 시스템을 제공한다는 것을 보여준다. 또한, 다른 인간화 유전자(예를 들어, 인간화 SIRP α)를 더 함유하도록 조작된 본원에 기술된 비인간 동물은 CD47을 표적으로 하는 하나 이상의 약물의 표적 매개 클리어런스를 평가하는 데 사용될 수 있다.

[0237] **균등물**

[0238] 본 발명의 적어도 하나의 구현예의 몇몇 양태가 설명되었는데, 당업자에게는 다양한 수정, 변형 및 개선이 용이하게 발생할 것으로 당업자에게 이해된다. 이러한 수정, 변형 및 개선은 본 개시의 일부인 것으로 의도되며, 본 발명의 사상 및 범주 이내인 것으로 의도된다. 따라서, 전술된 설명 및 도면은 단지 예시이며, 본 발명은 이어지는 청구범위에 의해 상세히 기술된다.

[0239] 청구범위 요소를 변형하기 위한 청구범위 내 "제1", "제2", "제3" 등과 같은 서수 용어의 사용은 그 자체가 하나의 청구범위 요소가 다른 것을 앞서는 어떠한 우선순위, 선행, 또는 순서 또는 방법의 작용이 수행되는 일시적인 순서를 나타내지 않으며, 단지 청구범위 요소들을 구분하기 위해 일정한 이름을 가지는 하나의 청구범위 요소를 (서수 용어의 사용이 없었다면) 동일한 이름을 가진 다른 요소로부터 구분하기 위한 표지로서 사용된다.

[0240] 본 명세서 및 청구범위 내에서 여기에 사용된 단수 형태는 명확하게 달리 나타내지 않는 한 복수의 지시 대상을 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 하나의 균의 하나 이상의 구성원 사이에서 "또는"을 포함하는 청구범위 또는 상세한 설명은 반대로 지시되거나 그렇지 않으면 문맥으로부터 명백하지 않는 한 하나, 하나 초과 또는 전체의 균 구성원이 주어진 산물 또는 과정에 존재하거나 채용되거나 그렇지 않으면 관련되는 것을 만족하는 것으로 간주된다. 본 발명은 균의 정확히 하나의 구성원이 주어진 산물 또는 과정에 존재하거나 채용되거나 그렇지 않으면 관련된 구현예를 포함한다. 본 발명은 또한 하나 초과, 또는 전체 균의 구성원이 주어진 산물 또는 과정에 존재하거나 채용되거나 그렇지 않으면 관련된 구현예를 포함한다. 나아가, 본 발명은 그렇지 않은 것으로 지시되거나 반대 또는 불일치가 일어날 수 있다는 것이 당업자에게 명백하지 않는 한 하나 이상의 열거된 청구범위로부터 하나 이상의 제한, 요소, 항목, 서술 용어 등이 동일한 기반의 청구범위에 의존하는 다른 청구범위에 도입된 모든 변형, 조합, 치환을 포함하는 것으로 이해된다. 요소가 (예를 들어, 마커시 균 또는 유사한 형식 내) 목록으로서 제시된 경우, 이러한 요소의 각각의 하위군도 또한 개시되고, 임의의 요소(들)가 이러한 균으로부터 제거될 수 있는 것으로 이해된다. 일반적으로, 본 발명, 또는 본 발명의 양태가 특정 요소, 특징 등을 포함하는 것으로 지칭되는 경우, 본 발명의 특정 구현예 또는 본 발명의 양태는 이러한 요소, 특징으로 이루어지거나 필수적으로 이루어지는 것으로 이해되어야 한다. 간결성을 위해, 이러한 구현예들은 본원에서 글자 그대로 모든 경우에서 구체적으로 기재되지 않는다. 또한 본 발명의 임의의 구현예 또는 양태는 특정한 배제가 본 명세서 내에 언급되었는지에 관계없이 청구범위로부터 명백하게 제외될 수 있는 것으로 이해되어야 한다.

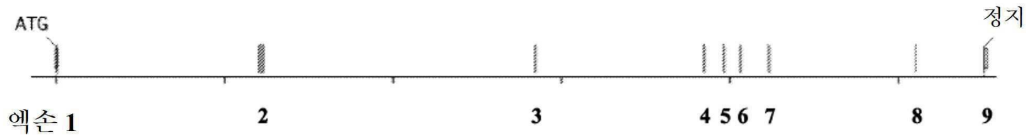
[0241] 당업자는 본원에 기술된 검정 또는 다른 과정들에서 얻어진 값에서 기인할 수 있는 통상적인 오차 또는 표준 편차를 이해할 것이다.

[0242] 간행물, 웹사이트 및 다른 참조 물질들은 본 발명의 배경기술을 설명하고, 그의 시행이 참조로서 본원에 포함되는 것을 고려하여 추가적인 상세한 설명을 제공하기 위해 언급되었다.

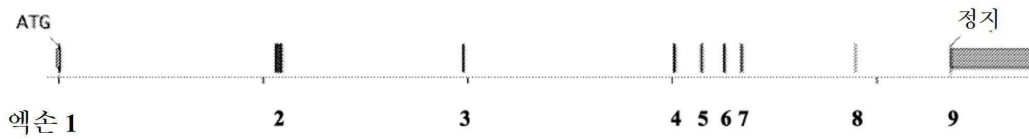
도면

도면1

마우스 CD47

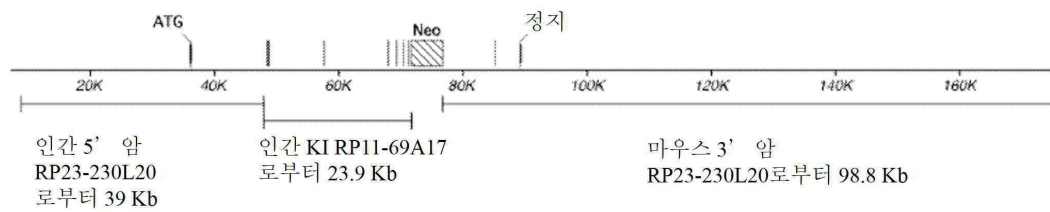


인간 CD47

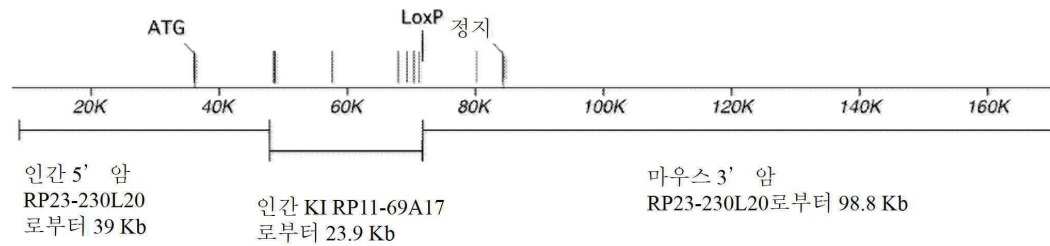


도면2

인간 CD47 엑손 2~7이 삽입되고, 네오마이신 카세트가 손상되지 않은 내인성 CD47 유전자(약 4995 bp)

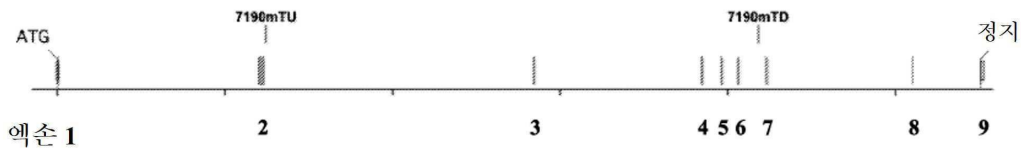


인간 CD47 엑손 2~7이 삽입되고, 네오마이신 카세트가 제거된(76 bp 잔존) 내인성 CD47 유전자

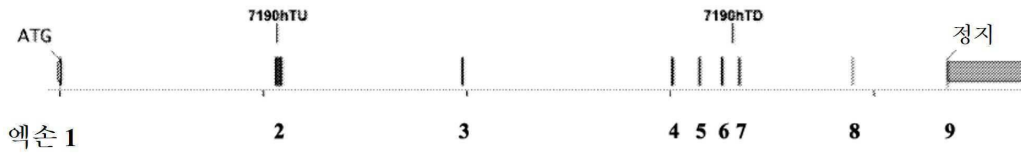


도면3

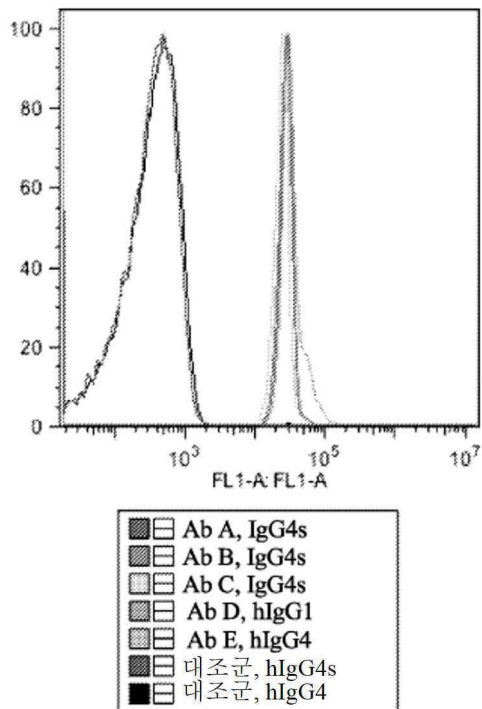
마우스 CD47



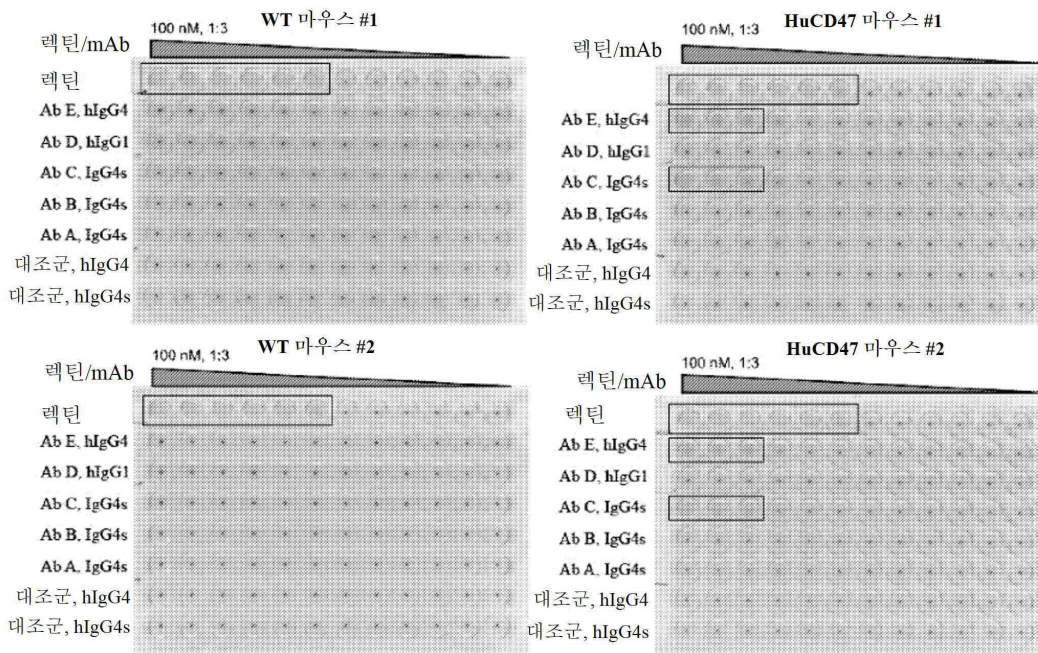
인간 CD47



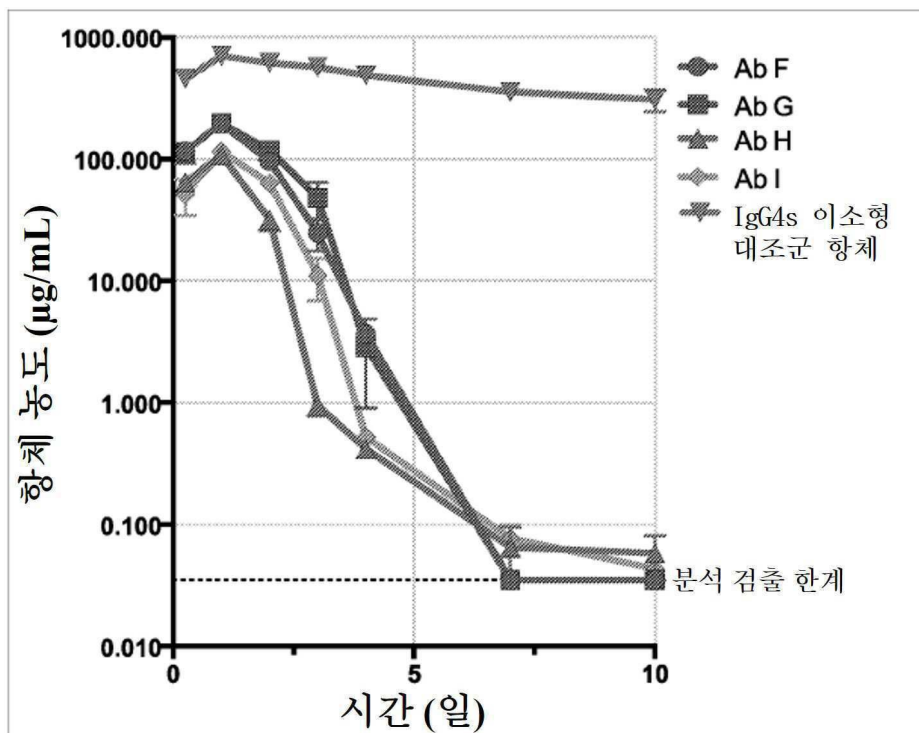
도면4



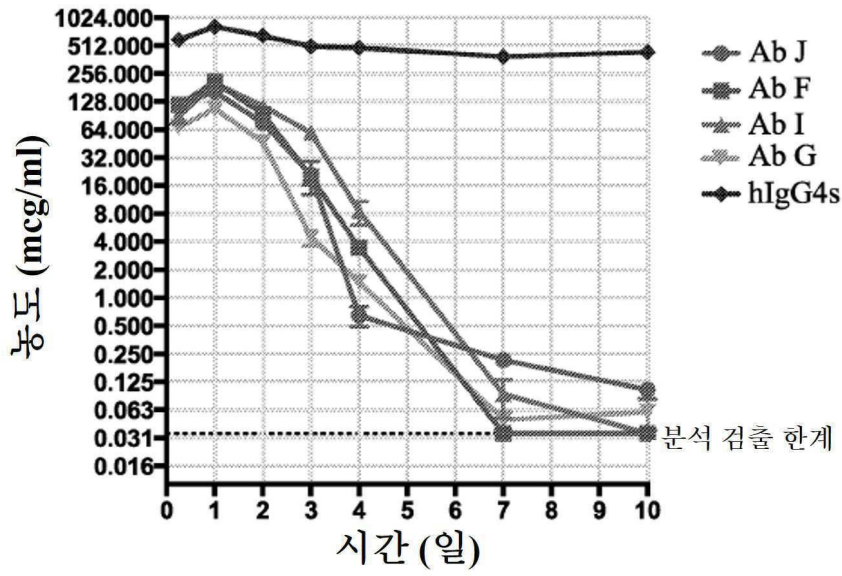
도면5



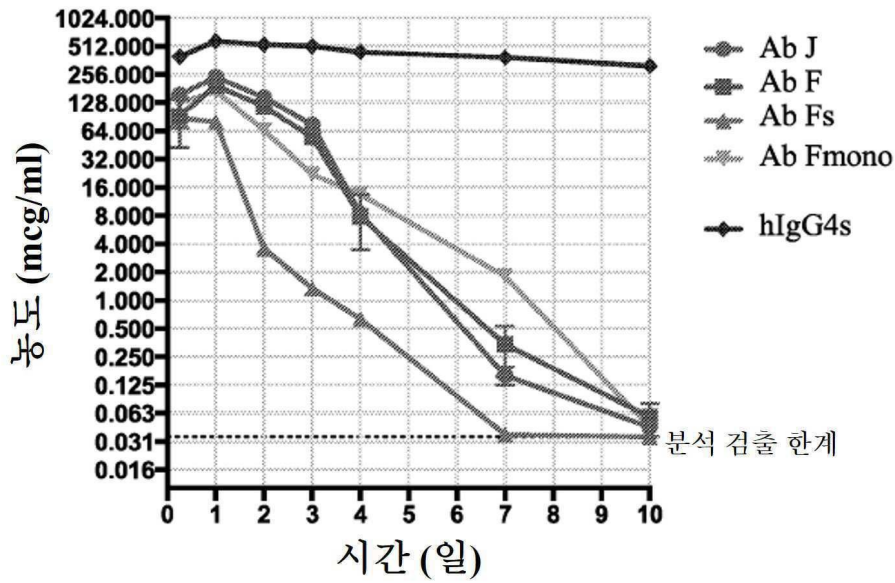
도면6



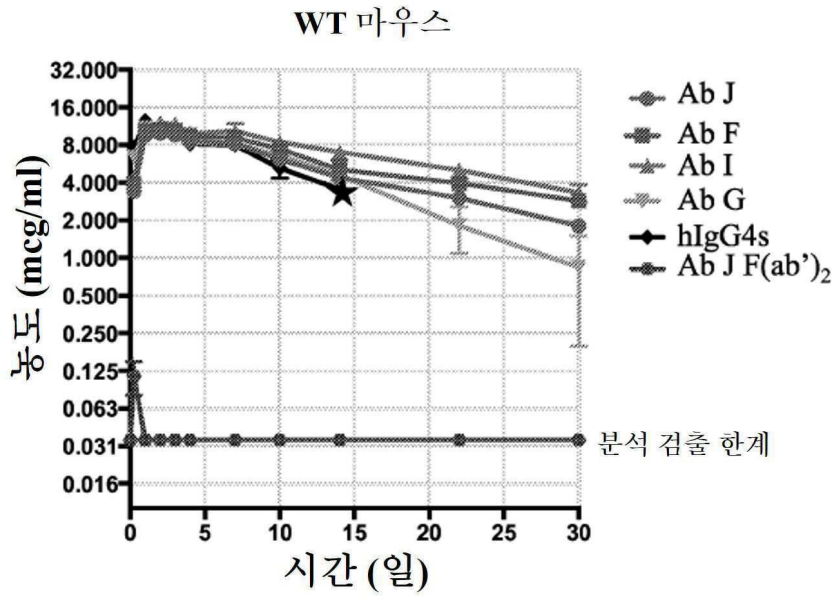
도면7



도면8



도면9



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.

<120> NON-HUMAN ANIMALS HAVING A HUMANIZED CLUSTER OF DIFFERENTIATION

47 GENE

<130> 32584 (10108W001)

<140><141><150> 62/087,992

<151> 2014-12-05

<160> 36

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 5591

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 1

gcctacaccg ggagagcagg gaggaggagt tggactgagg ttgggaggct ccgaggtcca 60

gggagcagctt ggccagaggg agtagagagc agcggggctg cgcagggagc cgtgccgtga 120

gttccggtga gctgtgtgt cccatgctcc cgtctttcag gccggcccag gacacgaagc 180

cggaagagag ctggctggag ggacgggggc cgtgagcaga gactgcaacc cgcgcagccc 240

cggggacagg ctgattcttg gcgctctccg ccggagcctg cccagggctg ggtgtgaggc 300

tggcgtcacg tcaacgagca gaggcggcca ggcggggcgg agtgcgcgtg cgcggggcgg 360
 cgagcacgcg cgcgcgcgca cccccggca gcctgggcgg ccgctcctgc ctgtcactgc 420
 tgcggcgctg ctggtcggtc gtttcccttg aaggcagcag cggaggcggc ggctgctcca 480
 gacacctgcg gcggcgacce cccggcggcg cggagatgtg gcccttggcg gcggcgtgt 540
 tgctgggctc ctgctgctgc ggttcagctc aactactgtt tagtaacgtc aactccatag 600

 agttcacttc atgcaatgaa actgtgggtca tccttgcacat cgccgtaat gtggaggcgc 660
 aaagcaccga agaatgttt gtgaagtgga agtgaacaa atcgtatatt tcatctatg 720
 atggaataa aaatagcact actacagatc aaaactttac cagtcaaaa atctcagtct 780
 cagacttaat caatggcatt gcctctttga aaatggataa gcgcgatgcc atggtgggaa 840
 actacacttg cgaagtgaca gagttatcca gagaaggcaa aacagttata gagctgaaaa 900
 accgcacggc cttaacact gaccaaggat cagcctgttc ttacgaggag gagaaaggag 960
 gttgcaaatt agtttcgtgg ttttctccaa atgaaaagat cctcattgtt attttccaa 1020

 ttttgctat actcctgttc tggggaaagt ttggtatfff aactcaaa tataaatcca 1080
 gccatagcaa taagagaatc attctgctgc tcgttgccgg gctggtgctc acagtcatcg 1140
 tggttgttgg agccatcctt ctcatcccag gagaaaagcc cgtgaagaat gcttctggac 1200
 ttggcctcat tgtaatctct acggggatat taatactact tcagtacaat gtgtttatga 1260
 cagcttttgg aatgacctt ttcaccattg ccatattgat cactcaagtg ctgggctacg 1320
 tccttgcttt ggtcgggctg tgtctctgca tcatggcatg tgagccagtg cacggcccc 1380
 ttttgatttc aggtttgggg atcatagctc tagcagaact acttgatta gtttatatga 1440

 agtttgcga ataggtgaag ggaagtgcg gactgtaact tggaagtcag aaatggaaga 1500
 atacagtgt ctaagcacca ggtcttcag actcacagct ggaaggaaca gacaacagta 1560
 actgacttcc atccaggaaa acatgtcaca taaatgatta ctaagtttat attcaaagca 1620
 gctgtacttt acataataa aaaaatatga tgtgctgtgt aaccaattgg aatcccattt 1680
 ttctattgtt tctactcaac taggggcaaa cgtttcaggg gcaacttcca agaatgatgc 1740
 ttgtagate ctagagtctc tgaacactga gtttaaattg attccgagtg agactcgcca 1800
 agcactaacc tgagggttag ttaccagag atacctatga aaaacagtgg tatccagcaa 1860

 gccttagtaa actcaggttg ccagcagctt tgecacttcc gctgctagct gaataacaag 1920
 actgccactt ctgggtcata gtgatagaga ctgaagtaga aaaacgaatg tggttgggca 1980
 aatcccgtgt ggccccctg tgtgctatga tattgatggc actggtgtct tcattcttgg 2040
 gggttgccat cattcacaca caccctttg acatacagtg caccctcagtt ttgaatacat 2100
 ttttttgca ccctgtcccg ttctgctact ttgatttgcg ttatgatata tatatatata 2160

tataataacct tttctctct ttaaacaatgg tctgtgaca caatagtcag ttgcagaaag 2220
gagccagact tattcgcaaa gcactgtgct caaactcttc agaaaaaaag gaaaaaaa 2280

aaaagetata gttgtaacat atgtattcca gacctctggt ttaaaggcaa aagaaaaaa 2340
atctacagtg tttcttctca tgttttctga tggaggcat gacaaagcaa gactgaaatc 2400
tgaactgtgt ctctgcatg gcaacacgtg tctccgtcag gccctcgcaa ggccccggga 2460
gggggttcta cgctcttgt ctctttgttg catgctgaac actcatcgcc ttcctactgt 2520
atcctgcctc ctgcagcctc cctcttctc ctctcttcc tcttctctc cttctctc 2580
ctctctctc tctccaagt ttgaaagtc aaacaaaact accacattcc ctaccagtt 2640
agaagaaaac caccgtctg acagtgtga tgcgatggag tacitttaga ttattagcac 2700

ctgtttttac ctgtttgtg ggcgtgtttg tatgtgcaca tgtatgaagt cggcacatgc 2760
accttctgta tggcgagagg cgtggcatct acagaagagc agatgccaac tttgtgcttt 2820
tagtgaatac attaaaaaa aaaaaccaac ggtccttatt gagtggaatt ctattgatg 2880
caaatattg agctctttaa gactttaaaa ctagataatg tgccaagctt ttaggactgc 2940
tcaccagtgc cctctgaaga aacaccagta ctttttctg tttgtgtaat aaaggcatat 3000
ttgtatttgt gttgcatca ctaatggtta tttcttctta gtccactgaa tgtttccatg 3060
tgctctcgt atgccaact tttgtcacc tttcatgtgg ggaccaaag gtttgtctgt 3120

ggcaaaccta aacctatgac ctgctgaggc ctctcagaaa actgaccaca gtaccaagat 3180
agtacttgcg aaagaaaagt aggttccctc cctggttttg tagctgtcgc caatattagc 3240
gtaattccaa ggagctgaac gcctttatat aaatctgatg gcacctgatg cttttagttc 3300
tgaaaatatt tacactcggg tcatgttgt gatgacttaa acaaagtttt gatgaagaga 3360
gcaaaaaaaa agcagggtgga tttggaacag tttcagggtt tttttgttt tttgttttt 3420
gtttttgttt ttttttttt atttttgttt tctgttctc tgttagaaaa gtcaggtgtt 3480
ctctgtcagg ctatctttat agtcaatttt tttacgaac taaagtagta cttttaata 3540

tgtagtcaac gccctctgc tgggggttca gttttgggtc ttaaccagct gtcatttct 3600
ctatgtgcc tgccactga ggcactgagt gcctagaca gtcccatcgg tggtagccag 3660
ggaaacgaaa gacgaactca actctgtct ctaataatca actctctgta tgaaggatgg 3720
cagcattaag agtctctctg cctgggcatt atgggccag ttcacctct ttaaatcaaa 3780
cccgcagtgg ctcccagttc tegtccatc agatttaaat tgctaacagt atggggggca 3840
ccacgatct gttttgtccc acaatgcgct tttctctccc aaatcccgat tctgtctgc 3900

atagcctcta ttcaatTTTT atttattgTc tgcctccac ttatacaatc gtagagagca 3960

 atgccatttg tcactttctg caacagtttt ttgagccttt atggctgaat cccatttttc 4020
 ttctctttca aactgtttgc tccattgctc ctcccgcacg gctgtccgta cagtcatecc 4080
 atccatctgg gggcctcttt catctctcac ccttcctggg gcttcgtgga tctctgctta 4140
 cctctgtggg tttttttttt tttttttgac ttattcttct cactggactt taagattact 4200
 tccacagcga aagtgtgcc tcccttttct gcccgcagtg ttctgcgtac tttagatact 4260
 actcagtgtc gacatttgat ggcaaaagtT gcctgcactt aaatttctct ttttaatagg 4320
 gtgaactaga gttggagtTt ttttctcttt tttctctttt ctctctctct ctctctctct 4380

 ctctctctct ctctctctct ctccctccct cctccctcc ctccctccct cctctctct 4440
 ctctttttct ttctttcttt ctttctttct ttctttcttt ctttctttct ttctttcttt 4500
 ttttgacaaa tctcacaggc tttgagaatt ataaaaggTg acagttcacc tgaaaatcac 4560
 aggtctggTc tgtttaaatt gttgagaaat atccgattaa aagtcttgTg gctgtgtcct 4620
 aataggctct ctttcaggac gttgtagtca atagagtggc tgaaccatac ttgagtttat 4680
 aaagctcaaa aactgatgca cccactctgc tattatcgtg ttagtaagag ttcagctgta 4740
 tatcattgtc taggtttatc ttgtcctaca gtgggtattc aaatatggcc accagaggat 4800

 atgtgtaaat ataagcact gtatttgctt gttgttgaga actggaggga aaacaaaaaa 4860
 tgtctggcaa ccctttgctt ttttaaccgt aattaattga cagtttattt agagataaga 4920
 gttttcaaaa atctcttaac tgccacaacc cacagagggt cttgttttgc catcttcagt 4980
 ggctcacaga tatgatccaa gtttaacttga aagagatgag cagtaccag gaaattgtcc 5040
 tgcctttaac tciggctgtc cttaattatg actgtttaat gctgaatttt ccatccgtct 5100
 agtgtttgag ggtaaagaaa agcctttttt aaataagtat ttctgtaaaa cggcatcggT 5160
 gggatcttct gtgttgetat cacgggtgaa agagggaaac atttcttatt tttattaagc 5220

 agagcattat ttacagaaag ccattgttga gaattagttc ccacatcata taaatatcca 5280
 ttaaccattc taaattgtaa gagaactcca gtgttgetat gcacaaggaa ctctcctggg 5340
 ggccTTTTTt tgcatagcaa ttaaaggTat gctatttTgc agtagccatt ttttgcagtg 5400
 atttaaagac caaagtTgtt ttacagctgt gttaccctta aaggTTTTTt ttttatgtat 5460
 taaatcaatt tatcactgtt tgaagctttg aatacctgca atctttgcca agatactttt 5520
 ttatttaaaa aaataactgt gtaaatatta cctgttaata ttatatatac ttaataaaac 5580
 attttaagct a 5591

<210> 2

<211> 312

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 2

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

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

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

 180 185 190
 Lys Arg Ile Ile Leu Leu Leu Val Ala Gly Leu Val Leu Thr Val Ile
 195 200 205
 Val Val Val Gly Ala Ile Leu Leu Ile Pro Gly Glu Lys Pro Val Lys

cagacttaat caatggcatt gcctctttga aaatggataa gcgcatgcc atggtgggaa 840
 actacacttg cgaagtgaca gagttatcca gagaaggcaa aacagttata gagctgaaaa 900
 accgcacggg ttctgtggtt tctccaaatg aaaagatcct cattgttatt ttcccaattt 960
 tggctatact ccigtcttgg ggaaagtttg gtattttaac actcaaatat aaatccagcc 1020
 atacgaataa gagaatcatt ctgctgctcg ttgccgggct ggtgctcaca gtcacgtgg 1080
 ttgttggagc catccttctc atcccaggag aaaagcccgt gaagaatgct tctggacttg 1140
 gcctcattgt aatctctacg gggatattaa tactacttca gtacaatgtg tttatgacag 1200

 cttttggaat gacctcttc accattgcca tattgatcac tcaagtgctg ggctacgtcc 1260
 ttgctttggt cgggctgtgt ctctgcatca tggcatgtga gccagtgcac ggcccccttt 1320
 tgatttcagg ttggggatc atagctctag cagaactact tggattagtt tatatgaagt 1380
 ttgtcgttc caaccagagg actatccaac ctctaggaa taggtgaagg gaagtgacgg 1440
 actgtaactt ggaagtgaca aatggaagaa tacagttgtc taagcaccag gcttcacga 1500
 ctcacagctg gaaggaacag acaacagtaa ctgactcca tccaggaaaa catgtcacat 1560
 aatgattac taagtttata ttcaaagcag ctgtacttta cataataaaa aaaatatgat 1620

 gtgctgtgta accaattgga atcccatttt tctattgttt ctactcaact aggggcaaac 1680
 gtttcagggg caacttccaa gaatgatgct tgttagatcc tagagtctct gaacactgag 1740
 tttaaattga ttccgagtga gactcgccaa gcactaacct gaggttagt tacccagaga 1800
 tacctatgaa aaacagtggg atccagcaag ccttagtaaa ctcaggttgc cagcagcttt 1860
 gccacttccg ctgctagctg aataacaaga ctgccacttc tgggtcatag tgatagagac 1920
 tgaagtagaa aaacgaatgt ggttgggcaa atcccgtgtg gccctctgt gtgctatgat 1980
 attgatggca ctggtgtctt cattcttggg ggttgccatc attcacacac accccttga 2040

 catacagtgc accccagttt tgaatacatt tttttgcaac cctgtcccgt tetgctactt 2100
 tgatttgcgt tatgatatat atatatatat ataatacctt ttctcctctt taaacatggt 2160
 cctgtgacac aatagtcagt tgcagaaagg agccagactt attcgcaaag cactgtgctc 2220
 aaactcttca gaaaaaaaaagg aaaaaaaaaa aaagctatag ttgtaacata tgtattccag 2280
 acctctggtt taaaggcaaa agaaaaaaaa tctacagtgt ttcttctcat gttttctgat 2340
 cggaggcatg acaagcaag actgaaatct gaactgtgct tectgcatgg caacacgtgt 2400
 ctccgtcagg cctcgcaag gcccggggag ggggttctac gcctcttctc tctttgttgc 2460

 atgctgaaca ctcatgcct tctactgta tctgctcc tgcagcctcc ctcttctcc 2520
 tctcttctct ctctctctc ttctctctc tctctctct cctccaagtt tgaaaggtea 2580
 aacaaaacta ccacattccc taccagttga gaagaaaacc accgtcctga cagtttgtat 2640

cgcatggagt acittttagat tattagcacc tgtttttacc tcgitttggg gcgtgtttgt 2700
 atgtgcatat gtatgaagtc ggcacatgca ctttctgtat gggcagagcc gtggcatcta 2760
 cagaagagca gatgccaaact ttgtgctttt agtgaataca ttaaaaaaaaa aaaaccaacg 2820
 gtccttattg agtggaaattc tatttgatgc aaatatttga gctctttaag actttaaaac 2880

 tagataatgt gccaaagcttt taggactgct caccagtgcc ctctgaagaa acaccagtac 2940
 tttttcctgt ttgtgtaata aaggcatatt tgtatttggg tttgcatcac taatggttat 3000
 ttcttcttag tccactgaat gtttccatgt gcctctcgta tgccaaactt tttgtcatct 3060
 ttcatgtggg gaccaaattg tttgtctgtg gcaaacctaa acctatgacc tgctgaggcc 3120
 tctcagaaaa ctgaccacag taccaagata gtacttcgca aagaaaagta ggttcctctc 3180
 ctggttttgt agctgtcgc aatattagcg taattccaag gagctgaacg cttttatata 3240
 aatctgatgg cacctgatgc ttttagttct gaaaatattt aactcggat catgttgttg 3300

 atgacttaaa caaagttttg atgaagagag caaaaaaaaa gcaggtggat ttggaacagt 3360
 ttcagggttt tttttgtttt ttgtttttt tttttgttt tttttttta tttttgttt 3420
 tctgttctct gttagaaaa tcaggtgttc tctgtcagcc tatctttata gtcaattttt 3480
 tttacgaact aaagtagtac cttttaatat gtagtcaacg cccctctgct cggggttcag 3540
 ttttgggtct taaccagctg tcatgttctc tatgtgcct gccacttgag gcaactgagtg 3600
 ccctagacag tccatcggg ggtagccagg gaaacgaaag acgaaactcaa ctcttctctc 3660
 taataatcaa ctctctgtat gaaggatggc agcattaaga gtcctcctgc ctgggcatta 3720

 ttgggccagt tcacctctt taaatcaaac ccgcagtggc tcccagttct cgtcccatea 3780
 gatttaaatt gctaacagta tggggggcac cacgcatctg ttttgcceca caatgcgctt 3840
 ttctctceca aatcccgatt tctgtctgca tagcctctat tcaattttta tttattgtct 3900
 gccctccact tatacaatcg tagagagcaa tgccatttgt cactttctgc aacagttttt 3960
 tgagccttta tggctgaatc ccatttttct tctctttcaa actgtttgct ccattgctcc 4020
 tcccgcagg ctgtccgtac agtcatcca tccatctggg ggctctttc atctctcacc 4080
 ctctctgggt ctctgtggat ctctgcttac ctctgtgggt ttttttttt ttttttgact 4140

 tattctctc actggacttt aagattactt ccacagcgaa agtgtgcct ccctttctg 4200
 cccgcagtgt tctgcgtact ttagatacta ctcagtctg acatttgat gcaaaagtgt 4260
 cctgcactta aatttctctt ttaaataggg tgaactagag ttggagtttt tttctctttt 4320
 ttctctttc tctctctc tctctctc tctctctc tctctctc tccctcctc 4380
 cctcctccc tccctcctc cctctctc tcttttctt tctttcttc tttctttctt 4440
 tctttcttc tttcttctt tctttcttt ttgacaaat ctcacaggct ttgagaatta 4500

taaaaggatga cagttcacct gaaaatcaca ggctctgtct gtttaattg ttgagaaata 4560

tccgattaaa agtcttggg ctgtgtccta ataggctctc tttcaggacg ttgtagtcaa 4620

tagagtggct gaaccatact tgagtttata aagctcaaaa actgatgcac ccactctgct 4680

attatcgtgt tagtaagagt tcagctgtat atcattgtct aggtttatct tgcctacag 4740

tgggtattca aatatggcca ccagaggata tgtgtaaata taagcacctg tatttgctg 4800

ttgttgagaa ctggaggaa aacaaaaaat gtctggcaac cctttgcctt ttaaccgta 4860

attaattgac agtttattta gagataagag tttcaaaaa tctcttaact gccacaacc 4920

acagagggtc ttgttttggc atcttcagtg gctcacagat atgatccaag ttaacttgaa 4980

agagatgagc agiaccagg aaattgtcct gcctttaact ctggctgtcc ttaattatga 5040

ctgtttaatg ctgaatttc catccgtcta gtgtttgagg gtaaagaaaa gcctttttta 5100

aataagtatt tctgtaaaac ggcatcgggtg ggatcttctg tgttgctatc acgggtgaaa 5160

gagggaaaca tttcttattt ttattaagca gagcattatt tacagaaagc cattgttgag 5220

aattagtcc cacatcatat aaatatccat taaccattct aaattgtaag agaactccag 5280

tgttctatg cacaaggaac tctctgggg gccttttttt gcatagcaat taaagtatg 5340

ctatttgta gtagccattt tttgcagtga tttaaagacc aaagttgttt tacagctgtg 5400

ttacccttaa aggttttttt tttatgtatt aaatcaattt atcactgttt gaagctttga 5460

atactgcaa tctttgcaa gatacttttt tatttaaaaa aataactgtg taaatattac 5520

cctgtaatat tatatafact taataaaaca ttttaagcta 5560

<210> 4

<211> 303

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 4

Met Trp Pro Leu Ala Ala Ala Leu Leu Leu Gly Ser Cys Cys Cys Gly

1 5 10 15

Ser Ala Gln Leu Leu Phe Ser Asn Val Asn Ser Ile Glu Phe Thr Ser

20 25 30

Cys Asn Glu Thr Val Val Ile Pro Cys Ile Val Arg Asn Val Glu Ala

35 40 45

Gln Ser Thr Glu Glu Met Phe Val Lys Trp Lys Leu Asn Lys Ser Tyr

50 55 60

<211> 5648

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 5

```

gcctacaccg ggagagcagg gaggaggagt tggactgagg ttgggcggct ccgaggtcca      60
gggcgagctt ggccagaggg agtagagagc agcggggctg cgcagggacg cgtgccgtga      120
gttccggtga gcgtgtgtgt cccatgctcc cgtctttcag gccggcccag gacacgaagc      180
cggaaagagag ctggctggag ggacgggggc cgtgagcaga gagtcaacc cgcgcagccc      240
cggggacagg ctgattcttg gcgctctccg ccggagcctg cccagggtg ggtgtgaggc      300

tggcgtcacg tcaacgagca gaggcggcca ggcggggcgg agtgcgcgtg cgcggggcgg      360
cgagcacgcg cgcgcgcgca cccccgggca gcctgggcgg ccgctcctgc ctgtcactgc      420
tgcggcgctg ctggtcggtc gtttcccttg aaggcagcag cggaggcggc ggctgtctcca      480
gacacctgcg gcggcgaccc cccggcggcg cggagatgtg gcccttggcg gcggcgtgt      540
tgctgggctc ctgctgtcgc ggttcagctc aactactgtt tagtaacgtc aactccatag      600
agttcacttc atgcaatgaa actgtgggtca tcccttgcct cgtccgtaat gtggaggcgc      660
aaagcaccga agaaatgttt gtgaagtgga agttgaacaa atcgtatatt ttcattatg      720

atggaataa aaatagcact actacagatc aaaactttac cagtcaaaa atctcagtct      780
cagacttaat caatggcatt gcctctttga aaatggataa gcgcgatgcc atggtgggaa      840
actacacttg cgaagtgaca gagttatcca gagaaggcaa aacagttata gagctgaaaa      900
accgcacggc cttaacact gaccaaggat cagcctgttc ttacgaggag gagaaaggag      960
gttgcaaatt agtttcgtgg ttttctcaa atgaaaagat cctcattgtt attttccaa      1020
ttttggctat actcctgttc tggggaaagt ttggtatfff aacctcaa tataaatcca      1080
gccatacгаа taagagaatc attctgctgc tcgttgccgg gctggtgctc acagtcatcg      1140

tggttgttgg agccatcctt ctcatcccag gagaaaagcc cgtgaagaat gcttctggac      1200
ttggcctcat tgtaatctct acggggatat taatactact tcagtacaat gtgtttatga      1260
cagcttttgg aatgacctct ttcaccattg ccataatgat cactcaagtg ctgggctacg      1320
tccttgcttt ggtcgggctg tgtctctgca tcatggcatg tgagccagtg cacggccccc      1380
ttttgatttc aggtttgggg atcatagctc tagcagaact acttgatta gtttatatga      1440
agtttgcgc ttccaaccag aggactatcc aacctcctag gaaagctgta gaggaacccc      1500
ttaacgaata ggtgaaggga agtgacggac tgtaacttgg aagtcagaaa tggaagaata      1560

cagttgtcta agcaccaggt cttcacgact cacagctgga aggaacagac aacagtaact      1620

```

gacttccatc caggaaaaca tgtcacataa atgattacta agtttatatt caaagcagct 1680
gtactttaca taataaaaaa aatatgatgt gctgtgtaac caattggaat cccatttttc 1740
tattgtttct actcaactag gggcaaacgt ttcaggggca acttccaaga atgatgcttg 1800
ttagatccta gagtctctga acactgagtt taaattgatt ccgagtgaga ctcgccaagc 1860
actaacctga gggttagtta cccagagata cctatgaaaa acagtggtat ccagcaagcc 1920
ttagtaaac t caggttgcca gcagctttgc cacttccgct gctagctgaa taacaagact 1980

gccacttctg ggtcatagtg atagagactg aagtagaaaa acgaatgtgg ttgggcaaat 2040
cccggtggtg cctctgtgt gctatgatat tgatggcact ggtgtcttca ttcttggggg 2100
ttgceatcat tcacacacac ccttttgaca tacagtgcac cccagttttg aatacatttt 2160
ttttgcacc tgcctcttca aacatggtcc tgtgacacaa tagtcagttg cagaaaggag 2280
ccagacttat tcgcaaagca ctgtgctcaa actcttcaga aaaaaaggaa aaaaaaaaaa 2340
agctatagtt gtaacatatg tattccagac ctctggttta aaggcaaaag aaaaaaatc 2400

tacagtgttt ctctcatgt tttctgatcg gaggcatgac aaagcaagac tgaaatctga 2460
actgtgtctc ctgcatggca acacgtgtct ccgtcaggcc ctcgcaagcc cgggggaggg 2520
ggttctacgc ctctgtctc tttgttgcac gctgaacact catcgcttc ctactgtatc 2580
ctgcctcctg cagcctcctt ctctctctc ctctctctt tctctctt ctctctctc 2640
ctctcttcc tccaagttg aaaggtcaaa caaaactacc acattccta cccagttaga 2700
agaaaaccac cgtcctgaca gttgtgatcg catggagtac ttttagatta ttagcacctg 2760
tttttacctc gtttgtgggc gtgtttgtat gtgcacatgt atgaagtcgg cacatgcacc 2820

ttctgtatgg gcagaggcgt ggcatctaca gaagagcaga tgccaacttt gtgcttttag 2880
tgaatacatt aaaaaaaaaa aaccaacggt ccttatgag tggaattcta tttgatgcaa 2940
atatttgagc tcttaagac tttaaaacta gataatgtgc caagctttta ggactgctca 3000
ccagtgcct ctgaagaac accagtactt tttctgttt gtgtaataaa ggcatatttg 3060
tatttgtgtt tgcatacta atggttattt ctcttagtc cactgaatgt ttccatgtgc 3120
ctctctgatg ccaactttt tgtcatctt catgtgggga ccaaatggtt tgtctgtggc 3180
aaacctaac ctatgacctg ctgaggctc tcagaaaact gaccacagta ccaagatagt 3240

acttcgaaa gaaaagtagg ttccctcct ggtttttag ctgtcgcaa tattagcgt 3300
attccaagga gctgaacgcc tttatataaa tctgatggca cctgatgctt ttagttctga 3360
aaatattac actcggatca tgttttgat gacttaaca aagttttgat gaagagagca 3420
aaaaaaaaagc aggtggattt ggaacagttt cagggttttt tttgtttttt gttttttgtt 3480

ttgtttttt ttttttatt ttgtttttc tgttctctgt tagaaaagtc aggtgttctc 3540
 tgtcaggcta tctttatagt caatttttt tacgaactaa agtagtacct tttaatatgt 3600
 agtcaacgcc cctctgctcg gggttcagtt ttgggtctta accagctgtc atgttctcta 3660

 tgctgctgc cacttgaggc actgagtgcc ctagacagtc ccatcggtag tagccaggga 3720
 aacgaaagac gaactcaact cttgtctcta ataactcaact ctctgtatga aggatggcag 3780
 cattaagagt cctctgctc gggcattatt gggccagttc accctcttta aatcaaacc 3840
 gcagtggctc ccagttctcg tcccatcaga tttaaattgc taacagtatg gggggcacca 3900
 cgcactctgt ttgtccaca atgcgctttt ctctccaaa tcccgatttc tgctgtcata 3960
 gcctctatc aattttatt tattgtctgc cctccactta tacaatcgta gagagcaatg 4020
 ccatttgtca cttctgcaa cagttttttg agcctttatg gctgaatccc atttttctc 4080

 tctttcaaac tgtttgetcc attgetctc ccgcacggct gtecgtagc teateccatc 4140
 catctggggg cctctttcat ctctcaccct tcttgggtct tcgtggatct ctgcttacct 4200
 ctgtgggttt ttttttttt ttgtactta ttctctcac tggacttta gattacttcc 4260
 acagcgaag tgetgcctc cttttctgcc cgcagtgttc tgcgtacttt agatactact 4320
 cagtgtgac atttgatggc aaaagtggc tgcacttaaa tttctctttt taatagggtg 4380
 aactagagtt ggagtttttt tctctttttt ctctttctc tctctctctc tctctctctc 4440
 tctctctctc tctctctctc cctcctctc tcctcctc cctcctctc tctctctctc 4500

 tttttcttc tttcttctt tttttcttc tttcttctt tttttcttc tttcttttt 4560
 tgacaaatct cacaggtttt gagaattata aaagtgaca gttcacctga aatcacagg 4620
 tctggctctgt ttaaattgtt gagaaatct cgattaaaag tcttgggtct gtgtcctaat 4680
 aggtctctt tcaggacgtt gtatgcaata gagggtctga accatacttg agtttataaa 4740
 gctcaaaaac tgatgcacc actctgctat tatcgtgta gtaagagttc agctgtatat 4800
 cattgtctag gttatcttg tctacagtg ggtattcaaa tatggccacc agaggatag 4860
 tgtaaatata agcacctgta ttgctctgt gttgagaact ggagggaaaa caaaaaatgt 4920

 ctggcaacce ttgctttt taaccgtaat taattgacag tttatttaga gataagagtt 4980
 ttcaaaaate tcttaactgc cacaaccac agagggtctt gtttgccat cttcagtggc 5040
 tcacagatat gatccaagt aacttgaaag agatgagcag taccaggaa atgtcctgc 5100
 cttaactct ggctgtcctt aattatgact gtttaatgct gaattttcca tccgtctagt 5160
 gtttgagggt aaagaaaagc cttttttaa taagtattc tgtaaacgg catcggtagg 5220
 atcttctgt ttgctatcac ggtgaaaga gggaaacatt tcttattttt attaagcaga 5280

gcattattta cagaaagcca ttgttgagaa ttagttccca catcatataa atatccatta 5340
 accattctaa attgtaagag aactccagtg ttgctatgca caaggaactc tcctgggggc 5400
 ctttttttgc atagcaatta aaggtatgct atttgtcagt agccattttt tgcagtgatt 5460
 taaagaccaa agttgtttta cagctgtgtt acccttaaag gttttttttt tatgtattaa 5520
 atcaatttat cactgtttga agctttgaat acctgcaatc ttgccaaga tactttttta 5580
 tttaaaaaaa taactgtgta aatattacc tgtaatatta tatatactta ataaaacatt 5640
 ttaagcta 5648

<210> 6

<211> 331

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 6

Met Trp Pro Leu Ala Ala Ala Leu Leu Leu Gly Ser Cys Cys Cys Gly
 1 5 10 15
 Ser Ala Gln Leu Leu Phe Ser Asn Val Asn Ser Ile Glu Phe Thr Ser
 20 25 30
 Cys Asn Glu Thr Val Val Ile Pro Cys Ile Val Arg Asn Val Glu Ala
 35 40 45
 Gln Ser Thr Glu Glu Met Phe Val Lys Trp Lys Leu Asn Lys Ser Tyr
 50 55 60

 Ile Phe Ile Tyr Asp Gly Asn Lys Asn Ser Thr Thr Thr Asp Gln Asn
 65 70 75 80
 Phe Thr Ser Ala Lys Ile Ser Val Ser Asp Leu Ile Asn Gly Ile Ala
 85 90 95
 Ser Leu Lys Met Asp Lys Arg Asp Ala Met Val Gly Asn Tyr Thr Cys
 100 105 110
 Glu Val Thr Glu Leu Ser Arg Glu Gly Lys Thr Val Ile Glu Leu Lys
 115 120 125

 Asn Arg Thr Ala Phe Asn Thr Asp Gln Gly Ser Ala Cys Ser Tyr Glu
 130 135 140
 Glu Glu Lys Gly Gly Cys Lys Leu Val Ser Trp Phe Ser Pro Asn Glu

145 150 155 160
 Lys Ile Leu Ile Val Ile Phe Pro Ile Leu Ala Ile Leu Leu Phe Trp

 165 170 175
 Gly Lys Phe Gly Ile Leu Thr Leu Lys Tyr Lys Ser Ser His Thr Asn
 180 185 190

Lys Arg Ile Ile Leu Leu Leu Val Ala Gly Leu Val Leu Thr Val Ile
 195 200 205

Val Val Val Gly Ala Ile Leu Leu Ile Pro Gly Glu Lys Pro Val Lys
 210 215 220

Asn Ala Ser Gly Leu Gly Leu Ile Val Ile Ser Thr Gly Ile Leu Ile
 225 230 235 240

Leu Leu Gln Tyr Asn Val Phe Met Thr Ala Phe Gly Met Thr Ser Phe
 245 250 255

Thr Ile Ala Ile Leu Ile Thr Gln Val Leu Gly Tyr Val Leu Ala Leu
 260 265 270

Val Gly Leu Cys Leu Cys Ile Met Ala Cys Glu Pro Val His Gly Pro
 275 280 285

Leu Leu Ile Ser Gly Leu Gly Ile Ile Ala Leu Ala Glu Leu Leu Gly
 290 295 300

Leu Val Tyr Met Lys Phe Val Ala Ser Asn Gln Arg Thr Ile Gln Pro
 305 310 315 320

Pro Arg Lys Ala Val Glu Glu Pro Leu Asn Glu
 325 330

<210> 7

<211> 5618

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 7

gcctacaccg ggagagcagg gaggaggagt tggactgagg ttgggchgct ccgaggtcca 60
 gggcgagctt ggccagaggg agtagagagc agcggggctg cgcagggacg cgtgccgtga 120
 gtccggtga gcgtgtgtgt cccatgctcc cgtctttcag gccggcccag gacacgaagc 180
 cggaagagag ctggctggag ggacgggggc cgtgagcaga gaggcaacc cgcgcagccc 240

cggggacagg ctgattcttg gcgctctccg ccggagcctg cccagggctg ggtgtgaggc 300

 tggcgtcacg tcaacgagca gaggcggcca ggcggggcgg agtgcgcgtg cgcggggcgg 360
 cgagcacgcg cgcgcgcgca cccccgggca gcctgggcgg ccgctcctgc ctgtcactgc 420
 tgcggcgtg ctggtcggtc gtttccttg aaggcagcag cggaggcggc ggctgtctca 480
 gacacctgcg gcggcgacc cccggcggcg cggagatgtg gcccttggcg gcggcgtgt 540
 tgctgggctc ctgctgctgc ggttcagctc aactactgtt tagtaacgtc aactccatag 600
 agttcacttc atgcaatgaa actgtggca tccttgcac cgtccgtaac gtggaggcgc 660
 aaagcaccga agaatgttt gtgaagtgga agtgaacaa atcgtatatt ttcactatg 720

 atggaataa aaatagcact actacagatc aaaactttac cagtgcacaa atctcagtct 780
 cagacttaat caatggcatt gcctcttga aaatggataa gcgcgatgcc atggtgggaa 840
 actacacttg cgaagtgaca gagttatcca gagaaggcaa aacagttata gagctgaaaa 900
 accgcacggt ttcgtggttt tctccaaatg aaaagatcct cattgttatt tcccattt 960
 tggctatact cctgttctgg ggaaagtgtg gtattttaac actcaaatat aaatccagcc 1020
 atacgaataa gagaatcatt ctgctgctcg ttgccgggct ggtgctcaca gtcactgtgg 1080
 ttgttggagc catccttctc atcccaggag aaaagcccgt gaagaatgct tctggacttg 1140

 gcctcattgt aatctctacg gggatattaa tactacttca gtacaatgtg tttatgacag 1200
 cttttggaat gacctcttc accattgcca tattgatcac tcaagtgctg ggctacgtcc 1260
 ttgctttggt cgggctgtgt ctctgcatca tggcatgtga gccagtgcac ggccccctt 1320
 tgatttcagg ttggggatc atagctctag cagaactact tggattagtt tatatgaagt 1380
 ttgtcgttc caaccagagg actatccaac ctctaggaa agctgtagag gaaccctta 1440
 acgcatttaa agagtcaaaa ggaatgatga atgacgaata ggtgaaggga agtgacggac 1500
 tgtaacttgg aagtcaaaa tggaagaata cagttgtcta agcaccaggt cttcacgact 1560

 cacagctgga aggaacagac aacagtaact gacttccatc caggaaaaca tgtcacataa 1620
 atgattacta agtttatatt caaagcagct gtactttaca taataaaaaa aatatgatgt 1680
 gctgtgtaac caattggaat cccatcttc tattgttct actcaactag gggcaaacgt 1740
 ttcagggca acttcaaga atgatgctt ttagatccta gagtctctga aactgagtt 1800
 taaattgatt ccgagtgaga ctgcceaagc actaacctga gggtagtta cccagagata 1860
 cctatgaaaa acagtggat ccagcaagc ttagtaaac caggttgcca gcagctttgc 1920
 cacttccgt gctagctgaa taacaagact gccacttctg ggtcatagt atagagactg 1980

aagtagaaaa acgaatgtgg ttgggcaaat cccgtgtggc ccctctgtgt gctatgatat 2040
tgatggcact ggtgtcttca ttcttggggg ttgccatcat tcacacacac ccctttgaca 2100
tacagtgcac cccagttttg aatacatttt ttttgcaccc tgtcccgttc tgctactttg 2160
at ttgcgtta tgatataat atataatata aatacctttt ctccctcttta aacatggtec 2220
tgtgacacaa tagtcagttg cagaaaggag ccgacttat tcgcaaagca ctgtgctcaa 2280
actcttcaga aaaaaaggaa aaaaaaaaaa agctatagtt gtaacatatg tattccagac 2340
ctctggttta aaggcaaaag aaaaaaaatc tacagtgttt cttctcatgt tttctgatcg 2400

gaggcatgac aaagcaagac tgaatctga actgtgtctc ctgcatggca acacgtgtct 2460
ccgtcaggcc ctgcaaggc ccggggaggg ggttctacgc ctcttgtctc tttgttgcat 2520
gctgaacact catgccttc ctactgtatc ctgcctctg cagcctccct ctctctctc 2580
ctctctctct tctctctctt cctctctctc ctctctctcc tccaagtttg aaaggtcaaa 2640
caaaactacc acattcceta cccagttaga agaaaaccac cgtcctgaca gttgtgatcg 2700
catggagtac ttttagatta ttagcacctg tttttacctc gtttggggc gtgtttgat 2760
gtgcacatgt atgaagtcgg cacatgcacc ttctgtatgg gcagaggcgt ggcatctaca 2820

gaagagcaga tgccaacttt gtgcttttag tgaatacatt aaaaaaaaaa aaccaacggt 2880
ccttattgag tggaattcta tttgatgcaa atatttgagc tctttaagac tttaaaacta 2940
gataatgtgc caagctttta ggactgctca ccagtgcctt ctgaagaaac accagtactt 3000
tttctgttt gtgtaataaa ggcatatttg tatttgtgtt tgcatcacta atggttattt 3060
cttcttagtc cactgaatgt ttccatgtgc ctctcgtatg ccaaactttt tgtcatcttt 3120
catgtgggga ccaaatggtt tgtctgtggc aaacctaaac ctatgacctg ctgaggcctc 3180
tcagaaaact gaccacagta ccaagatagt acttcgcaa gaaaagtagg ttccctccct 3240

ggttttgtag ctgtcgccaa tattagcgta attccaagga gctgaacgcc tttatataaa 3300
tctgatggca ccgatgctt ttagttctga aaatatttac actcggatca tgttgttgat 3360
gacttaaaca aagttttgat gaagagagca aaaaaaagc aggtggattt ggaacagttt 3420
cagggttttt tttgtttttt gttttttgtt tttgtttttt tttttttatt tttgtttttc 3480
tgttctctgt tagaaaagtc aggtgttctc tgcaggcta tctttatagt caattttttt 3540
tacgaactaa agtagtacct tttaatatgt agtcaacgcc cctctgctcg gggttcagtt 3600
ttgggtctta accagctgtc atgttctcta tgetgcctgc cacttgaggc actgagtgcc 3660

ctagacagtc ccatcggigg tagccaggga aacgaaagac gaactcaact ctgtctccta 3720
ataatcaact ctctgtatga aggatggcag cattaagagt cctcctgcct gggcattatt 3780
gggccagttc accctcttta aatcaaacc gcagtggtc cagttctcg tcccatcaga 3840

tttaaattgc taacagtatg gggggcacca cgcattctgtt ttgtcccaca atgcgctttt 3900
 ctctcccaaa tcccgatctc tgctgtcata gcctctattc aatitttatt tattgtctgc 3960
 cctccactta tacaatcgta gagagcaatg ccattttgtca ctttctgcaa cagttttttg 4020
 agcctttatg gctgaatccc atttttcttc tctttcaaac tgtttgctcc attgctcctc 4080

 ccgcacggct gtccgtacag tcatcccatc catctggggg cctctttcat ctctcacctt 4140
 tcctgggtgt tegtggatct ctgcttacct ctgtgggttt ttttttttt ttttgactta 4200
 ttcttctcac tggactttaa gattacttcc acagcgaag tgctgcctcc ctttctgcc 4260
 cgcagtgctc tgcgtacttt agatactact cagtgtctgac atttgatggc aaaagttgcc 4320
 tgcacttaaa tttctctttt taataggggtg aactagagtt ggagtttttt tctctttttt 4380
 ctcttttctc tctctctctc tctctctctc tctctctctc tctctctctc cctccctccc 4440
 tccctcctc cctccctccc tctctctctc tttttcttc tttctttctt tctttctttc 4500

 tttctttctt tctttcttc tttcttttt tgacaaatct cacaggcttt gagaattata 4560
 aaagtgaca gttcacctga aaatcacagg tctggctctgt ttaaattgtt gagaaatctc 4620
 cgattaaaag tcttgtggct gtgtctctaat aggctctctt tcaggacgtt gtagtcaata 4680
 gagtggctga accatacttg agtttataaa gctcaaaaac tgatgcaccc actctgctat 4740
 tatcgtgtta gtaagagttc agctgtatat cattgtctag gtttatcttg tctacagtg 4800
 ggtattcaaa tatggccacc agaggatatg tgtaaatata agcacctgta tttgectgtt 4860
 gttgagaact ggagggaaaa caaaaatgt ctggcaaccc tttgcctttt taaccgtaat 4920

 taattgacag tttattttaga gataagagtt ttcaaaaatc tcttaactgc cacaaccac 4980
 agagggtctt gttttgcat cttcagtggc tcacagatat gatccaagtt aacttgaaag 5040
 agatgagcag taccaggaa attgtcctgc ctttaactct ggctgtcctt aattatgact 5100
 gtttaatgct gaattttcca tccgtctagt gtttgagggt aaagaaaagc cttttttaa 5160
 taagtatttc tglaaacgg catcgggtggg atcttctgtg ttgctatcac gggtgaaaga 5220
 gggaaacatt tcttattttt attaagcaga gcattattha cagaaagcca ttgttgagaa 5280
 ttagttccca catcatataa atatecatta accattetaa attgtaagag aactccagtg 5340

 ttgctatgca caaggaactc tcctgggggc ctttttttgc atagcaatta aaggtatgct 5400
 atttgtcagt agccattttt tgcagtgatt taaagaccaa agttgtttta cagctgtgtt 5460
 acccttaaag gttttttttt tatgtattaa atcaatttat cactgtttga agctttgaat 5520
 acctgcaatc tttgccaaga tactttttta tttaaaaaaa taactgtgta aatattacce 5580
 tgtaatatta tatatactta ataaaacatt ttaagcta 5618

<210> 8

<211> 321

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 8

Met Trp Pro Leu Ala Ala Ala Leu Leu Leu Gly Ser Cys Cys Cys Gly

1 5 10 15
Ser Ala Gln Leu Leu Phe Ser Asn Val Asn Ser Ile Glu Phe Thr Ser

 20 25 30
Cys Asn Glu Thr Val Val Ile Pro Cys Ile Val Arg Asn Val Glu Ala

 35 40 45
Gln Ser Thr Glu Glu Met Phe Val Lys Trp Lys Leu Asn Lys Ser Tyr

 50 55 60
Ile Phe Ile Tyr Asp Gly Asn Lys Asn Ser Thr Thr Thr Asp Gln Asn

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

 85 90 95
Ser Leu Lys Met Asp Lys Arg Asp Ala Met Val Gly Asn Tyr Thr Cys

 100 105 110
Glu Val Thr Glu Leu Ser Arg Glu Gly Lys Thr Val Ile Glu Leu Lys

 115 120 125
Asn Arg Thr Val Ser Trp Phe Ser Pro Asn Glu Lys Ile Leu Ile Val

 130 135 140
Ile Phe Pro Ile Leu Ala Ile Leu Leu Phe Trp Gly Lys Phe Gly Ile

145 150 155 160
Leu Thr Leu Lys Tyr Lys Ser Ser His Thr Asn Lys Arg Ile Ile Leu

 165 170 175
Leu Leu Val Ala Gly Leu Val Leu Thr Val Ile Val Val Val Gly Ala

 180 185 190
Ile Leu Leu Ile Pro Gly Glu Lys Pro Val Lys Asn Ala Ser Gly Leu

 195 200 205
Gly Leu Ile Val Ile Ser Thr Gly Ile Leu Ile Leu Leu Gln Tyr Asn

210 215 220
 Val Phe Met Thr Ala Phe Gly Met Thr Ser Phe Thr Ile Ala Ile Leu
 225 230 235 240
 Ile Thr Gln Val Leu Gly Tyr Val Leu Ala Leu Val Gly Leu Cys Leu
 245 250 255
 Cys Ile Met Ala Cys Glu Pro Val His Gly Pro Leu Leu Ile Ser Gly
 260 265 270
 Leu Gly Ile Ile Ala Leu Ala Glu Leu Leu Gly Leu Val Tyr Met Lys
 275 280 285
 Phe Val Ala Ser Asn Gln Arg Thr Ile Gln Pro Pro Arg Lys Ala Val
 290 295 300
 Glu Glu Pro Leu Asn Ala Phe Lys Glu Ser Lys Gly Met Met Asn Asp
 305 310 315 320
 Glu

<210> 9

<211> 5021

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 9

agtgggagcg cgctgcgcg cggccgtgca gcctgggcag tgggtcctgc ctgtgacgcg 60
 cggcggcgggt cggctcctgcc tgtaacggcg gcggcggctg ctgctccgga cacctgcggc 120
 ggcggcggcg accccgcggc gggcgcggag atgtggcccc tggtagcggc gctgttgctg 180
 ggctcggcgt gctgcggatc agctcagcta ctatttaata aaacaaaatc ttagaattc 240
 acgttttgta atgacctgt cgtcattcca tgctttgtta ctaatatgga ggcacaaaac 300
 actactgaag tatacgtaaa gtggaaattt aaaggaagag atatttacac ctttgatgga 360
 gctctaaaca agtccactgt cccactgac ttagtagtg caaaaattga agtctcaaa 420
 ttactaaaag gagatgctc tttgaagatg gataagagtg atgctgtctc acacacagga 480
 aactacactt gtgaagtaac agaattaacc agagaagggtg aaacgatcat cgagctaaaa 540
 tatcgtgttg tttcatggtt ttctccaaat gaaaatattc ttattgttat tttccaatt 600
 tttgctatac tcctgttctg gggacagttt ggtattaaaa cacttaata tagatccggt 660
 ggtatggatg agaaaacaat tgctttactt gttgctggac tagtgatcac tgcattgtc 720

atgtttggag ccattctttt cgtcccaggt gaatattcat taaagaatgc tactggcctt 780
 ggtttaattg tgacttctac agggatatta atattacttc actactatgt gtttagtaca 840

 gcgattggat taacctcctt cgtcattgcc atattggtta ttcaggtgat agcctatatac 900
 ctcgctgtgg ttggactgag tctctgtatt gcggcgtgta taccaatgca tggccctctt 960
 ctgatttcag gtttgagat cttagctcta gcacaattac ttggactagt ttatatgaaa 1020
 tttgtggaat aactgaagtg aagtgatgga ctccgatttg gagagtagta agacgtgaaa 1080
 ggaatacact tigttttaag caccatggcc ttgatgattc actgttgggg agaagaaaca 1140
 agaaaagtaa ctggttgca cctatgagac ccttacgtga ttgttagtta agtttttatt 1200
 caaagcagct gtaatttagt taataaaata attatgatct atgttgtttg cccaattgag 1260

 atccagtttt ttgttgttat ttttaacaa ttaggggcaa tagtagaatg gacaatttcc 1320
 aagaatgatg cctttcaggt cctagggcct ctggcctcta ggtaaccagt ttaaattggt 1380
 tcagggtgat aactacttag cactgccctg gtgattacc agagatatct atgaaaacca 1440
 gtggcttcca tcaaaccttt gccaaactcag gttcacagca gctttgggca gttatggcag 1500
 tatggcatta gctgagaggt gtctgccact tctgggtcaa tggaaataata aattaagtac 1560
 aggcaggaat ttggttggga gcatcttga tgatctcctg atgatgtgat attgatggag 1620
 atagtgttcc tcattcttgg gggttgceat tcccacattc ccccttcaac aaacagtga 1680

 acaggtcctt ccagattta gggtaactttt attgatggat atgttttctt tttattcaca 1740
 taacctcttg aaacctgtc ttgtctctct gttacttct tctgctgtac aagatgtagc 1800
 accttttctc ctctttgaac atggcttagt gacacgtag caccagttgc aggaaggagc 1860
 cagacttgtt ctgagagcac tgtgttcaca cttttcagca aaaatagcta tggttgtaac 1920
 atatgtatc cttctctg atttgaagc aaaaatctac agtgtttctt cacttctttt 1980
 ctgatctggg gcatgaaaa agcaagattg aaatttgaac tatgagtctc ctgcatggca 2040
 acaaatgtg tgcaccatc agccaacag gccagccctt gaatgggat ttattactgt 2100

 tgtatctatg ttgcatgata aacattcacc accttctctc ttagtctctg cctcgtactc 2160
 ccttcccct atgattgaaa agtaaaaa acccacattt cctatcctgg ttagaagaaa 2220
 attaagtgc tgacagttgt gatgcctgg agtactttta gacttttagc attcgttttt 2280
 tactgtttg tggatgtgtg tttgtatgtg catacgtatg agataggcac atgcatcttc 2340
 tgtatggaca aagggtgggt acctacagga gagcaaaggt taattttgtg cttttagtaa 2400
 aaacatttaa atacaaagt ctttattggg tggaaatata tttgatgcaa atatttgatc 2460

acttaaaact tttaaaactt ctaggtaatt tgccacgctt tttgactgct caccaatacc 2520

ctgtaaaaat acgtaattct tctgttttgi gtaataagat attcatatth gtagtgtcat 2580

taataatagt tatttcttag tccatcagat gttcccgtgt gcctctttta tgccaaattg 2640

attgtcatal ttcattgttg gaccaagtag tttgcccattg gcaaacctaa atttatgacc 2700

tgctgaggcc tctcagaaaa ctgagcatal tagcaagaca gctcttcttg aaaaaaaaa 2760

tatgtataca caaatatata cgtatatcta tatatacgtat gtatatata cacatgtata 2820

ttcttcttg attgtgtagc tgtccaaaat aataacatal atagaggag ctgtattcct 2880

ttatacaaat ctgatggctc ctgcagcact ttttcttct gaaaatattt acattttgct 2940

aacctagttt gtiactttaa aaatcagttt tgatgaaagg agggaaaagc agatggactt 3000

gaaaaagatc caagctccta ttagaaaagg tatgaaaatc tttatagtaa aatthtttat 3060

aaactaaagt tgtacctttt aatattgtagt aaactctcat ttatttgggg ttcgctcttg 3120

gatctcatcc atccattgtg ttctctthaa tgctgcctgc cttttgaggc attcactgcc 3180

ctagacaatg ccaccagaga tagtggggga aatgccagat gaaaccaact ctgtctca 3240

ctagtgtca gcttctctgg ataagtgacc acagaagcag gagtctctct gettgggcat 3300

cattgggcca gttcttctc tttaaatcag atttgaatg gctcccaat tccatcatal 3360

cacatttaa ttcagacag tgthttgcac atcatgtatc tgthttgtcc cataaatgc 3420

thtttactcc ctgatcccag thttctgtgt tgactcttcc attcagtttt atttatgtg 3480

tgthtca gtagacatc ttgtctthtt ctgcaacaac cthttcagct actthtgcca 3540

aattctatth gtcttctct tcaaaacatt ctctthtgca gthctcttct atctgtgtag 3600

ctgtctthtt gtctctaac ttaccattcc tatagtactt tatgcatctc tgcttagttc 3660

tattagthtt ttggccttg tcttctctt gattthaaaa thcttctat agctagagct 3720

thtttthtt thattctctc thctgtcagt gthttgcata catcagaagc taggtacata 3780

agttaaatga ttgagagttg gctgtatth gatttatcac thtttaatag ggtgagcttg 3840

agagthttct thcttctgt thttthtttt thttthtttt thttthtttt thttthtttt 3900

thttgactaa thcacatgc tctaaaaacc thcaaagggtg attatthttc thctggaaac 3960

thcaggthca thctgtthaa atccctaaga atgtcagaat thaaataaca gggctatccc 4020

gthattggaa atatthctth thctaggatg ctatagthca thtagtaagt gaccaccaa 4080

thgttatttg cactaacaaa gthcaaaaca cgataagthtt actctccat thcagthata 4140

aaaatthage thaatcaac thcttaggtt thctthgtct thaaatgggt atthaaaaat 4200

ggggatctgt ggigtatgta tggaaacaca tactccttaa tttacctgtt gttggaaact 4260
 ggagaaatga ttgtcgggca accgtttatt ttttattgta ttttatttgg ttgagggatt 4320
 tttttataaa cagttttact tgtgtcatat tttaaaatta ctaactgcca tcacctgctg 4380
 gggtcctttg ttaggtcatt ttcagtgact aataggata atccaggtaa ctttgaagag 4440
 atgagcagtg agtgaccagg cagtttttct gcctttagct ttgacagttc ttaattaaga 4500
 tcattgaaga ccagctttct cataaatttc tctttttgaa aaaaagaaag cttttgtact 4560
 aagctcctct gtaagacaac atcttaaatc ttaaaagtgt tgttatcatg actggtgaga 4620

 gaagaaaaca ttttgTTTT attaaatgga gcattattta caaaaagcca ttgttgagaa 4680
 ttagatccca catcgataa atatctatta accattctaa ataaagagaa ctccagtgtt 4740
 gctatgtgca agatcctctc ttggagcttt ttgcatagc aattaaaggt gtgctatttg 4800
 tcagtagcca tttttttgca gtgattttaa gaccaaagtt gttttacagc tgtgttaccg 4860
 ttaaaggttt ttttttttat atgtattaaa tcaatttatt actgtttaaa gctttgaata 4920
 tctgcaatct ttgccaaggt acttttttat ttaaaaaaaaa acataacttt gtaaatatta 4980
 ccctgtaata ttatatatac ttaataaaac attttaagct a 5021

<210> 10

<211> 293

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

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

 50 55 60
 Ile Tyr Thr Phe Asp Gly Ala Leu Asn Lys Ser Thr Val Pro Thr Asp
 65 70 75 80
 Phe Ser Ser Ala Lys Ile Glu Val Ser Gln Leu Leu Lys Gly Asp Ala
 85 90 95
 Ser Leu Lys Met Asp Lys Ser Asp Ala Val Ser His Thr Gly Asn Tyr

100 105 110
 Thr Cys Glu Val Thr Glu Leu Thr Arg Glu Gly Glu Thr Ile Ile Glu

115 120 125
 Leu Lys Tyr Arg Val Val Ser Trp Phe Ser Pro Asn Glu Asn Ile Leu

130 135 140
 Ile Val Ile Phe Pro Ile Phe Ala Ile Leu Leu Phe Trp Gly Gln Phe

145 150 155 160
 Gly Ile Lys Thr Leu Lys Tyr Arg Ser Gly Gly Met Asp Glu Lys Thr

165 170 175
 Ile Ala Leu Leu Val Ala Gly Leu Val Ile Thr Val Ile Val Ile Val

180 185 190
 Gly Ala Ile Leu Phe Val Pro Gly Glu Tyr Ser Leu Lys Asn Ala Thr

195 200 205
 Gly Leu Gly Leu Ile Val Thr Ser Thr Gly Ile Leu Ile Leu Leu His

210 215 220
 Tyr Tyr Val Phe Ser Thr Ala Ile Gly Leu Thr Ser Phe Val Ile Ala

225 230 235 240
 Ile Leu Val Ile Gln Val Ile Ala Tyr Ile Leu Ala Val Val Gly Leu

245 250 255
 Ser Leu Cys Ile Ala Ala Cys Ile Pro Met His Gly Pro Leu Leu Ile

260 265 270
 Ser Gly Leu Ser Ile Leu Ala Leu Ala Gln Leu Leu Gly Leu Val Tyr

275 280 285
 Met Lys Phe Val Glu

290

<210> 11

<211> 5288

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 11

ggggagcagg cgggggagcg ggcgggaagc agtgggagcg cgcggtgcgcg cggccgtgca

60

gcctgggcag tgggtcctgc ctgtgacgcg cggcggcggg cggtcctgcc tgtaacggcg 120
 gcggcggctg ctgctccaga cacctgcggc ggcggcggcg accccgcggc gggcgcggag 180
 atgtggcccc tggtagcggc gctgttgctg ggctcggcgt gctgcggatc agctcagcta 240
 ctatttaata aaacaaaatc tgtagaattc acgttttgta atgacactgt cgtcattcca 300
 tgctttgta ctaatatgga ggcacaaaac actactgaag tatacgtaaa gtggaaatth 360
 aaaggaagag atatttacac ctttgatgga gctctaaaca agtccactgt ccccactgac 420
 tttagtagtg caaaaattga agtctcacia ttactaaaag gagatgcctc tttgaagatg 480

gataagagtg atgctgtctc acacacagga aactacactt gtgaagtaac agaattaacc 540
 agagaagggtg aaacgatcat cgagctaaaa taccgtgttg tttcatggtt tctccaaat 600
 gaaaatattc ttattgttat tttcccaatt tttgctatac tcctgttctg gggacagttt 660
 ggtattaaaa cacttaata tagatccggg ggtatggatg agaaaacaat tgctttactt 720
 gttgctggac tagtgatcac tgtcattgic attgttggag ccattctttt cgtcccagggt 780
 gaatattcat taaagaatgc tactggcctt ggtttaattg tgacttctac agggatatta 840
 atattacttc actactatgt gtttagtaca gcgattggat taacctcctt cgtcattgcc 900

atattggta ttcaggatgat agcctatac ctgctgtgg ttggactgag tctctgtatt 960
 gcggcgtgta taccaatgca tggcctcctt ctgattcag gtttgagtat cttagctcta 1020
 gcacaattac ttggactagt ttatatgaaa tttgtggcctt ccaatcagaa gactatacaa 1080
 cctcctagga ataactgaag tgaagtgatg gactccgatt tggagagtag taagacgtga 1140
 aaggaataca cttgtgttta agcaccatgg ccttgatgat tcaactgttg ggagaagaaa 1200
 caagaaaagt aactggttgt cacctatgag acccttacgt gattgttagt taagttttta 1260
 ttcaaagcag ctgtaattta gttataaaaa taattatgat ctatgttgtt tgccaattg 1320

agatccagtt tttgttgtt attttaatc aattaggggc aatagtagaa tggacaattt 1380
 ccaagaatga tgctttcag gtcctagggc cctcggcctc taggtaacca gtttaattg 1440
 gttcagggtg ataactactt agcactgccc tggtgattac ccagagatat ctatgaaaac 1500
 cagtggcttc catcaaacct ttgccaactc aggttcacag cagctttggg cagttatggc 1560
 agtatggcat tagctgagag gtgtctgcca cttctgggtc aatggaataa taaattaagt 1620
 acaggcagga atttggttg gagcatcttg tatgatctcc gtatgatgtg atattgatgg 1680
 agatagtggg ccicattctt gggggttgc attcccacat tccccctca acaaacagtg 1740

taacaggtcc ttcccagatt tagggtactt ttattgatgg atatgtttc cttttattca 1800
 cataaccct tgaaacctg tcttgcctc ctgttacttg cttctgctgt acaagatgta 1860
 gcacctttc tcctcttga acatggtctc gtgacacggg agcaccagtt gcaggaagga 1920

gccagacttg ttctcagagc actgtgttca cacttttcag caaaaatagc tatggttgta 1980
 acatatgtat tccttctc tgatttgaag gcaaaaatct acagtgttc ttcacttctt 2040
 ttctgatctg gggcatgaaa aaagcaagat tgaatttga actatgagtc tcctgcatgg 2100
 caacaaaatg tigtcacca tcaggccaac aggccagccc ttgaatgggg atttattact 2160

gttgatctta tgttgcata taaacattca tcaccttct cctgtagtcc tgectcttac 2220
 tccccctccc ctatgattga aaagtaaaca aaaccacat ttcctatcct ggttagaaga 2280
 aaattaatgt tcigacagtt gtgatgcct ggagtacttt tagactttta gcattcgttt 2340
 ttacctgtt tgtggatgtg tgtttgtatg tgcatacgtg tgagatagcc acatgcatct 2400
 tctgtatgga caaagggtgg gtacctacag gagagcaaag gttaattttg tgcttttagt 2460
 aaaaacattt aaatacaag ttctttattg ggtggaatta tatttgatgc aaatatttga 2520
 tcacttaaaa cttttaaac ttctaggtaa ttgccaagc tttttgactg ctaccaata 2580

cctgtaaaa atacgtaatt cttctgttt gtgtaataag atattcatat ttgtagttgc 2640
 attaataata gttatttctt agtccatcag atgttcccgt tgcctcttt tatgccaat 2700
 tgattgtcat atttcatggt gggaccaagt agtttgecca tggcaaacct aaatttatga 2760
 cctgctgagg cctctcagaa aactgagcat actagcaaga cagctcttct tgaaaaaaaa 2820
 aatatgtata cacaaatata tacgtatata tatatatagc tatgtatata cacacatgta 2880
 tatttcttct tgattgtgta gctgtccaaa ataataacat atagagagg agctgtattc 2940
 cttatacaa atctgatggc tctgcagca ctttttctt ctgaaaatat ttacattttg 3000

ctaacctagt ttgttacttt aaaaatcagt ttgatgaaa ggagggaaaa gcagatggac 3060
 ttgaaaaaga tccaagctcc tattagaaaa ggtatgaaaa tctttatagt aaaatttttt 3120
 ataaactaaa gttgtacctt ttaatatgta gtaaactctc atttatttgg ggttcgctct 3180
 tggatctcat ccattcatg tgttctcttt aatgctgcct gccttttgag gcattcactg 3240
 ccctagacaa tgcaccaga gatagtgggg gaaatgccag atgaaaccaa ctcttgctct 3300
 cactagtgt cagcttctct ggataagtga ccacagaagc aggagtctc ctgcttgggc 3360
 atcattgggc cagtctctc tctttaaatc agatttgtaa tggtcccaa attccatcac 3420

atcacattta aattgcagac agtgttttgc acatcatgta tctgttttgt cccataatat 3480
 gcttttact cctgateccc agtttctgct gttgactctt ccattcagtt ttattttattg 3540
 tgtgttctca cagtgcacc atttgtcctt ttctgcaaca accttccag ctacttttgc 3600
 caaattctat ttgtctctc cttcaaaaca ttctctttg cagttctctc tcattctgtg 3660
 agctgctctt ttgtctctta acttaccatt cctatagtac tttatgcatc tetgcttagt 3720
 tctattagtt ttttggcctt gctcttctcc ttgattttaa aattccttct atagctagag 3780

ctttctttc tttcattctc tcttctgca gtgttttgca tacatcagaa gctaggtaca 3840

taagttaa at gattgagagt tggctgtatt tagatttata actttttaat agggtagct 3900

tgagagtttt ctttctttct gttttttttt tttgtttttt tttttttttt tttttttttt 3960

ttttttgact aatttcacat gctctaaaaa ctttcaaagg tgattatttt tctcctggaa 4020

actccaggtc cattctgttt aaatccctaa gaatgtcaga attaaaataa cagggtatc 4080

ccgtaattgg aaatatttct ttttcagga tgctatagtc aatttagtaa gtgaccacca 4140

aattgttatt tgcactaaca aagctcaaaa cagcataagt ttactcctcc atctcagtaa 4200

taaaaattaa gctgtaatca accttctagg tttctcttgt cttaaaatgg gtattcaaaa 4260

atggggatct gtgggtgatg tatggaaaca catactcctt aatttacctg ttgttgaaa 4320

ctggagaaat gattgtcggg caaccgttta ttttttattg tattttattt ggttgaggga 4380

tttttttata aacagtttta cttgtgtcat attttaaaat tactaactgc catcacctgc 4440

tggggtcctt tgttaggtca ttttcagtga ctaataggga taatccaggt aactttgaag 4500

agatgagcag tgagtacca ggcagttttt ctgcttttag ctttgacagt tcttaattaa 4560

gatcattgaa gaccagcttt ctcataaatt tctctttttg aaaaaaagaa agcatttgta 4620

ctaagctcct ctgtaagaca acatcttaa tcttaaaagt gttgttatca tgactggtga 4680

gagaagaaaa cattttgttt ttattaaatg gagcattatt taaaaaagc cattgttgag 4740

aattagatcc cacatcgtat aaatatctat taaccattct aaataaagag aactccagtg 4800

ttgctatgtg caagatcctc tcttgagct tttttgcata gcaattaaag gtgtgctatt 4860

tgctcagtagc catttttttg cagtgatttg aagaccaaag ttgttttaca gctgtgttac 4920

cgttaaaggt tttttttttt atatgtatta aatcaattta tcaactgtta aagctttgaa 4980

tatctgcaat ctttgccaag gtactttttt atttaaaaaa aacataact ttgtaaatat 5040

tacctgtaa tattatatat acttaataaa acattttaag ctattttgtt gggctatttc 5100

tattgctgct acagcagacc acaagcacat ttctgaaaaa ttttaattat taatgtattt 5160

ttaagtgtct tatattctag gtaacaatgt aaagaatgat ttaaaatatt aattatgaat 5220

tttttgagta taatacccaa taagctttta attagagcag agttttaatt aaaagtttta 5280

aatcagtc 5288

<210> 12

<211> 305

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

Met Trp Pro Leu Val Ala Ala Leu Leu Leu Gly Ser Ala Cys Cys Gly
 1 5 10 15
 Ser Ala Gln Leu Leu Phe Asn Lys Thr Lys Ser Val Glu Phe Thr Phe
 20 25 30
 Cys Asn Asp Thr Val Val Ile Pro Cys Phe Val Thr Asn Met Glu Ala
 35 40 45
 Gln Asn Thr Thr Glu Val Tyr Val Lys Trp Lys Phe Lys Gly Arg Asp
 50 55 60
 Ile Tyr Thr Phe Asp Gly Ala Leu Asn Lys Ser Thr Val Pro Thr Asp
 65 70 75 80
 Phe Ser Ser Ala Lys Ile Glu Val Ser Gln Leu Leu Lys Gly Asp Ala
 85 90 95
 Ser Leu Lys Met Asp Lys Ser Asp Ala Val Ser His Thr Gly Asn Tyr
 100 105 110
 Thr Cys Glu Val Thr Glu Leu Thr Arg Glu Gly Glu Thr Ile Ile Glu
 115 120 125
 Leu Lys Tyr Arg Val Val Ser Trp Phe Ser Pro Asn Glu Asn Ile Leu
 130 135 140
 Ile Val Ile Phe Pro Ile Phe Ala Ile Leu Leu Phe Trp Gly Gln Phe
 145 150 155 160
 Gly Ile Lys Thr Leu Lys Tyr Arg Ser Gly Gly Met Asp Glu Lys Thr
 165 170 175
 Ile Ala Leu Leu Val Ala Gly Leu Val Ile Thr Val Ile Val Ile Val
 180 185 190
 Gly Ala Ile Leu Phe Val Pro Gly Glu Tyr Ser Leu Lys Asn Ala Thr
 195 200 205
 Gly Leu Gly Leu Ile Val Thr Ser Thr Gly Ile Leu Ile Leu Leu His
 210 215 220
 Tyr Tyr Val Phe Ser Thr Ala Ile Gly Leu Thr Ser Phe Val Ile Ala
 225 230 235 240
 Ile Leu Val Ile Gln Val Ile Ala Tyr Ile Leu Ala Val Val Gly Leu

tttgtggctt ccaatcagaa gactatacaa cctcctagga aagctgtaga ggaaccctt 1080

 aatgaataac tgaagtgaag tgatggactc cgatttggag agtagtaaga cgtgaaagga 1140
 atacacttgt gtttaagcac catggccttg atgattcact gttggggaga agaaacaaga 1200
 aaagtaactg gttgtcacct atgagaccct tacgtgattg ttagttaagt ttttattcaa 1260
 agcagctgta atttagttaa taaaataatt atgatctatg ttgtttgcc aattgagatc 1320
 cagttttttg ttgtattttt taatcaatta ggggcaatag tagaatggac aattccaag 1380
 aatgatgcct ttcaggtcct agggcctctg gcctctaggt aaccagtta aattggttca 1440
 gggtgataac tacttagcac tgcctggtg attaccaga gatatctatg aaaaccagtg 1500

 gcttccatca aacctttgcc aactcagggt cacagcagct ttgggcagtt atggcagtat 1560
 ggcattagct gagagggtgc tgccacttct gggccaatgg aataataaat taagtacagg 1620
 caggaatttg gttgggagca tcttgtatga tctccgatg atgtgatatt gatggagata 1680
 gtggctctca ttcttggggg ttgccattcc cacattcccc ctcaacaaa cagtgtaa 1740
 ggtccttccc agatttaggg tacttttatt gatggatag ttttctttt attcacataa 1800
 cccctgaaa cctgtcttg tctctctgtt acttgcttct gctgtacaag atgtagcacc 1860
 ttttctctc ttgaacatg gtctagtac acggtagcac cagttgcagg aaggagccag 1920

 acttgttctc agagcactgt gttcacactt ttcagcaaaa atagctatgg ttgtaacata 1980
 tgtattccct tctctgatt tgaaggcaaa aatctacagt gtttcttcac ttcttttctg 2040
 atctgggca tgaaaaaagc aagattgaaa ttgaaactat gagtctctg catggcaaca 2100
 aaatgtgtgt caccatcagg ccaacaggcc agcccttga tggggattta ttactgttgt 2160
 atctatgttg catgataaac attcatcacc ttctctctgt agtctgcct cgtactcccc 2220
 ttcccctatg attgaaaagt aaacaaaacc cacatttctt atcttggta gaagaaaatt 2280
 aatgttctga cagttgtgat cgcctggagt acttttagac ttttagcatt cgttttttac 2340

 ctgtttgtgg atgtgtgttt gtatgtgcat acgtatgaga taggcacatg catcttctgt 2400
 atggacaag gtgggttacc tacaggagag caaaggttaa ttttgtgctt ttagtaaaaa 2460
 catttaata caaagtctct tattgggtgg aattatattt gatgcaaata tttgatcact 2520
 taaaactttt aaaacttcta ggtaatttgc cacgcttttt gactgctcac caatacctg 2580
 taaaaatag taattcttcc tgtttgtgta ataagatatt catatttga gttgcattaa 2640
 taatagttat ttcttagtcc atcagatgtt cccgttgcc tcttttatgc caaattgatt 2700
 gcatatttc atgttgggac caagtagttt gcccatggca aacctaaatt tatgacctgc 2760

tgaggcctct cagaaaactg agcatactag caagacagct cttcttgaaa aaaaaaatat 2820
 gtatacacia atatatactg atatctatat atactgtatgt atatacacac atgtatattc 2880
 ttcccttgatt gtgtagctgt ccaaaaataat aacatatata gagggagctg tattccttta 2940
 tacaatctg atggctcctg cagcactttt tccttctgaa aatatttaca ttttgctaac 3000
 ctagtttgtt actttaaaaa tcagttttga tgaaggagg gaaaagcaga tggacttgaa 3060
 aaagatccaa gctcctatta gaaaaggat gaaaatcttt atagtaaaat tttttataaa 3120
 ctaaagttgt accttttaat atgtagtaaa ctctcattta tttggggttc gctcttggat 3180

 ctcatccatc cattgtgttc tctttaatgc tgctgcctt ttgaggcatt cactgcctca 3240
 gacaatgcca ccagagatag tgggggaaat gccagatgaa accaactctt gctctcacta 3300
 gttgtcagct tccttgata agtgaccaca gaagcaggag tcctcctgct tgggcatcat 3360
 tgggccagt ccttctcttt aaatcagatt tgaatggct cccaaattcc atcacatcac 3420
 atttaaatg cagacagtgt tttgcacatc atgtatctgt tttgtcccat aatatgcttt 3480
 ttactccctg atcccagttt ctgctgttga ctcttcatt cagttttatt tattgtgtgt 3540
 tctcacagt acaccattg tccttttctg caacaacctt tccagctact tttgccaat 3600

 tctatttgc tctccttca aaacatttc ctttgagtt cctcttcac tgtgtagctg 3660
 ctcttttgc tcttaactta ccattcctat agtactttat gcactctgc ttagttctat 3720
 tagttttttg gccttgctt tctccttgat tttaaaatc cttctatagc tagagctttt 3780
 ctttcttca tctctcttc ctgcagtgt ttgcatacat cagaagctag gtacataagt 3840
 taaatgattg agagtggct gtatttagat ttatcacttt ttaatagggt gagcttgaga 3900
 gtttcttct tttctgttt tttttttgt ttttttttt ttttttttt ttttttttt 3960
 tgactaattt cacatgctt aaaaacctt aaagtgatt attttctcc tggaaactcc 4020

 aggtccatc tgtttaaact cctaagaatg tcagaattaa aataacaggg ctatcccgta 4080
 attgaaata tttcttttt caggatgcta tagtcaattt agtaagtac caccaaattg 4140
 ttatttgcac taacaaagt caaacacga taagtctact cctccatctc agtaataaaa 4200
 attagctgt aatcaacctt ctaggtttct ctgtcttaa aatgggtatt caaaaatggg 4260
 gatctgtgtt gtatgtatgg aaacacatac tccttaattt acctgttgtt ggaaactgga 4320
 gaaatgattg tcgggaacc gtttttttt tattgtattt ttttgggtg agggattttt 4380
 ttataaacag ttttactgt gtcataattt aaaattacta actgcatca cctgctgggg 4440

 tcctttgtta ggtcatttc agtgactaat agggataatc caggtaactt tgaagagatg 4500
 agcagtgagt gaccagcag ttttctgcc tttagctttg acagtctta attagatca 4560
 ttgaagacca gcttctcat aaatttctt tttgaaaaa aagaagcat ttgtactaag 4620

ctcctctgta agacaacatc ttaaacttta aaagtgtgt tatcatgact ggtgagagaa 4680
 gaaaacattt tgtttttatt aaatggagca ttatttacia aaagccattg ttgagaatta 4740
 gatcccatc cgtataaata tctattaacc attctaata aagagaactc cagtgttgct 4800
 atgtgcaaga tcctctcttg gagctttttt gcatagcaat taaaggtgtg ctatttgtca 4860

gtagccattt ttttgcagtg atttgaagac caaagttgtt ttacagctgt gttaccgtta 4920
 aaggtttttt tttttatag tatttaaatca atttatcact gtttaaagct ttgaatatct 4980
 gcaatctttg ccaaggtact tttttattta aaaaaaaca taactttgta aatattaccc 5040
 tgtaatatta tatatactta ataaaacatt ttaagcta 5078

<210> 14

<211> 312

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

Met Trp Pro Leu Val Ala Ala Leu Leu Leu Gly Ser Ala Cys Cys Gly

1 5 10 15

Ser Ala Gln Leu Leu Phe Asn Lys Thr Lys Ser Val Glu Phe Thr Phe

20 25 30

Cys Asn Asp Thr Val Val Ile Pro Cys Phe Val Thr Asn Met Glu Ala

35 40 45

Gln Asn Thr Thr Glu Val Tyr Val Lys Trp Lys Phe Lys Gly Arg Asp

50 55 60

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

65 70 75 80

Phe Ser Ser Ala Lys Ile Glu Val Ser Gln Leu Leu Lys Gly Asp Ala

85 90 95

Ser Leu Lys Met Asp Lys Ser Asp Ala Val Ser His Thr Gly Asn Tyr

100 105 110

Thr Cys Glu Val Thr Glu Leu Thr Arg Glu Gly Glu Thr Ile Ile Glu

115 120 125

Leu Lys Tyr Arg Val Val Ser Trp Phe Ser Pro Asn Glu Asn Ile Leu

130 135 140

Ile Val Ile Phe Pro Ile Phe Ala Ile Leu Leu Phe Trp Gly Gln Phe

145 150 155 160

Gly Ile Lys Thr Leu Lys Tyr Arg Ser Gly Gly Met Asp Glu Lys Thr

165 170 175

Ile Ala Leu Leu Val Ala Gly Leu Val Ile Thr Val Ile Val Ile Val

180 185 190

Gly Ala Ile Leu Phe Val Pro Gly Glu Tyr Ser Leu Lys Asn Ala Thr

195 200 205

Gly Leu Gly Leu Ile Val Thr Ser Thr Gly Ile Leu Ile Leu Leu His

210 215 220

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

225 230 235 240

Ile Leu Val Ile Gln Val Ile Ala Tyr Ile Leu Ala Val Val Gly Leu

245 250 255

Ser Leu Cys Ile Ala Ala Cys Ile Pro Met His Gly Pro Leu Leu Ile

260 265 270

Ser Gly Leu Ser Ile Leu Ala Leu Ala Gln Leu Leu Gly Leu Val Tyr

275 280 285

Met Lys Phe Val Ala Ser Asn Gln Lys Thr Ile Gln Pro Pro Arg Lys

290 295 300

Ala Val Glu Glu Pro Leu Asn Glu

305 310

<210> 15

<211> 5346

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 15

ggggagcagg cgggggagcg ggcgggaagc agtgggagcg cgcgtgcgcg cggccgtgca 60

gcctgggcag tgggtcctgc ctgtgacgcg cggcggcggt cggtcctgcc tgtaacggcg 120

gcggcggctg ctgctccaga cacctgcggc ggcgggcgcg accccgcggc gggcgcggag 180

atgtggcccc tggtagcggc gctgttgctg ggctcggcgt gctgcggatc agctcagcta 240

ctatttaata aaacaaaatc tgtagaattc acgttttgta atgacactgt cgtcattcca 300
 tgctttgtta ctaatatgga ggcacaaaac actactgaag tatacgtaaa gtggaaattt 360
 aaaggaagag atatttacac ctttgatgga gctctaaaca agtccactgt ccccactgac 420
 tttagtagtg caaaaattga agtctcacia ttactaaaag gagatgcctc tttgaagatg 480
 gataagagtg atgctgtctc acacacagga aactacactt gtgaagtaac agaattaacc 540
 agagaagggtg aaacgatcat cgagctaaaa tatcgtgttg tttcatggtt tttcccaat 600

 gaaaatattc ttattgttat tttcccaatt tttgctatac tcctgttctg gggacagttt 660
 ggtattaaaa cacttaata tagatccggt ggtatggatg agaaaacaat tgctttactt 720
 gttgctggac tagtgatcac tgtcattgic attgttggag ccattctttt cgtcccaggt 780
 gaatattcat taaagaatgc tactggcctt ggtttaattg tgacttctac agggatatta 840
 atattacttc actactatgt gtttagtaca gcgattggat taacctcctt cgtcattgcc 900
 atattggtta ttcaggatgag agcctatatac ctcgctgtgg ttggactgag tctctgtatt 960
 gcggcgtgta taccaatgca tggccctcct ctgatttcag gtttgagtat cttagctcta 1020

 gcacaattac ttggactagt ttatatgaaa tttgtggcctt ccaatcagaa gactatacaa 1080
 cctcctagga aagctgtaga ggaacccctt aatgcattca aagaatcaaa aggaatgatg 1140
 aatgatgaat aactgaagtg aagtatgga ctccgatttg gagagtagta agacgtgaaa 1200
 ggaatacact tigttttaag caccatggcc ttgatgattc actgttgggg agaagaaaca 1260
 agaaaagtaa ctggttgca cctatgagac ccttacgtga ttgttagtta agtttttatt 1320
 caaagcagct gtaatttagt taataaaata attatgatct atgttgtttg cccaattgag 1380
 atccagtttt ttgtgttat ttttaataca ttaggggcaa tagtagaatg gacaatttcc 1440

 aagaatgatg ctttcaggt cctagggcct ctggcctcta ggtaaccagt ttaaattggt 1500
 tcagggtgat aactacttag cactgccctg gtgattacce agagatatct atgaaaacca 1560
 gtggcttcca tcaaaccttt gccaaactcag gttcacagca gctttgggca gttatggcag 1620
 tatggcatta gctgagaggt gtctgccact tctgggtcaa tggaataata aattaagtac 1680
 aggcaggaat ttggttggga gcatcttgta tgatctccgt atgatgtgat attgatggag 1740
 atagtgggcc tcattcttgg gggttgccat tcccacattc ccccttaac aaacagtga 1800
 acaggcctt cccagattta gggactttt attgatggat atgttttctt tttattcaca 1860

 taacccttg aaaccctgic ttgtcctcct gttacttgct tctgctgtac aagatgtagc 1920
 accttttctc ctctttgaac atggctctagt gacacggtag caccagttgc aggaaggagc 1980
 cagacttggt ctcagagcac tgtgttcaca cttttcagca aaaatagcta tggttgtaac 2040
 atatgtattc ccttctctg atttgaaggc aaaaatctac agtgtttctt cacttctttt 2100

ctgatctggg gcatgaaaa agcaagattg aaatttgaac tatgagtctc ctgcatggca 2160
 acaaaatgtg tgcaccatc aggccaacag gccagccctt gaatgggat ttattactgt 2220
 tgtatctatg ttgcatgata aacattcacc accttcctcc tgtagtctg cctcgtactc 2280

 cccttccct atgattgaaa agtaaaaa acccacattt cctatcctgg ttagaagaaa 2340
 attaatgttc tgacagttgt gatcgcttg agtacttta gacttttagc attcgttttt 2400
 tacctgtttg tggatgtgtg tttgtatgtg catacgtatg agataggcac atgcatcttc 2460
 tgtatggaca aaggtagggg acctacagga gagcaaagg taattttgtg cttttagtaa 2520
 aaacatttaa atacaaagt ttttattggg tggattata tttgatgcaa atatttgatc 2580
 acttaaaact tttaaaact ctaggtaatt tgccacgctt tttgactgct caccaatacc 2640
 ctgtaaaaat acgtaattct tctgtttgt gtaataagat attcatattt gtagttgcat 2700

 taataatagt tatttcttag tccatcagat gttcccgtgt gcctctttta tgccaaattg 2760
 attgtcatat ttcatgttg gaccaagtag tttgccatg gcaaacctaa atttatgacc 2820
 tgctgaggcc tctcagaaaa ctgagcatac tagcaagaca gctcttcttg aaaaaaaaa 2880
 tatgtataca caaataata cgtatatcta tatatacgta tgtatataca cacatgtata 2940
 ttcttcttg attgtgtagc tgtccaaaat aataacatat atagaggag ctgtattcct 3000
 ttatacaaat ctgatggctc ctgcagcact ttttcttct gaaaatattt acattttgct 3060
 aacctagttt gttactttaa aatcagttt tgatgaaagg agggaaaagc agatggactt 3120

 gaaaaagatc caagctccta ttagaaaagg tatgaaaatc tttatagtaa aattttttat 3180
 aaactaaagt tgfacccttt aatatgtagt aaactctcat ttatttgggg ttcgctcttg 3240
 gatctcatcc atccattgtg ttctctttaa tgcctcctgc cttttgagc attcactgcc 3300
 ctagacaatg ccaccagaga tagtggggga aatgccagat gaaaccaact ctgctctca 3360
 ctagtgtca gcttctctgg ataagtgacc acagaagcag gagtctctct gettgggcat 3420
 cattgggcca gttccttctc tttaaatcag atttgaatg gctcccaat tccatcacat 3480
 cacatttaaa ttgcagacag tgttttgca atcatgtatc tgtttgtcc cataaatgc 3540

 ttttactcc ctgatcccag tttctgctgt tgactcttc attcagtttt atttattgtg 3600
 tgttctcaca gtgacacat ttgtccttt ctgcaacaac cttccagct acttttgcca 3660
 aattctattt gtcttctct tcaaaacatt ctctttgca gttcctcttc atctgtgtag 3720
 ctgctctttt gtctctaac ttaccattcc tatagtactt tatgcatctc tgcttagttc 3780
 tattagtttt ttggccttgc tcttctctt gattttaaaa ttccttctat agctagagct 3840
 tttcttctt teattctctc ttctgcagt gttttgcata catcagaagc taggtacata 3900

agttaaataa ttgagagtgg gctgtattta gatttatcac ttttaaatag ggtgagcttg 3960

 agagttttct ttctttctgt tttttttttt tgtttttttt tttttttttt tttttttttt 4020
 ttttgactaa tttcacatgc tctaaaaacc ttcaaagggtg attatttttc tectggaaac 4080
 tccagggtcca ttctgtttaa atccctaaga atgtcagaat taaaataaca ggctatccc 4140
 gtaattggaa atattttcttt tttcaggatg ctatagtcaa tttagtaagt gaccacaaa 4200
 ttgttatttg cactaacaaa gctcaaaaaca cgataagttt actcctccat ctcagtaata 4260
 aaaattaagc tgtaatcaac cttctagggt tctcttgtct taaaatgggt attcaaaaat 4320
 ggggatctgt ggtgtatgta tggaaacaca tactccttaa tttacctgtt gttggaaact 4380

 ggagaaatga ttgtcgggca accgtttatt ttttattgta ttttatttgg ttgagggatt 4440
 tttttataaa cagttttact tgtgtcataat tttaaaatta ctaactgcca tcacctgctg 4500
 gggctcctttg ttaggtcatt ttcagtgaact aatagggata atccaggtaa ctttgaagag 4560
 atgagcagtg agtgaccagg cagtttttct gccttttagct ttgacagttc ttaattaaga 4620
 tcattgaaga ccagctttct cataaatttc tctttttgaa aaaaagaaag catttgtact 4680
 aagctcctct gtaagacaac atcttaaatc ttaaaagtgt tgttatcatg actggtgaga 4740
 gaagaaaaca ttttgttttt attaatgga gcattattta caaaaagcca ttgttgagaa 4800

 ttagatccca catcgtataa atatctatta accattctaa ataaagagaa ctccagtgtt 4860
 gctatgtgca agatcctctc ttggagcttt tttgcatagc aattaaaggt gtgctatttg 4920
 tcagttagcca tttttttgca gtgatttgaa gaccaaagtt gttttacagc tgtgttaccg 4980
 ttaaaggttt ttttttttat atgtattaaa tcaatttate actgtttaaa gctttgaata 5040
 tctgcaatct ttgccaagggt acttttttat ttaaaaaaaaa acataacttt gtaaatatta 5100
 ccctgtaata ttatatafac ttaataaaac attttaagct attttgttgg gctatttcta 5160
 ttgctgctac agcagaccac aagcacattt ctgaaaaatt taatttatta atgtattttt 5220

 aagttgctta tattctaggt aacaatgtaa agaagattt aaaatattaa ttatgaattt 5280
 tttgagtata atacccaata agcttttaat tagagcagag ttttaattaa aagttttaaa 5340
 tcagtc 5346

 <210> 16
 <211> 323
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 16
 Met Trp Pro Leu Val Ala Ala Leu Leu Leu Gly Ser Ala Cys Cys Gly

1 5 10 15
 Ser Ala Gln Leu Leu Phe Asn Lys Thr Lys Ser Val Glu Phe Thr Phe
 20 25 30

 Cys Asn Asp Thr Val Val Ile Pro Cys Phe Val Thr Asn Met Glu Ala
 35 40 45
 Gln Asn Thr Thr Glu Val Tyr Val Lys Trp Lys Phe Lys Gly Arg Asp
 50 55 60
 Ile Tyr Thr Phe Asp Gly Ala Leu Asn Lys Ser Thr Val Pro Thr Asp
 65 70 75 80
 Phe Ser Ser Ala Lys Ile Glu Val Ser Gln Leu Leu Lys Gly Asp Ala
 85 90 95

 Ser Leu Lys Met Asp Lys Ser Asp Ala Val Ser His Thr Gly Asn Tyr
 100 105 110
 Thr Cys Glu Val Thr Glu Leu Thr Arg Glu Gly Glu Thr Ile Ile Glu
 115 120 125
 Leu Lys Tyr Arg Val Val Ser Trp Phe Ser Pro Asn Glu Asn Ile Leu
 130 135 140
 Ile Val Ile Phe Pro Ile Phe Ala Ile Leu Leu Phe Trp Gly Gln Phe
 145 150 155 160

 Gly Ile Lys Thr Leu Lys Tyr Arg Ser Gly Gly Met Asp Glu Lys Thr
 165 170 175
 Ile Ala Leu Leu Val Ala Gly Leu Val Ile Thr Val Ile Val Ile Val
 180 185 190
 Gly Ala Ile Leu Phe Val Pro Gly Glu Tyr Ser Leu Lys Asn Ala Thr
 195 200 205
 Gly Leu Gly Leu Ile Val Thr Ser Thr Gly Ile Leu Ile Leu Leu His
 210 215 220

 Tyr Tyr Val Phe Ser Thr Ala Ile Gly Leu Thr Ser Phe Val Ile Ala
 225 230 235 240
 Ile Leu Val Ile Gln Val Ile Ala Tyr Ile Leu Ala Val Val Gly Leu
 245 250 255

Ser Leu Cys Ile Ala Ala Cys Ile Pro Met His Gly Pro Leu Leu Ile
 260 265 270

Ser Gly Leu Ser Ile Leu Ala Leu Ala Gln Leu Leu Gly Leu Val Tyr
 275 280 285

Met Lys Phe Val Ala Ser Asn Gln Lys Thr Ile Gln Pro Pro Arg Lys
 290 295 300

Ala Val Glu Glu Pro Leu Asn Ala Phe Lys Glu Ser Lys Gly Met Met
 305 310 315 320

Asn Asp Glu

<210> 17

<211> 293

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide"

<400> 17

Met Trp Pro Leu Ala Ala Ala Leu Leu Leu Gly Ser Cys Cys Cys Gly

1 5 10 15

Ser Ala Gln Leu Leu Phe Asn Lys Thr Lys Ser Val Glu Phe Thr Phe
 20 25 30

Cys Asn Asp Thr Val Val Ile Pro Cys Phe Val Thr Asn Met Glu Ala
 35 40 45

Gln Asn Thr Thr Glu Val Tyr Val Lys Trp Lys Phe Lys Gly Arg Asp
 50 55 60

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

65 70 75 80

Phe Ser Ser Ala Lys Ile Glu Val Ser Gln Leu Leu Lys Gly Asp Ala
 85 90 95

Ser Leu Lys Met Asp Lys Ser Asp Ala Val Ser His Thr Gly Asn Tyr
 100 105 110

Thr Cys Glu Val Thr Glu Leu Thr Arg Glu Gly Glu Thr Ile Ile Glu
 115 120 125
 Leu Lys Tyr Arg Val Val Ser Trp Phe Ser Pro Asn Glu Asn Ile Leu
 130 135 140
 Ile Val Ile Phe Pro Ile Phe Ala Ile Leu Leu Phe Trp Gly Gln Phe
 145 150 155 160
 Gly Ile Lys Thr Leu Lys Tyr Arg Ser Gly Gly Met Asp Glu Lys Thr
 165 170 175
 Ile Ala Leu Leu Val Ala Gly Leu Val Ile Thr Val Ile Val Ile Val
 180 185 190
 Gly Ala Ile Leu Phe Val Pro Gly Glu Tyr Ser Leu Lys Asn Ala Thr
 195 200 205
 Gly Leu Gly Leu Ile Val Thr Ser Thr Gly Ile Leu Ile Leu Leu His
 210 215 220
 Tyr Tyr Val Phe Ser Thr Ala Ile Gly Leu Thr Ser Phe Val Ile Ala
 225 230 235 240
 Ile Leu Val Ile Gln Val Ile Ala Tyr Ile Leu Ala Val Val Gly Leu
 245 250 255
 Ser Leu Cys Ile Ala Ala Cys Ile Pro Met His Gly Pro Leu Leu Ile
 260 265 270
 Ser Gly Leu Ser Ile Leu Ala Leu Ala Gln Leu Leu Gly Leu Val Tyr
 275 280 285
 Met Lys Phe Val Glu
 290
 <210> 18
 <211> 305
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide"
 <400> 18

Met Trp Pro Leu Ala Ala Ala Leu Leu Leu Gly Ser Cys Cys Cys Gly
 1 5 10 15

Ser Ala Gln Leu Leu Phe Asn Lys Thr Lys Ser Val Glu Phe Thr Phe
 20 25 30

Cys Asn Asp Thr Val Val Ile Pro Cys Phe Val Thr Asn Met Glu Ala
 35 40 45

Gln Asn Thr Thr Glu Val Tyr Val Lys Trp Lys Phe Lys Gly Arg Asp
 50 55 60

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

Phe Ser Ser Ala Lys Ile Glu Val Ser Gln Leu Leu Lys Gly Asp Ala
 85 90 95

Ser Leu Lys Met Asp Lys Ser Asp Ala Val Ser His Thr Gly Asn Tyr
 100 105 110

Thr Cys Glu Val Thr Glu Leu Thr Arg Glu Gly Glu Thr Ile Ile Glu
 115 120 125

Leu Lys Tyr Arg Val Val Ser Trp Phe Ser Pro Asn Glu Asn Ile Leu
 130 135 140

Ile Val Ile Phe Pro Ile Phe Ala Ile Leu Leu Phe Trp Gly Gln Phe
 145 150 155 160

Gly Ile Lys Thr Leu Lys Tyr Arg Ser Gly Gly Met Asp Glu Lys Thr
 165 170 175

Ile Ala Leu Leu Val Ala Gly Leu Val Ile Thr Val Ile Val Ile Val
 180 185 190

Gly Ala Ile Leu Phe Val Pro Gly Glu Tyr Ser Leu Lys Asn Ala Thr
 195 200 205

Gly Leu Gly Leu Ile Val Thr Ser Thr Gly Ile Leu Ile Leu Leu His
 210 215 220

Tyr Tyr Val Phe Ser Thr Ala Ile Gly Leu Thr Ser Phe Val Ile Ala
 225 230 235 240

Ile Leu Val Ile Gln Val Ile Ala Tyr Ile Leu Ala Val Val Gly Leu

245 250 255
 Ser Leu Cys Ile Ala Ala Cys Ile Pro Met His Gly Pro Leu Leu Ile
 260 265 270

Ser Gly Leu Ser Ile Leu Ala Leu Ala Gln Leu Leu Gly Leu Val Tyr
 275 280 285

Met Lys Phe Val Ala Ser Asn Gln Arg Thr Ile Gln Pro Pro Arg Asn
 290 295 300

Arg

305

<210> 19

<211> 312

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide"

<400> 19

Met Trp Pro Leu Ala Ala Ala Leu Leu Leu Gly Ser Cys Cys Cys Gly

1 5 10 15
 Ser Ala Gln Leu Leu Phe Asn Lys Thr Lys Ser Val Glu Phe Thr Phe
 20 25 30

Cys Asn Asp Thr Val Val Ile Pro Cys Phe Val Thr Asn Met Glu Ala
 35 40 45

Gln Asn Thr Thr Glu Val Tyr Val Lys Trp Lys Phe Lys Gly Arg Asp
 50 55 60

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

65 70 75 80
 Phe Ser Ser Ala Lys Ile Glu Val Ser Gln Leu Leu Lys Gly Asp Ala
 85 90 95

Ser Leu Lys Met Asp Lys Ser Asp Ala Val Ser His Thr Gly Asn Tyr
 100 105 110

Thr Cys Glu Val Thr Glu Leu Thr Arg Glu Gly Glu Thr Ile Ile Glu

115 120 125
 Leu Lys Tyr Arg Val Val Ser Trp Phe Ser Pro Asn Glu Asn Ile Leu

130 135 140
 Ile Val Ile Phe Pro Ile Phe Ala Ile Leu Leu Phe Trp Gly Gln Phe
 145 150 155 160
 Gly Ile Lys Thr Leu Lys Tyr Arg Ser Gly Gly Met Asp Glu Lys Thr

165 170 175
 Ile Ala Leu Leu Val Ala Gly Leu Val Ile Thr Val Ile Val Ile Val
 180 185 190
 Gly Ala Ile Leu Phe Val Pro Gly Glu Tyr Ser Leu Lys Asn Ala Thr

195 200 205
 Gly Leu Gly Leu Ile Val Thr Ser Thr Gly Ile Leu Ile Leu Leu His

210 215 220
 Tyr Tyr Val Phe Ser Thr Ala Ile Gly Leu Thr Ser Phe Val Ile Ala
 225 230 235 240
 Ile Leu Val Ile Gln Val Ile Ala Tyr Ile Leu Ala Val Val Gly Leu

245 250 255
 Ser Leu Cys Ile Ala Ala Cys Ile Pro Met His Gly Pro Leu Leu Ile

260 265 270
 Ser Gly Leu Ser Ile Leu Ala Leu Ala Gln Leu Leu Gly Leu Val Tyr

275 280 285
 Met Lys Phe Val Ala Ser Asn Gln Arg Thr Ile Gln Pro Pro Arg Lys
 290 295 300
 Ala Val Glu Glu Pro Leu Asn Glu

305 310

<210> 20

<211> 323

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 20

Met Trp Pro Leu Ala Ala Ala Leu Leu Leu Gly Ser Cys Cys Cys Gly
 1 5 10 15
 Ser Ala Gln Leu Leu Phe Asn Lys Thr Lys Ser Val Glu Phe Thr Phe
 20 25 30
 Cys Asn Asp Thr Val Val Ile Pro Cys Phe Val Thr Asn Met Glu Ala
 35 40 45
 Gln Asn Thr Thr Glu Val Tyr Val Lys Trp Lys Phe Lys Gly Arg Asp
 50 55 60

 Ile Tyr Thr Phe Asp Gly Ala Leu Asn Lys Ser Thr Val Pro Thr Asp
 65 70 75 80
 Phe Ser Ser Ala Lys Ile Glu Val Ser Gln Leu Leu Lys Gly Asp Ala
 85 90 95
 Ser Leu Lys Met Asp Lys Ser Asp Ala Val Ser His Thr Gly Asn Tyr
 100 105 110
 Thr Cys Glu Val Thr Glu Leu Thr Arg Glu Gly Glu Thr Ile Ile Glu
 115 120 125

 Leu Lys Tyr Arg Val Val Ser Trp Phe Ser Pro Asn Glu Asn Ile Leu
 130 135 140
 Ile Val Ile Phe Pro Ile Phe Ala Ile Leu Leu Phe Trp Gly Gln Phe
 145 150 155 160
 Gly Ile Lys Thr Leu Lys Tyr Arg Ser Gly Gly Met Asp Glu Lys Thr
 165 170 175
 Ile Ala Leu Leu Val Ala Gly Leu Val Ile Thr Val Ile Val Ile Val
 180 185 190

 Gly Ala Ile Leu Phe Val Pro Gly Glu Tyr Ser Leu Lys Asn Ala Thr
 195 200 205
 Gly Leu Gly Leu Ile Val Thr Ser Thr Gly Ile Leu Ile Leu Leu His
 210 215 220
 Tyr Tyr Val Phe Ser Thr Ala Ile Gly Leu Thr Ser Phe Val Ile Ala
 225 230 235 240

Ile Leu Val Ile Gln Val Ile Ala Tyr Ile Leu Ala Val Val Gly Leu
 245 250 255

Ser Leu Cys Ile Ala Ala Cys Ile Pro Met His Gly Pro Leu Leu Ile
 260 265 270

Ser Gly Leu Ser Ile Leu Ala Leu Ala Gln Leu Leu Gly Leu Val Tyr
 275 280 285

Met Lys Phe Val Ala Ser Asn Gln Arg Thr Ile Gln Pro Pro Arg Lys
 290 295 300

Ala Val Glu Glu Pro Leu Asn Ala Phe Lys Glu Ser Lys Gly Met Met
 305 310 315 320

Asn Asp Glu

<210> 21

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer"

<400> 21

tgcagaagtc actaggagga at 22

<210> 22

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 probe"

<400> 22

tcagtcaact tcttctgggt tgtttcc 27

<210> 23

<211> 23

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"
 <400> 23
 gtgccagact cactttctat cca 23
 <210> 24
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"
 <400> 24
 tgctgccaat atacggcttc tg 22
 <210> 25
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic probe"
 <400> 25
 cagctctcat agccaactat ggtgcc 26
 <210> 26
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"
 <400> 26
 tcaagcagag cctggttatac tg 22

<210> 27
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"
 <400> 27
 gtcgtcattc catgctttgt tac 23

<210> 28
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic probe"
 <400> 28
 tggaggcaca aaacactact gaagtatacg 30

<210> 29
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"
 <400> 29
 ggacagtgga cttgtttaga gc 22

<210> 30
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 30

ggcttggtgg ctgattgttc t 21

<210> 31

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

probe"

<400> 31

agcacccaaa ctgatatgcc tgtatttg 28

<210> 32

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 32

tgggaactgg tgtttcaagt cta 23

<210> 33

<211> 158

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide"

<400> 33

gcagacatga ttacttcaga gctttcaaag ctagatactg taccttgcac attccaacac 60

gcgatcgcat ttaagattt tccatcctag tggaaagata tgatttgatt catcctattt 120

actttgtata ttaaagtaca gtagaacctg ccactttt 158

<210> 34

```

<211> 160
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
        polynucleotide"
<400> 34
ggatccattt taagtaatag aataggattt ttaattgttc cagtgtttct gtgatagagc      60
tgtcctgcac agacctgttt ctcgagataa ctctgtataa tgtatgctat acgaagtat      120

atgcatggcc tccgcgccgg gttttggcgc ctcccgcggg      160
<210> 35
<211> 160
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
        polynucleotide"
<400> 35
catgtctgga ataacttctg ataatgtatg ctatacgaag ttatgctagt aactataacg      60
gtcctaagggt agcgactagc attagtaggg aaggtecgtc cactgtccag gttcctcttg      120
cggagctctt tgtctctctg gactctgtat acactgcttg      160
<210> 36
<211> 239
<212>
> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
        polynucleotide"
<400> 36
ggatccattt taagtaatag aataggattt ttaattgttc cagtgtttct gtgatagagc      60
tgtcctgcac agacctgttt ctcgagataa ctctgtataa tgtatgctat acgaagtat      120
gctagtaact ataacgggcc taaggtagcg actagcatta gtatggaagg tccgtccact      180
gtccagggtc ctcttgccga gctctttgtc tctctggact ctgtatacac tgcttgcatt      239

```