



등록특허 10-2370419



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년03월04일
(11) 등록번호 10-2370419
(24) 등록일자 2022년02월28일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A01K 67/027 (2006.01) *A61K 49/00* (2006.01)
C12N 15/85 (2006.01) *C12N 9/16* (2006.01)
G01N 33/50 (2017.01)
- (52) CPC특허분류
A01K 67/0278 (2013.01)
A61K 49/0008 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2016-7008334
- (22) 출원일자(국제) 2014년09월23일
심사청구일자 2019년09월20일
- (85) 번역문제출일자 2016년03월29일
- (65) 공개번호 10-2016-0056900
- (43) 공개일자 2016년05월20일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2014/056910
- (87) 국제공개번호 WO 2015/042557
국제공개일자 2015년03월26일
- (30) 우선권주장
61/881,261 2013년09월23일 미국(US)
- (56) 선행기술조사문현
WO2012112544 A2
(뒷면에 계속)

전체 청구항 수 : 총 28 항

심사관 : 박영관

- (54) 발명의 명칭 **인간화된 신호-조절 단백질 유전자를 가지는 비-인간 동물**

(57) 요 약

유전자 변형된 비-인간 동물 및 그것을 제조하기 위한 방법 및 조성물이 제공되는데, 이때 유전자 변형은 내인성 신호-조절 단백질 유전자의 인간화, 특히 SIRP α 유전자의 인간화를 포함한다. 내인성 SIRP α 유전자로부터 인간 또는 인간화된 SIRP α 단백질을 발현하는 마우스들을 포함하여, 유전자 변형된 마우스들이 기술된다.

(52) CPC특허분류

C12N 15/8509 (2013.01)
C12N 9/16 (2013.01)
C12Y 301/03048 (2013.01)
G01N 33/5088 (2013.01)
A01K 2227/105 (2013.01)
A01K 2267/0331 (2013.01)
A01K 2267/0381 (2013.01)
A01K 2267/0387 (2013.01)
G01N 2500/04 (2013.01)

(72) 발명자

바르게즈 빈두

미국 뉴욕 12533 호프웰 정크션 로간스 웨이 19

구레어 카간

미국 뉴욕 10595 빌할라 파멜라 레인 8

(56) 선행기술조사문헌

WO2006128163 A2
US5149635 A
WO1999012965 A2
J Clin Invest vol.109 no.12 pp.1587-1598, 2002
PNAS vol.101 no.11 pp.3903-3908, 2004
Improving human hemato-lymphoidsystem mice by cytokine knock-in gene replacement, vol.32 no.7 pp.321-327, 2011
Semin Immunol. vol.18 no.5 pp.263-275, 2006
US20070028316 A1
US20180295818 A1
J immunol. vol.175 no.1 pp.319-328 2005
PLoS One vol.3 no.9 pp.e3192 2008
Improving human hemato-lymphoidsystem mice by cytokine knock-in gene replacement, vol.32 no.7 pp.321-327 2011
Semin Immunol. vol.18 no.5 pp.263-275 2006

명세서

청구범위

청구항 1

인간화된 SIRP α 유전자를 형성하기 위하여 게놈이 내인성 설치류 SIRP α 유전자좌에서 설치류 SIRP α 유전자의 엑손 2, 3 및 4의 인간 SIRP α 유전자의 엑손 2, 3 및 4로의 대체를 포함하고 있는 설치류로서,

인간화된 SIRP α 유전자는 내인성 설치류 SIRP α 유전자좌에서 설치류 SIRP α 프로모터에 작동가능하게 연결되어 있고, 설치류에서 인간화된 SIRP α 단백질을 발현하며, 및

인간화된 SIRP α 단백질은 인간 SIRP α 유전자에 의해 코드화된 인간 SIRP α 단백질의 세포 외 부분 및 설치류 SIRP α 유전자에 의해 코드화된 설치류 SIRP α 단백질의 세포 내 부분을 포함하는,

설치류.

청구항 2

제1항에 있어서, 인간화된 SIRP α 유전자는 설치류 SIRP α 유전자의 엑손 1, 5, 6, 7 및 8을 포함하는 것을 특징으로 하는 설치류.

청구항 3

제1항에 있어서, 인간 SIRP α 단백질은 SEQ ID NO:4의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 설치류.

청구항 4

제1항에 있어서, 인간화된 SIRP α 단백질은 SEQ ID NO:5에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 설치류.

청구항 5

제1항에 있어서, 설치류는 설치류 SIRP α 단백질을 발현하지 않는 것을 특징으로 하는 설치류.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 설치류는 마우스인 것을 특징으로 하는 설치류.

청구항 7

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 설치류는 래트인 것을 특징으로 하는 설치류.

청구항 8

인간화된 SIRP α 유전자를 형성하기 위하여 게놈이 내인성 설치류 SIRP α 유전자좌에서 설치류 SIRP α 유전자의 엑손 2, 3 및 4의 인간 SIRP α 유전자의 엑손 2, 3 및 4로의 대체를 포함하고 있는 분리된 설치류 세포 또는 조직으로서,

인간화된 SIRP α 유전자는 내인성 설치류 SIRP α 유전자좌에서 설치류 SIRP α 프로모터에 작동가능하게 연결되어 있고, 인간화된 SIRP α 단백질을 코드화하며, 및

인간화된 SIRP α 단백질은 인간 SIRP α 유전자에 의해 코드화된 인간 SIRP α 단백질의 세포 외 부분 및 설치류 SIRP α 유전자에 의해 코드화된 설치류 SIRP α 단백질의 세포 내 부분을 포함하는,

분리된 설치류 세포 또는 조직.

청구항 9

제8항에 있어서, 인간화된 SIRP α 유전자는 설치류 SIRP α 유전자의 엑손 1, 5, 6, 7 및 8을 포함하는 것을 특징으로 하는 분리된 설치류 세포 또는 조직.

청구항 10

제8항에 있어서, 세포 또는 조직은 설치류 SIRP α 단백질을 발현하지 않는 것을 특징으로 하는 분리된 설치류 세포 또는 조직.

청구항 11

제8항에 있어서, 인간 SIRP α 단백질은 SEQ ID NO:4의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 분리된 설치류 세포 또는 조직.

청구항 12

제8항에 있어서, 인간화된 SIRP α 단백질은 SEQ ID NO:5에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 분리된 설치류 세포 또는 조직.

청구항 13

제8항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 분리된 설치류 세포 또는 조직은 분리된 마우스 세포 또는 조직인 것을 특징으로 하는 분리된 설치류 세포 또는 조직.

청구항 14

제8항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 분리된 설치류 세포 또는 조직은 분리된 래트 세포 또는 조직인 것을 특징으로 하는 분리된 설치류 세포 또는 조직.

청구항 15

제8항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 분리된 설치류 세포는 분리된 설치류 배아 줄기 (ES) 세포인 것을 특징으로 하는 분리된 설치류 세포 또는 조직.

청구항 16

제15항에 있어서, 설치류 ES 세포는 마우스 ES 세포인 것을 특징으로 하는 분리된 설치류 세포 또는 조직.

청구항 17

제15항에 있어서, 설치류 ES 세포는 래트 ES 세포인 것을 특징으로 하는 분리된 설치류 세포 또는 조직.

청구항 18

설치류의 제조 방법으로서,

(a) 설치류 배아 줄기 (ES) 세포의 내인성 설치류 SIRP α 유전자좌에서 설치류 SIRP α 유전자의 엑손 2, 3 및 4를 인간 SIRP α 유전자의 엑손 2, 3 및 4로 대체시켜서 인간화된 SIRP α 유전자를 형성하는 단계,

이때 인간화된 SIRP α 유전자는 내인성 설치류 SIRP α 유전자좌에서 설치류 SIRP α 프로모터에 작동가능하게 연결되어 있고 인간화된 SIRP α 단백질을 코드화하며, 및

인간화된 SIRP α 단백질은 인간 SIRP α 유전자에 의해 코드화된 인간 SIRP α 단백질의 세포 외 부분 및 설치류 SIRP α 유전자에 의해 코드화된 설치류 SIRP α 단백질의 세포 내 부분을 포함하고,

그로써 인간화된 SIRP α 유전자를 포함하는 변형된 설치류 ES 세포를 얻는 단계; 및

(b) (a)에서 얻어진 변형된 ES 세포를 사용하여 설치류를 제조하는 단계

를 포함하는, 방법.

청구항 19

제18항에 있어서, 인간화된 SIRP α 유전자는 설치류 SIRP α 유전자의 엑손 1, 5, 6, 7 및 8을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 20

제18항에 있어서, 인간 SIRP α 단백질은 SEQ ID NO:4의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 21

제18항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 인간화된 SIRP α 단백질은 SEQ ID NO:5에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 22

제18항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 설치류는 마우스인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 23

제18항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 설치류는 래트인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 24

인간 세포를 표적화하는 약물의 치료 효능을 평가하는 방법으로서,

(a) 하나 이상의 인간 세포가 이식되어 있는, 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 따르는 설치류를 제공하는 단계;

(b) 설치류에게 약물 후보를 투여하는 단계; 및

(c) 약물 후보의 치료 효능을 측정하기 위하여 설치류에서 인간 세포를 모니터링하는 단계
를 포함하는 방법.

청구항 25

제24항에 있어서, 설치류는 마우스인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 26

제24항에 있어서, 설치류는 래트인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 27

핵산 표적화 벡터로서,

설치류 SIRP α 유전자의 엑손 2의 상류의 설치류 게놈 DNA 단편을 포함하는 5' 상동성 아암, 및

설치류 SIRP α 유전자의 엑손 4의 하류의 설치류 게놈 DNA 단편을 포함하는 3' 상동성 아암

에 의해 플랭킹되어 있는, 인간 SIRP α 유전자의 엑손 2, 3 및 4를 포함하는 인간 게놈 DNA 단편을 포함하며;

인간 게놈 DNA 단편의 상동성 재조합을 기반으로 한 설치류 세포의 게놈으로의 통합은 내인성 설치류 SIRP α 유전자좌에서 설치류 SIRP α 유전자의 엑손 2, 3 및 4의 인간 SIRP α 유전자의 엑손 2, 3 및 4로의 대체를 초래하여 인간화된 SIRP α 유전자가 형성되고,

상기 인간화된 SIRP α 유전자는 상기 내인성 설치류 SIRP α 유전자좌에서 설치류 SIRP α 프로모터에 작동 가능하게 연결되어 있으며, 상기 인간 SIRP α 유전자에 의해 코드화된 인간 SIRP α 단백질의 세포 외 부분 및 상기 설치류 SIRP α 유전자에 의해 코드화된 설치류 SIRP α 단백질의 세포 내 부분을 포함하는 인간화된 SIRP α 단백질을 코드화하고, 및

설치류는 마우스 또는 래트인,

핵산 표적화 벡터.

청구항 28

제27항에 있어서, 상기 인간화된 SIRP α 유전자는 상기 설치류 SIRP α 유전자의 엑손 1, 5, 6, 7 및 8을 포함하

는 것을 특징으로 하는 핵산 표적화 벡터.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원에 대한 교차 참조

[0002] 본 출원은 2013년 9월 23일에 출원된 미국 임시 출원 번호 61/881,261호의 우선권의 유익을 주장하며, 상기 출원은 전체 내용이 참조로 본원에 포함된다.

[0003] 기술분야

[0004] 본 발명은 인간화된 신호-조절 단백질 유전자를 가지는 비-인간 동물에 관한 것이다.

배경 기술

[0005] 면역 시스템은 고도로 조절된 다수의 과정에 포함되고 함께 외래 단백질을 제거하는 데 효과적인 면역 반응들을 생성하는 여러 상이한 세포 유형들로 구성된다. 나아가, 이들 동일한 면역 세포들은 다른 것들 중에서도, 세포-대-세포 상호작용을 조절하는 조절 막 단백질들에 의해 자체-인식 특성을 가지는 것으로 밝혀졌다. 이들 동일 단백질들이 이식 접목의 중요한 결정 요인인 것으로 제시되기 때문에, 그런 소통은 그런 유기체의 생존에 중요하다. 그러나, 인간 면역 세포-대-세포 상호작용 및 그것의 조절의 분자적 측면들을 측정하기 위한 생체 내 시스템은 존재하지 않는다. 그런 시스템은 신규한 치료법 및 백신을 확인시켜주는, 인간 조혈 및 면역 시스템 관련된 기능들의 생체 내 분석에 대한 공급원을 제공한다.

발명의 내용

[0006] 발명의 요약

[0007] 본 발명은 인간 조혈 줄기세포의 향상된 이식을 허용하기 위하여 비-인간 동물을 엔지니어링하는 것이 바람직하다는 인식을 포함한다. 본 발명은 또한 인간 조혈 줄기세포의 이식에 유용한 인간화된 SIRP α 유전자를 가지는 및/또는 그렇지 않으면 인간 또는 인간화된 SIRP α 단백질을 발현하거나, 함유하거나 또는 생성하는 비-인간 동물이 바람직하다는 인식을 포함한다.

[0008] 일부 구체예에서, 본 발명의 비-인간 동물은 인간 SIRP α 단백질의 세포 외 부분과 마우스 SIRP α 단백질의 세포 내 부분을 포함하는 SIRP α 폴리펩티드를 발현한다.

[0009] 일부 구체예에서, 인간 SIRP α 단백질의 세포 외 부분은 SEQ ID NO:4에 나타낸 인간 SIRP α 단백질의 잔기 28 내지 362에 해당하는 아미노산을 포함한다.

[0010] 일부 구체예에서, 인간 SIRP α 단백질의 세포 외 부분은 표 3에 나타낸 인간 SIRP α 단백질의 해당하는 세포 외 부분과 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95% 또는 적어도 98%의 % 동일성을 공유한다. 일부 구체예에서, 인간 SIRP α 단백질의 세포 외 부분은 표 3에 나타낸 인간 SIRP α 단백질의 해당하는 세포 외 부분과 적어도 100%의 동일성을 공유한다 (또는 동일하다).

[0011] 일부 구체예에서, 본 발명의 비-인간 동물은 또한 내인성 비-인간 SIRP α 단백질을 발현하지 못한다. 일부 구체예에서, 비-인간 동물은 설치류이고 또한 내인성 설치류 SIRP α 단백질을 발현하지 못한다. 일부 구체예에서, 비-인간 동물은 마우스이고 또한 표 3에 나타낸 서열을 가지는 내인성 마우스 SIRP α 단백질을 발현하지 못한다.

[0012] 일부 구체예에서, 본 발명은 비-인간 SIRP α 프로모터에 작동가능하게 연결되어 있는 인간 SIRP α 의 엑손 2, 3 및 4를 포함하는 SIRP α 유전자를 포함하는 비-인간 동물을 제공한다.

[0013] 일부 구체예에서, 본 발명의 비-인간 동물의 SIRP α 유전자는 내인성 비-인간 SIRP α 유전자의 엑손 1, 5, 6, 7 및 8을 포함한다.

[0014] 다양한 구체예에서, 본 발명의 비-인간 동물은 설치류이다. 일부 특정 구체예에서, 본 발명의 설치류는 마우스 또는 쥐로부터 선택된다.

- [0015] 일부 구체예에서, 본 발명은 본원에서 기술되는 비-인간 동물의 유전자에 의해 코드화된 SIRP α 폴리펩티드를 제공한다.
- [0016] 일부 구체예에서, 본 발명은 본원에서 기술되는 비-인간 동물로부터 분리된 세포 또는 조직을 제공한다. 일부 구체예에서, 세포는 림프구 (예컨대 B 또는 T 세포), 골수성 세포 (예컨대 마크로파지, 호중구, 과립구, 골수성 수지상 세포 및 비만 세포) 및 뉴런으로부터 선택된다. 일부 구체예에서, 조직은 지방 조직, 방광, 뇌, 유방, 골수, 눈, 심장, 장, 신장, 간, 폐, 림프절, 근육, 췌장, 혈장, 혈청, 피부, 비장, 위, 흉선, 고환, 난소 및/또는 그것들의 조합으로부터 선택된다.
- [0017] 일부 구체예에서, 본 발명은 그것의 게놈이 마우스 SIRP α 단백질의 세포 내 부분에 연결되어 있는 인간 SIRP α 단백질의 세포 외 부분을 코드화하는 SIRP α 유전자를 포함하는 분리된 마우스 세포 또는 조직을 제공한다. 일부 구체예에서, 본 발명의 SIRP α 유전자는 마우스 SIRP α 프로모터에 작동가능하게 연결된다. 일부 구체예에서, 본 발명의 SIRP α 유전자는 인간 SIRP α 유전자의 엑손 2, 3 및 4를 포함한다.
- [0018] 일부 구체예에서, 본 발명은 그것의 게놈이 본원에 기술되는 SIRP α 유전자를 포함하는 비-인간 배아 줄기 (ES) 세포를 제공한다. 일부 구체예에서, ES 세포는 비-인간 SIRP α 프로모터에 작동가능하게 연결되어 있는 인간 SIRP α 유전자의 엑손 2, 3 및 4를 포함한다. 일부 특정 구체예에서, ES 세포는 설치류 ES 세포이다. 일부 구체예에서, 본 발명의 비-인간 배아 줄기세포는 마우스 또는 쥐 배아 줄기세포이다.
- [0019] 일부 구체예에서, 본 발명은 본원에 기술되는 SIRP α 유전자를 포함하는 비-인간 배아 줄기세포를 포함하는, 그것으로부터 제조된, 그것으로부터 얻어진 또는 그것으로부터 생성된 비-인간 배아를 제공한다. 일부 구체예에서, 본 발명의 비-인간 배아는 설치류 배아이다. 일부 구체예에서, 본원에 기술되는 설치류 배아는 마우스 또는 쥐 배아이다.
- [0020] 일부 구체예에서, 본 발명은 내인성 SIRP α 유전자좌로부터 SIRP α 단백질을 발현하는 비-인간 동물의 제조 방법을 제공하는데, 이때 SIRP α 단백질은 인간 서열을 포함하고, 그 방법은 비-인간 ES 세포의 내인성 SIRP α 유전자좌를 인간 SIRP α 단백질을 전체 또는 부분적으로 코드화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 게놈 단편으로 표적화하는 단계; 상기 인간 서열을 포함하는 내인성 SIRP α 유전자좌를 포함하는 변형된 비-인간 ES 세포를 얻는 단계; 및 상기 변형된 ES 세포를 사용하여 비-인간 동물을 제조하는 단계를 포함한다.
- [0021] 일부 구체예에서, 상기 뉴클레오티드 서열은 인간 SIRP α 유전자의 엑손 2, 3 및 4를 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 뉴클레오티드 서열은 표 3에 나타낸 인간 SIRP α 유전자에 대해 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95% 또는 적어도 98% 동일한 서열을 가지는 인간 SIRP α 유전자의 엑손 2, 3 및 4를 포함한다.
- [0022] 일부 구체예에서, 상기 뉴클레오티드 서열은 인간 SIRP α 단백질의 아미노산 잔기 28 내지 362를 코드화한다. 일부 구체예에서, 상기 뉴클레오티드 서열은 표 3에 나타낸 인간 SIRP α 단백질에 대해 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95% 또는 적어도 98% 동일한 서열을 가지는 인간 SIRP α 단백질의 아미노산 잔기 28 내지 362를 코드화한다.
- [0023] 일부 구체예에서, 본 발명은 그것의 게놈이 마우스 SIRP α 단백질의 세포 내 부분에 연결되어 있는 인간 SIRP α 단백질의 세포 외 부분을 코드화하는 SIRP α 유전자를 포함하는 마우스를 제공하는 방법을 제공하는데, 그 방법은 마우스의 게놈이 마우스 SIRP α 단백질의 세포 내 부분에 연결되어 있는 인간 SIRP α 단백질의 세포 외 부분을 코드화하는 SIRP α 유전자를 포함하도록 마우스의 게놈을 변형시키고 그로써 상기 마우스를 제공하는 것을 포함한다. 일부 구체예에서, SIRP α 유전자는 본원에 기술되는 SIRP α 유전자이다. 일부 구체예에서, SIRP α 유전자는 인간 SIRP α 유전자의 엑손 2, 3 및 4를 포함한다.
- [0024] 일부 구체예에서, 본 발명은 마우스에 인간 세포를 이식시키는 방법을 제공하는데, 그 방법은 그것의 게놈이 마우스 SIRP α 단백질의 세포 내 부분에 연결되어 있는 인간 SIRP α 단백질의 세포 외 부분을 코드화하는 SIRP α 유전자를 포함하는 마우스를 제공하는 단계, 및 하나 또는 그 이상의 인간 세포를 그 마우스에 이식시키는 단계를 포함한다. 일부 특정 구체예에서, 방법은 추가로 하나 또는 그 이상의 세포를 마우스에 이식하는 것을 분석하는 단계를 더 포함한다. 일부 특정 구체예에서, 분석 단계는 하나 또는 그 이상의 인간 세포의 이식을 하나 또는 그 이상의 야생형 마우스에서의 이식에 비교하는 것을 포함한다. 일부 특정 구체예에서, 분석 단계는 하나 또는 그 이상의 인간 세포의 이식을 그것의 게놈이 마우스 SIRP α 단백질의 세포 내 부분에 연결되어 있는 인간 SIRP α 단백질의 세포 외 부분을 코드화하는 SIRP α 유전자를 포함하지 않는 하나 또는 그 이상의 마우스에서의 이식에 비교하는 것을 포함한다.

- [0025] 일부 구체예에서, 인간 세포는 조혈 줄기세포이다. 일부 구체예에서, 인간 세포는 정맥 내로 이식된다. 일부 구체예에서, 인간 세포는 복강 내로 이식된다. 일부 구체예에서, 인간 세포는 피하로 이식된다.
- [0026] 일부 구체예에서, 본 발명은 그것의 게놈이 마우스 SIRP α 단백질의 세포 내 부분에 연결되어 있는 인간 SIRP α 단백질의 세포 외 부분을 코드화하는 SIRP α 유전자를 포함하는 하나 또는 그 이상의 세포를 제공하는 단계, 그 하나 또는 그 이상의 세포를 표지된 기질과 함께 인큐베이션하는 단계 및 그 하나 또는 그 이상의 세포에 의한 표지된 기질의 식세포 작용을 측정하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다. 일부 구체예에서, 세포는 마우스 세포이다.
- [0027] 일부 구체예에서, 기질은 형광으로 표지된다. 일부 구체예에서, 기질은 항체로 표지된다. 일부 구체예에서, 기질은 하나 또는 그 이상의 적혈구이다. 일부 구체예에서, 기질은 하나 또는 그 이상의 박테리아 세포이다.
- [0028] 일부 구체예에서, 본 발명은 그것의 게놈이 마우스 SIRP α 단백질의 세포 내 부분에 연결되어 있는 인간 SIRP α 단백질의 세포 외 부분을 코드화하는 SIRP α 유전자를 포함하는 마우스를 제공하는 단계, 그 마우스를 항원에 노출시키는 단계 및 그 마우스의 하나 또는 그 이상의 세포에 의한 항원의 식세포 작용을 측정하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다. 일부 구체예에서, 노출 단계는 마우스를 형광으로 표지된 항원에 노출시키는 것을 포함한다. 일부 구체예에서, 노출 단계는 항원을 포함하는 하나 또는 그 이상의 세포에 마우스를 노출시키는 것을 포함한다. 일부 구체예에서, 노출 단계는 항원을 포함하는 하나 또는 그 이상의 인간 세포에 마우스를 노출시키는 것을 포함한다. 일부 구체예에서, 노출 단계는 항원을 포함하는 하나 또는 그 이상의 박테리아 세포에 마우스를 노출시키는 것을 포함한다.
- [0029] 다양한 구체예에서, 본 발명의 SIRP α 유전자는 인간 SIRP α 유전자의 엑손 2, 3 및 4를 포함한다. 다양한 구체예에서, 본 발명의 인간 SIRP α 단백질의 세포 외 부분은 표 3에 나타낸 인간 SIRP α 단백질의 잔기 28 내지 362에 해당하는 아미노산을 포함한다. 다양한 구체예에서, 본 발명의 SIRP α 유전자는 마우스 SIRP α 프로모터에 작동가능하게 연결되어 있다.
- [0030] 일부 구체예에서, 본 발명은 본원에 기술되는 방법에 의해 얻을 수 있는 비-인간 동물을 제공한다. 일부 특정 구체예에서, 본 발명의 비-인간 동물은 내인성 SIRP α 단백질의 세포 외 부분을 검출가능하게 발현하지 않는다.
- [0031] 일부 구체예에서, 본 발명은 약물 또는 백신의 확인 또는 인증 방법을 제공하는데, 그 방법은 본원에 기술되는 비-인간 동물에 약물 또는 백신을 전달하는 단계 및 그 약물 또는 백신에 대한 하나 또는 그 이상의 면역 반응, 그 약물 또는 백신의 안전성 프로필 또는 질환 또는 상태에 미치는 영향을 모니터링하는 단계를 포함한다. 일부 구체예에서, 안전성 프로필을 모니터링하는 것은 비-인간 동물이 약물 또는 백신을 전달한 결과로서 부작용 또는 거부 반응을 나타내는 지의 여부를 측정하는 것을 포함한다. 일부 구체예에서, 부작용 또는 거부 반응은 이 환율, 사망률, 체중의 변화, 하나 또는 그 이상의 효소 수준의 변화 (예컨대 간에서의), 하나 또는 그 이상의 기관의 중량의 변화, 기능의 손실 (예컨대 감각기관, 운동기관, 장기 등), 하나 또는 그 이상의 질환에 대한 민감성의 증가, 비-인간 동물의 게놈에 대한 변화, 음식물 소모의 증가 또는 감소 및 하나 또는 그 이상의 질환의 합병증으로부터 선택된다.
- [0032] 일부 구체예에서, 본 발명은 약물 또는 백신의 의학에서의 사용, 예컨대 의약으로서의 사용을 위한 개발에 본 발명의 비-인간 동물을 사용하는 방법을 제공한다.
- [0033] 일부 구체예에서, 본 발명은 인간 세포를 표적화하는 치료 약물의 효능을 평가하기 위해 본원에 기술된 비-인간 동물을 사용하는 것을 제공한다. 다양한 구체예에서, 본 발명의 비-인간 동물은 인간 세포로 이식되고, 그런 인간 세포를 표적화하는 약물 후보가 동물에 투여된다. 그 약물의 효능은 약물의 투여 후에 비-인간 동물에서 인간 세포를 모니터링함으로써 측정된다.
- [0034] 다양한 구체예에서, 본 발명의 비-인간 동물은 설치류, 바람직하게 마우스 또는 쥐이다.
- [0035] 본 출원에서 사용되는 용어 "약" 및 "대량"은 동등하게 사용된다. 본 출원에서 약/대량을 포함하거나 포함하지 않으면서 사용되는 어떠한 숫자든지 관련 기술의 숙련자에 의해 인지되는 어떠한 정상 변동을 다 포함하는 것을 의미한다.
- [0036] 본 발명의 다른 특징, 대상 및 장점들은 이어지는 상세한 설명에서 드러난다. 그러나, 상세한 설명은 본 발명의 구체예를 나타내는 한편으로, 제한이 아닌 단지 예시를 위해 제공되는 것이 인지되어야 한다. 발명의 범주 내에 있는 다양한 변화 및 수정이 상세한 설명으로부터 기술분야의 숙련자들에게 드러날 것이다.

도면의 간단한 설명

[0037]

본원에 포함된 도면은 제한하기 위한 것이 아니라 단지 예시를 목적으로 한다.

도 1은 넘버링된 각각의 엑손을 가지는 내인성 쥐파 SIRP α 유전자 (상부)의, 실제 크기가 아닌 도표를 도시한다. 인간화된 내인성 SIRP α 유전자 (하부)는 인간 SIRP α 유전자의 엑손 2 내지 4와, 양옆에 부위-특이적 재조합효소 인식 부위 (예컨대 *IoxP*)가 있는 네오마이신 선택 카세트 (Ub-Neo)를 함유하는 것으로 도시된다. 인간 SIRP α 유전자의 엑손 2 내지 4의 표적화된 삽입은 인간 SIRP α 단백질에 해당하는 세포외재성 영역을 가지는 인간화된 SIRP α 유전자를 발현하는 내인성 유전자를 초래한다.

도 2는 인간화된 SIRP α 유전자에 대한 야생형 및 이형접합성 마우스의 SIRP α 발현의 오버레이 (overlay)를 도시한다.

도 3은 인간 CD34 $+$ 세포로 이식된 마우스들의 상이한 계통에서의 CD45 $+$ 세포의 %를 도시한다.

도 4는 인간 CD34 $+$ 세포로 이식된 마우스들의 상이한 계통에서의 CD45+CD3 $+$ 세포의 %를 도시한다.

도 5는 인간 CD34 $+$ 세포로 이식된 마우스들의 상이한 계통에서의 CD45+CD19 $+$ 세포의 %를 도시한다.

도 6은 hCD34 $+$ 이식된 SIRP α BRG 마우스에서의 용량-의존 방식의 Raji 종양의 Ab 1 억제된 성장을 도시한다. Raji 종양 부피는 종양 이식 후 3, 6, 9, 13, 16, 20, 23, 27, 30 및 34일에 측정되었다. 개별 동물 (패널 A 내지 D)에 대한 데이터가 제시된다. hCD34 $+$ 이식된 SIRP α BRG 마우스들에게 0일에 2×10^6 Raji 종양 세포가 피하로 투여되었다. 대조 그룹은 항체를 받지 않았다 (비히를 대조표준) (패널 A). 실험 그룹들에 대해, 0일에 마우스들은 0.4 mg/kg (패널 B)의 비-결합 대조표준 Ab (대조표준 Ab 5) 또는 0.4 mg/kg (패널 C) 또는 0.04 mg/kg (패널 D)의 Ab 1의 IP 용량으로 처리되었고, 이어서 연구 기간 동안 주 2회 용량으로 처리되었다. 모든 개별 시험 그룹에 대한 합성 데이터는 도 7에 도시된다.

도 7은 Ab 1이 hCD34 $+$ 이식된 SIRP α BRG 마우스들에서 대조표준에 비해 Raji 종양의 성장을 상당히 억제한 것을 보여준다. 데이터는 도 6에 도시된 그룹당 n=4 내지 5마리의 마우스들로부터의 합성 데이터를 나타낸다. 데이터는 평균 (SEM)으로서 표시되고 유효 영향 (significant effect)을 탐색하기 위해 변량 (ANOVA)의 분석 및 사후검증을 사용하여 분석되었다 (Tukey'의 이원 변량 분석). 비히를 대조 그룹, 대조표준 Ab 5 그룹 및 Ab 1 0.4mg/kg 그룹의 한 마우스는 조기 사망으로 인해 이원 변량 분석에 의한 데이터 분석을 위해 이 합성 그래프로부터 제외시켰다.

도 8은 Ab 1이 hCD34 $+$ 이식된 SIRP α BRG 마우스들에서 체중에 영향을 주지 않았음을 보여준다. 체중은 종양 이식 후 3, 6, 9, 13, 16, 20, 23, 27, 30 및 34일에 측정되었다. 개별 동물 (패널 A 내지 D)에 대한 데이터가 측정되었다. hCD34 $+$ 이식된 SIRP α BRG 마우스들에게 0일에 2×10^6 Raji 종양 세포가 피하로 투여되었다. 대조 그룹은 항체를 주지 않았다 (비히를 대조표준) (패널 A). 실험 그룹들에 대해, 0일에 마우스들은 0.4 mg/kg (패널 B)의 Ig 비-결합 대조표준 Ab 5 또는 0.4 mg/kg (패널 C) 또는 0.04 mg/kg (패널 D)의 Ab 1의 IP 용량으로 처리되었고, 이어서 연구 기간 동안 주 2회 용량으로 처리되었다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0038]

정의

[0039]

본 발명은 기술된 특정 방법 및 실험 조건들이 다를 수 있기 때문에, 그것들에 한정되지 않는다. 또한 본원에서 사용된 기술은 특정 구체예를 설명할 목적을 위한 것이고, 본 발명의 범주는 청구범위에 의해 정의되기 때문에, 한정하는 것으로 의도되지 않는 것이 인지되어야 한다.

[0040]

다르게 정의되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 용어 및 구절은 그 용어 또는 구절이 사용되는 맥락으로부터 반대되는 것이 명백하게 표시되거나 드러나지 않는 한, 기술분야에서 그 용어 및 구절이 얻은 것과 동일한 의미를 포함한다. 비록 본원에 기술된 것들과 유사하거나 동등한 어떠한 방법들 및 물질들이 본 발명의 실시 또는 시험에 사용될 수 있지만, 특정 방법들 및 물질들을 이제 기술하기로 한다. 언급된 모든 공개물은 본원에 참조로 포함된다.

[0041]

본원에서 관심의 하나 또는 그 이상의 값에 대해 적용되는 용어 "대략"은 표시된 참조 값에 유사한 값을 말한다. 특정 구체예에서, 용어 "대략" 또는 "약"은 맥락으로부터 다르게 표시되지 않는 한 또는 다르게 드러나

지 않는 한 (그런 숫자가 가능한 값의 100%를 초과할 경우는 제외하고) 표시된 참조 값의 25%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% 또는 그 미만에 속하는 값들의 범위를 말한다.

[0042] 본원에 사용되는 용어 "생물학적으로 활성"은 시험관 내에서 또는 생체 내에서 (예컨대 유기체 내에서), 생물학적 시스템에서 활성을 가지는 어떠한 제제의 특징을 말한다. 예를 들어, 유기체에 존재할 때 그 유기체 내에서 생물학적 효과를 나타내는 제제는 생물학적으로 활성인 것으로 여겨진다. 특정 구체예에서, 단백질 또는 폴리펩티드가 생물학적으로 활성인 경우, 그 단백질 또는 폴리펩티드의 적어도 하나의 생물학적 활성을 공유하는 그 단백질 또는 폴리펩티드의 일부는 전형적으로 "생물학적으로 활성" 부분으로서 언급된다.

[0043] 본원에서 사용되는 용어 "비교할만한"은 서로 동일하지 않을 수 있지만, 그들 사이에 비교를 허용할 정도로 충분히 유사하여 관찰된 차이 또는 유사성을 기초로 결론을 타당하게 이끌어낼 수 있을 둘 또는 그 이상의 제제, 독립체, 상황, 상태의 세트 등을 말한다. 기술분야의 숙련자들은 맥락에서, 어떠한 주어진 상황에서 둘 또는 그 이상의 그런 제제, 독립체, 상황, 상태의 세트 등이 비교할만한 것으로 간주되기 위해서는 어느 정도의 동일성이 필요하다는 것을 인지할 것이다.

[0044] 본원에서 보존성 아미노산 치환을 설명하기 위해 사용되는 용어 "보존성"은 한 아미노산 잔기가 유사한 화학적 특성 (예컨대 전하 또는 소수성)을 가지는 측쇄 R 기를 가지는 다른 아미노산 잔기에 의해 치환되는 것을 말한다. 일반적으로, 보존성 아미노산 치환은 실질적으로 단백질의 관심의 기능적 특성, 예를 들면 리간드에 결합하는 수용체의 능력을 변화시키지 않을 것이다. 유사한 화학적 특성을 가지는 측쇄들을 가지는 아미노산 그룹의 실례는 글리신, 알라닌, 발린, 로이신 및 아이소로이신과 같은 지방족 측쇄; 세린 및 쓰레오닌과 같은 지방족-하이드록실 측쇄; 아스파라긴 및 글루타민과 같은 아미드-함유 측쇄; 페닐알라닌, 타이로신 및 트립토판과 같은 방향족 측쇄; 라이신, 아르기닌 및 히스티딘과 같은 염기성 측쇄; 아스파르트산 및 글루탐산과 같은 산성 측쇄; 및 시스테인 및 메티오닌과 같은 황-함유 측쇄를 포함한다. 보존성 아미노산 치환 그룹은 예를 들면 발린/로이신/아이소로이신, 페닐알라닌/타이로신, 라이신/아르기닌, 알라닌/발린, 글루타메이트/아스파테이트 및 아스파라긴/글루타민을 포함한다. 일부 구체예에서, 보존성 아미노산 치환은 예를 들면 알라닌 주사 돌연변이 생성에서 사용되는 것과 같이, 단백질에서 어떠한 천연 잔기의 알라닌으로의 치환일 수 있다. 일부 구체예에서, Gonnet 등에 개시된 PAM250 로그-가능성 매트릭스에서 포지티브 값을 가지는 보존성 치환이 만들어진다 (Gonnet et al. (1992) Exhaustive Matching of the Entire Protein Sequence Database, Science 256:1443-45, 본원에 참조로 포함됨). 일부 구체예에서, 치환은 그 치환이 PAM250 로그-가능성 매트릭스에서 비-네거티브 값을 가지는 중간 보존성 치환이다.

[0045] 본원에서 사용되는 용어 "붕괴"는 DNA 분자로 상동 재조합 사건이 일어난 결과를 말한다 (예컨대 유전자 또는 유전자좌와 같은 내인성 상동 서열을 사용함). 일부 구체예에서, 붕괴는 DNA 서열(들)의 삽입, 결실, 치환, 대체, 미스센스 돌연변이 또는 프레임-쉬프트, 또는 그것들의 조합을 이루거나 나타낼 수 있다. 삽입은 내인성 서열 이외의 기원을 가질 수 있는 전체 유전자 또는 유전자들의 단편, 예컨대 엑손의 삽입을 포함할 수 있다. 일부 구체예에서, 붕괴는 유전자 또는 유전자 생성물의 (예컨대 유전자에 의해 코드화된 단백질의) 발현 및/또는 활성을 증가시킬 수 있다. 일부 구체예에서, 붕괴는 유전자 또는 유전자 생성물의 발현 및/또는 활성을 감소시킬 수 있다. 일부 구체예에서, 붕괴는 코드화된 유전자 또는 유전자 생성물 (예컨대 코드화된 단백질)의 서열을 변경시킬 수 있다. 일부 구체예에서, 붕괴는 유전자 또는 코드화된 유전자 생성물 (예컨대 코드화된 단백질)을 절단 또는 단편화할 수 있다. 일부 구체예에서, 붕괴는 유전자 또는 코드화된 유전자 생성물을 연장시킬 수 있고; 일부 그런 구체예에서, 붕괴는 융합 단백질의 조립을 이를 수 있다. 일부 구체예에서, 붕괴는 유전자 또는 유전자 생성물의 활성이 아닌 수준에 영향을 미칠 수 있다. 일부 구체예에서, 붕괴는 유전자 또는 유전자 생성물의 수준에 중요한 영향을 미치지 않을 수 있다. 일부 구체예에서, 붕괴는 유전자 또는 유전자 생성물의 활성에 중요한 영향을 미치지 않을 수 있다. 일부 구체예에서, 붕괴는 유전자 또는 유전자 생성물의 수준 또는 활성 중 어느 것에든지 중요한 영향을 미치지 않을 수 있다.

[0046] 본원에 사용되는 구절 "내인성 유전자좌" 또는 "내인성 유전자"는 본원에서 기술되는 붕괴, 결실, 대체, 변경 또는 변형의 도입 전에 원래의 또는 참조 유기체에서 발견되는 유전자의 유전자좌를 말한다. 일부 구체예에서, 내인성 유전자좌는 자연적으로 발견되는 서열을 가진다. 일부 구체예에서, 내인성 유전자좌는 야생형이다. 일부 구체예에서, 참조 유기체는 야생형 유기체이다. 일부 구체예에서, 참조 유기체는 엔지니어링된 유기체이다. 일부 구체예에서, 참조 유기체는 (야생형이거나 엔지니어링된 것이거나) 실험실-사육된 유기체이다.

- [0047] 구절 "내인성 프로모터"는 예컨대 야생형 유기체에서, 내인성 유전자와 자연적으로 결합되는 프로모터를 말한다.
- [0048] 본원에서 사용되는 용어 "이종성"은 상이한 공급원으로부터의 제제 또는 독립체를 말한다. 예를 들어, 폴리펩티드, 유전자 또는 유전자 생성물과 관련하여 사용될 때 또는 특정 세포 또는 유기체에 존재하는 경우 그 용어는 관련된 폴리펩티드, 유전자 또는 유전자 생성물이 1) 인간의 손에 의해 엔지니어링되었거나; 2) 인간의 손을 통해 (예컨대 유전자 엔지니어링을 통해) 세포 또는 유기체 (또는 그것의 전구체) 안에 도입되었거나; 및/또는 3) 관련된 세포 또는 유기체 (예컨대 관련된 세포 유형 또는 유기체 유형)에 의해 자연적으로 생성되지 않거나 자연적으로 존재하지 않는 것을 분명하게 나타낸다.
- [0049] 본원에 사용되는 용어 "숙주 세포"는 그 안에 이종성 (예컨대 외인성) 핵산 또는 단백질이 도입되어 있는 세포를 말한다. 숙련자들은 본 개시를 읽음에 따라 그런 용어들이 특정 대상 세포를 언급할뿐만 아니라, 그런 세포의 자손을 언급하는 데에도 사용되는 것을 인지할 것이다. 돌연변이 또는 환경적 영향 중 어느 한 가지로 인해 이어지는 세대에서 특정 변형이 일어날 수 있기 때문에, 그런 자손은 실제로, 부모 세포와 동일하지 않을 수도 있지만, 여전히 본원에서 사용되는 용어 "숙주 세포"의 범주에 포함된다. 일부 구체예에서, 숙주 세포는 원핵 또는 진핵 세포이거나 그것을 포함한다. 일반적으로 숙주 세포는 그 세포가 지정되는 삶의 터전과 관계없이, 이 종성 핵산 또는 단백질을 수용하거나 및/또는 생성하기에 적합한 모든 세포이다.. 예시적인 세포는 원핵세포 및 진핵세포 (단일 세포 또는 다중 세포), 박테리아 세포 (예컨대 대장균, 바실루스 종, 스트렙토마이세스 종 등의 균주들), 미코박테리아 세포, 진균 세포, 효모 세포 (예컨대 맥주 효모균, 사카로마이세스 품종, P. 파스토리스, P. 메타놀리카 등), 식물 세포, 곤충 세포 (예컨대 SF-9, SF-21, 배클로바이러스-감염 곤충 세포, 트라이코플러시아 니 등), 비-인간 동물 세포, 인간 세포 또는, 예를 들면 하이브리도마 또는 쿼드로마와 같은 세포 융합물을 포함한다. 일부 구체예에서, 세포는 인간, 원숭이, 유인원, 햄스터, 쥐 또는 마우스 세포이다. 일부 구체예에서, 세포는 진핵세포이고 다음 세포들로부터 선택된다: CHO (예컨대 CHO K1, DXB-11 CHO, Veggie-CHO), COS (예컨대 COS-7), 망막 세포, Vero, CV1, 신장 (예컨대 HEK293, 293 EBNA, MSR 293, MDCK, HaK, BHK), HeLa, HepG2, WI38, MRC 5, Colo205, HB 8065, HL-60, (예컨대 BHK21), Jurkat, Daudi, A431 (상피), CV-1, U937, 3T3, L 세포, C127 세포, SP2/0, NS-0, MMT 060562, Sertoli 세포, BRL 3 A 세포, HT1080 세포, 콜수종 세포, 종양 세포 및 상기 언급된 세포로부터 유도된 셀라인. 일부 구체예에서, 세포는 하나 또는 그 이상의 바이러스 유전자, 예컨대 바이러스 유전자를 발현하는 망막 세포 (예컨대 PER.C6™ 세포)를 포함한다. 일부 구체예에서, 숙주 세포는 분리된 세포이거나 그것을 포함한다. 일부 구체예에서, 숙주 세포는 조직의 일부이다. 일부 구체예에서, 숙주 세포는 유기체의 일부이다.
- [0050] 본원에서 사용되는 용어 "인간화된"은 그것의 구조 (즉 뉴클레오티드 또는 아미노산 서열)가 비-인간 동물에서 자연적으로 발견되는 특정 유전자 또는 단백질의 구조에 실질적으로 일치하거나 동일하게 일치하는 부분을 포함하고, 또한 관련된 특정 비-인간 유전자 또는 단백질에서 발견되는 것과 상이하고 대신 해당하는 인간 유전자 또는 단백질에서 발견되는 비교할만한 구조들과 보다 밀접하게 일치하는 부분들을 포함하는 핵산 또는 단백질을 나타내는 것으로 기술분야에서 인지되는 의미를 따른다. 일부 구체예에서, "인간화된" 유전자는 실질적으로 인간 폴리펩티드 (예컨대 인간 단백질 또는 그것의 부분 - 예컨대 그것의 특징적인 부분)의 아미노산 서열과 같은 아미노산 서열을 가지는 폴리펩티드를 코드화하는 유전자이다. 한 가지 실례로서, 막 수용체의 경우에, "인간화된" 유전자는 인간 세포 외 부분의 아미노산 서열과 같은 아미노산 서열 및 비-인간 (예컨대 마우스) 폴리펩티드의 서열과 같은 나머지 서열을 가지는 세포 외 부분을 가지는 폴리펩티드를 코드화할 수 있다. 일부 구체예에서, 인간화된 유전자는 인간 유전자의 DNA 서열의 적어도 일부를 포함한다. 일부 구체예에서, 인간화된 유전자는 인간 유전자의 전체 DNA 서열을 포함한다. 일부 구체예에서, 인간화된 단백질은 인간 단백질에서 나타나는 부분을 가지는 서열을 포함한다. 일부 구체예에서, 인간화된 단백질은 인간 단백질의 전체 서열을 포함하고 인간 유전자의 상동체 또는 오르토로그에 해당하는 비-인간 동물의 내인성 유전자로부터 발현된다.
- [0051] 본원에서 서열의 비교와 관련하여 사용되는 용어 "동일성"은 뉴클레오티드 및/또는 아미노산 서열 동일성을 측정하기 위해 사용될 수 있는, 기술분야에서 공지되어 있는 많은 상이한 알고리즘에 의해 측정되는 것과 같은 동일성을 말한다. 일부 구체예에서, 본원에서 기술되는 동일성은 10.0의 오픈 캡 페널티, 0.1의 연장 캡 페널티를 사용하는 ClustalW v. 1.83 (느린) 배열을 사용하고, Gonnet 유사성 매트릭스 (MACVECTOR™ 10.0.2, Mac Vector Inc., 2008)를 사용하여 측정된다.
- [0052] 본원에서 사용되는 용어 "분리된"은 (1) 처음에 생성될 때 (자연적으로 및/또는 실험적 환경에서 어느 쪽이든) 그것과 결합된 성분들의 적어도 일부로부터 분리된, 및/또는 (2) 인간의 손에 의해 디자인되거나, 생성되거나,

제조되거나 및/또는 제작된 물질 및/또는 독립체를 말한다. 분리된 물질 및/또는 독립체는 처음에 결합되었던 다른 성분들의 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% 이상으로부터 분리될 수 있다. 일부 구체예에서, 분리된 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% 이상 순수하다. 본원에서 사용될 때, 물질은 다른 성분들이 실질적으로 없다면 "순수"하다. 일부 구체예에서, 기술분야의 숙련자들에 의해 인지될 것과 같이, 물질은 예를 들면 하나 또는 그 이상의 담체 또는 부형제 (예컨대 완충액, 용매, 물 등)와 같은 특정한 다른 성분들과 조합된 후에, 여전히 "분리된" 또는 심지어 "순수한" 것으로 여겨질 수 있고; 그런 구체예에서, 물질의 % 분리 또는 순도는 그런 담체 또는 부형제를 포함하지 않고 계산된다. 실제로서, 일부 구체예에서, 자연적으로 발생하는 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드와 같은 생물학적 중합체는 a) 그것의 기원 또는 유도체화의 공급원에 의해 자연적으로 그것의 천연 상태에서 수반되는 성분들의 일부 또는 전부와 결합되어 있지 않은 경우; b) 자연적으로 그것을 생성하는 종들로부터 동일 종의 다른 폴리펩티드 또는 핵산이 실질적으로 없는 경우; c) 자연적으로 그것을 생성하는 종의 것이 아닌 세포 또는 다른 발현 시스템으로부터의 성분들에 의해 발현되거나 그렇지 않으면 그런 성분들과 결합되어 있는 경우에 "분리된" 것으로 여겨진다. 그러므로, 예를 들어, 일부 구체예에서, 화학적으로 합성되거나 또는 자연적으로 그것을 생성하는 것과 상이한 세포 시스템에서 합성되는 폴리펩티드는 "분리된" 폴리펩티드인 것으로 여겨진다. 다르게는 또는 추가로, 일부 구체예에서, 하나 또는 그 이상의 정제 기법이 시행된 폴리펩티드는 그것이 a) 자연적으로 결합되어 있거나; 및/또는 b) 처음에 생성될 때에 결합되어 있던 다른 성분들로부터 분리된 정도로 "분리된" 폴리펩티드인 것으로 여겨질 수 있다.

[0053] 본원에서 사용되는 구절 "비-인간 동물"은 인간이 아닌 어떠한 척추동물 유기체를 말한다. 일부 구체예에서, 비-인간 동물은 원구류, 경골어류, 연골어류 (예컨대 상어 또는 가오리), 양서류, 파충류, 포유류 및 조류이다. 일부 구체예에서, 비-인간 동물은 영장류, 염소, 양, 돼지, 개, 소 또는 설치류이다. 일부 구체예에서, 비-인간 동물은 쥐 또는 마우스와 같은 설치류이다.

[0054] 본원에서 사용되는 구절 "핵산"은 가장 광범위한 의미로, 올리고뉴클레오티드 사슬이거나 그 안으로 통합될 수 있는 어떠한 화합물 및/또는 물질을 말한다. 일부 구체예에서, 핵산은 올리고뉴클레오티드 사슬이거나 포스포다이에스테르 연쇄를 통해 그 안으로 통합될 수 있는 어떠한 화합물 및/또는 물질을 말한다. 맥락으로부터 명백해지는 것과 같이, 일부 구체예에서, "핵산"은 개별적인 핵산 잔기들 (예컨대 뉴클레오티드 및/또는 뉴클레오시드)을 말하고; 일부 구체예에서 "핵산"은 개별적인 핵산 잔기를 포함하는 올리고뉴클레오티드 사슬을 말한다. 일부 구체예에서, "핵산"은 RNA이거나 그것을 포함하고; 일부 구체예에서, "핵산"은 DNA이거나 그것을 포함한다. 일부 구체예에서, 핵산은 하나 또는 그 이상의 천연 핵산 잔기이거나, 그것을 포함하거나, 그것으로 구성된다. 일부 구체예에서, 핵산은 하나 또는 그 이상의 핵산 유사체이거나, 그것을 포함하거나, 그것으로 구성된다. 일부 구체예에서, 핵산 유사체는 포스포다이에스테르 골격을 활용하지 않는다는 점에서 핵산과 다르다. 예를 들어 일부 구체예에서, 핵산은 기술분야에 공지되어 있고 골격에 포스포다이에스테르 결합 대신 펩티드 결합을 가지며, 본 발명의 범주 내에 있는 것으로 여겨지는, 하나 또는 그 이상의 "펩티드 핵산"이거나, 그것을 포함하거나, 그것으로 구성된다. 다르게는 또는 추가로, 일부 구체예에서, 핵산은 포스포다이에스테르 결합보다는 하나 또는 그 이상의 포스포로티오에이트 및/또는 5'-N-포스포라미다이트 연쇄를 가진다. 일부 구체예에서, 핵산은 하나 또는 그 이상의 천연 뉴클레오시드 (예컨대 아데노신, 티미딘, 구아노신, 시티딘, 우리딘, 데옥시아데노신, 데옥시티미딘, 데옥시구아노신 및 데옥시시티딘)이거나, 그것을 포함하거나, 그것으로 구성된다. 일부 구체예에서, 핵산은 하나 또는 그 이상의 뉴클레오시드 유사체 (예컨대 2-아미노아데노신, 2-티오티미딘, 이노신, 피롤로-파리미딘, 3-메틸 아데노신, 5-메틸시티딘, C-5 프로피닐-시티딘, C-5 프로피닐-우리딘, 2-아미노아데노신, C5-브로모우리딘, C5-플루오로우리딘, C5-요오도우리딘, C5-프로피닐-우리딘, C5-프로피닐-시티딘, C5-메틸시티딘, 2-아미노아데노신, 7-데아자아데노신, 7-데아자구아노신, 8-옥소아데노신, 8-옥소구아노신, O(6)-메틸구아닌, 2-티오시티딘, 메틸화된 염기, 삽입된 염기 및 그것들의 조합)이거나, 그것을 포함하거나, 그것으로 구성된다. 일부 구체예에서, 핵산은 천연 핵산에서의 것들과 비교하여 하나 또는 그 이상의 변형 당 (예컨대 2'-플루오로리보오스, 리보오스, 2'-데옥시리보오스, 아라비노오스 및 헥소오스)을 포함한다. 일부 구체예에서, 핵산은 RNA 또는 단백질과 같은 기능성 유전자 생성물을 코드화하는 뉴클레오티드 서열을 가진다. 일부 구체예에서, 핵산은 하나 또는 그 이상의 인트론을 포함한다. 일부 구체예에서, 핵산은 천연 공급원으로부터의 분리, 상보하는 주형을 기초로 한 중합화에 의한 효소적 합성 (생체 내에서 또는 시험관 내에서의), 재조합 세포 또는 시스템에서의 재생 및 화학적 합성 중 하나 또는 그 이상에 의해 제조된다. 일부 구체예에서, 핵산은 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, 20, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425,

450, 475, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000 또는 그 이상의 잔기의 길이이다. 일부 구체예에서, 핵산은 단일 가닥이고; 일부 구체예에서, 핵산은 이중 가닥이다. 일부 구체예에서 핵산은 폴리펩티드를 코드화하는, 또는 폴리펩티드를 코드화하는 서열의 상보물인 적어도 하나의 요소를 포함하는 뉴클레오티드 서열을 가진다. 일부 구체예에서, 핵산은 효소적 활성을 가진다.

[0055]

본원에서 사용되는 구절 "작동가능하게 연결되어 있는"은 기술된 화합물들이 그것들의 의도된 방식으로 기능하는 것을 허용하는 관계로 존재하는 병렬상태를 말한다. 코딩 서열에 "작동가능하게 연결되어 있는" 대조 서열은 코딩 서열의 발현이 대조 서열과 부합하는 조건하에서 이루어지는 그런 방식으로 결찰된다. "작동가능하게 연결되어 있는" 서열은 관심의 유전자와 연속적인 발현 제어 서열 및 관심의 유전자를 제어하기 위해 트랜스로 또는 거리를 두고 작용하는 발현 제어 서열 둘 다를 포함한다. 본원에서 사용되는 용어 "발현 제어 서열"은 결찰되는 코딩 서열의 발현 및 프로세싱을 이루기 위해 필요한 폴리뉴클레오티드 서열을 말한다. 발현 제어 서열은 적절한 전사 개시, 종결, 프로모터 및 인핸서 서열; 스플라이싱 및 폴리아데닐화 신호와 같은 효과적인 RNA 프로세싱 신호; 세포질 mRNA를 안정화시키는 서열; 번역 효율을 증강시키는 서열 (즉 Kozac 일치 서열); 단백질 안정성을 증강시키는 서열; 및 필요한 경우 단백질 분비를 증강시키는 서열을 포함한다. 그런 제어 서열의 본질은 숙주 유기체에 따라 상이하다. 예를 들어, 원핵세포에서, 그런 제어 서열은 일반적으로 프로모터, 리보솜성 결합 부위 및 전사 종결 서열을 포함하는 한편, 진핵세포에서는 전형적으로 그런 제어 서열은 프로모터와 전사 종결 서열을 포함한다. 용어 "제어 서열"은 그것의 존재가 발현 및 프로세싱에 필수적인 성분들을 포함하는 것으로 의도되고, 또한 그것의 존재가 유익한 추가 성분들, 예를 들면 리더 서열 및 융합 파트너 서열을 포함할 수 있다.

[0056]

본원에서 사용되는 용어 "폴리펩티드"는 아미노산들의 어떠한 중합체 사슬을 말한다. 일부 구체예에서, 폴리펩티드는 자연적으로 발생하는 아미노산 서열을 가진다. 일부 구체예에서, 폴리펩티드는 자연적으로 발생하지 않는 아미노산 서열을 가진다. 일부 구체예에서, 폴리펩티드는 인간의 손을 통해 디자인되고 및/또는 생성된다는 점에서 엔지니어링되는 아미노산 서열을 가진다.

[0057]

본원에서 사용되는 용어 "재조합"은 재조합 수단에 의해 디자인되거나, 엔지니어링되거나, 발현되거나, 생성되거나 또는 분리되는 폴리펩티드 (예컨대 본원에서 기술되는 신호-조절 단백질), 예컨대 숙주 세포 안에 트랜스페션된 재조합 발현 벡터를 사용하여 발현된 폴리펩티드, 재조합된 조합 인간 폴리펩티드 라이브러리로부터 분리된 폴리펩티드 (Hoogenboom H. R., (1997) TIB Tech. 15:62-70; Azzazy H., and Highsmith W. E., (2002) Clin. Biochem. 35:425-445; Gavilondo J. V., and Lerrick J. W. (2002) BioTechniques 29:128-145; Hoogenboom H., and Chames P. (2000) Immunology Today 21:371-378), 인간 면역글로불린 유전자에 대해 유전자 도입된 동물 (예컨대 마우스)로부터 분리된 항체 (예컨대 Taylor, L. D., et al. (1992) Nucl. Acids Res. 20:6287-6295; Kellermann S-A., and Green L. L. (2002) Current Opinion in Biotechnology 13:593-597; Little M. et al (2000) Immunology Today 21:364-370 참조) 또는 서로에 대해 선택된 서열 요소를 스플라이싱하는 것을 포함하는 어떠한 다른 수단에 의해 제조된, 발현된, 생성된 또는 분리된 폴리펩티드를 말하는 것으로 의도된다. 일부 구체예에서, 그렇게 선택된 하나 또는 그 이상의 서열 요소는 자연적으로 발견된다. 일부 구체예에서, 그렇게 선택된 하나 또는 그 이상의 서열 요소는 가상 환경에서 디자인된다. 일부 구체예에서, 그렇게 선택된 하나 또는 그 이상의 서열 요소는 공지된 서열 요소의 돌연변이 생성으로부터 (예컨대 생체 내 또는 시험관 내에서의), 예컨대 천연 또는 합성 공급원으로부터 유발된다. 예를 들어, 일부 구체예에서, 재조합 폴리펩티드는 관심의 공급 유기체 (예컨대 인간, 마우스 등)의 게놈에서 발견되는 서열들로 구성된다. 일부 구체예에서, 재조합 폴리펩티드는 돌연변이 생성으로부터 (예컨대 시험관 내에서 또는 생체 내에서, 예를 들면 비-인간 동물에서) 유발된 아미노산 서열을 가짐으로써, 그 재조합 폴리펩티드의 아미노산 서열은 폴리펩티드 서열로부터 기원하고 그것과 관련되는 한편으로, 비-인간 동물의 게놈 내에서 생체 내에서 자연적으로 존재하지 않을 수 있다.

[0058]

본원에서 사용되는 용어 "대체"는 숙주 유전자좌 (예컨대 게놈)에서 발견되는 "대체된" 핵산 서열 (예컨대 유전자)이 그 유전자좌로부터 제거되고 상이한, "대체" 핵산이 그 자리에 위치하게 되는 과정을 말한다. 일부 구체예에서, 대체된 핵산 서열 및 대체 핵산 서열은 예를 들면, 그것들이 서로에 대해 상동하고 및/또는 해당하는 요소들 (예컨대 단백질-코딩 요소, 조절 요소 등)을 함유한다는 점에서 서로에 비교할 만한다. 일부 구체예에서, 대체된 핵산 서열은 하나 또는 그 이상의 프로모터, 인핸서, 스플라이스 공여 부위, 스플라이스 수용 부위, 인트론, 엑손, 미번역 영역 (UTR)을 포함하고; 일부 구체예에서, 대체 핵산 서열은 하나 또는 그 이상의 코딩 서열을 포함한다. 일부 구체예에서, 대체 핵산 서열은 대체된 핵산 서열의 상동체이다. 일부 구체예에서, 대체 핵산 서열은 대체된 서열의 오르토로그이다. 일부 구체예에서, 대체 핵산 서열은 인간 핵산 서열이거

나 그것을 포함한다. 대체 핵산 서열이 인간 핵산 서열이거나 그것을 포함하는 것을 포함하는 일부 구체예에서, 대체된 핵산 서열은 설치류 서열 (즉 마우스 서열)이거나 그것을 포함한다. 그렇게 배치된 핵산 서열은 그렇게 배치된 서열을 얻기 위해 사용된 공급원 핵산 서열의 일부인 하나 또는 그 이상의 조절 서열 (예컨대 프로모터, 인핸서, 5'- 또는 3'-미번역 영역 등)을 포함할 수 있다. 예를 들어, 다양한 구체예에서, 대체는 그렇게 배치된 핵산 서열 (이종성 서열을 포함함)로부터 유전자 생성물을 생성하지만, 내인성 서열은 발현하지 않는 이종성 서열로 내인성 서열을 치환하는 것이고; 대체는 내인성 서열에 의해 코드화된 단백질과 유사한 기능을 가지는 단백질을 코드화하는 핵산 서열을 가지는 내인성 게놈 서열의 것이다 (예컨대 내인성 게놈 서열은 SIRP α 단백질을 코드화하고, DNA 단편은 하나 또는 그 이상의 인간 SIRP α 단백질을 코드화한다). 다양한 구체예에서, 내인성 유전자 또는 그것의 단편은 해당하는 인간 유전자 또는 그것의 단편으로 대체된다. 해당하는 인간 유전자 또는 그것의 단편은, 구조 및/또는 기능에서, 대체되는 내인성 유전자 또는 그것의 단편의 오르토로그이거나, 또는 그것과 실질적으로 유사하거나 동일한 인간 유전자 또는 단편이다.

[0059] 본원에서 사용되는 구절 "신호-조절 단백질" 또는 "SIRP"는 신호-조절 단백질 수용체, 예컨대 SIRP α 수용체를 말한다. SIRP는 세포 표면에서 발현되고 백혈구 상에서 막표면 단백질들 사이의 상호작용에 포함된 조절 단백질로서 작용하는 원형질막 수용체를 포함한다. SIRP 유전자 내에서, 다형태 변이체가 인간 대상에서 기술되어 있다. 인간 및 마우스 SIRP 유전자의 뉴클레오티드 및 아미노산 서열은 표 1에 예시로 제공된다. 숙련자들은 본 개시를 읽을 때에 게놈의 하나 또는 그 이상의 (또는 전부의) 내인성 SIRP 수용체 유전자가 하나 또는 그 이상의 이종성 SIRP 유전자 (예컨대 다형태 변이체, 하위유형 또는 돌연변이, 다른 종으로부터의 유전자들, 인간화된 형태 등)에 의해 대체될 수 있음을 인지할 것이다.

[0060] 본원에서 사용되는 "SIRP-발현 세포"는 신호-조절 단백질 수용체를 발현하는 세포를 말한다. 일부 구체예에서, SIRP-발현 세포는 그것의 표면에 신호-조절 단백질 수용체를 발현한다. 일부 구체예에서, SIRP 단백질은 세포 표면에 발현된 SIRP 단백질을 통해 세포-대-세포 상호작용을 중재하기에 충분한 양으로 세포 표면에 발현된다. 예시적인 SIRP-발현 세포는 뉴런, 림프구, 골수성 세포, 마크로파지, 호중구 및 천연 킬러 (NK) 세포를 포함한다. SIRP-발현 세포는 다양한 외래 항원 또는 병원체에 대한 면역 반응을 조절하기 위해 면역 세포들의 상호작용을 조절한다. 일부 구체예에서, 본 발명의 비-인간 동물은 비-인간 동물의 하나 또는 그 이상의 세포의 표면에 발현된 인간화된 SIRP 수용체들을 통한 면역 세포 조절을 증명한다.

[0061] 본원에서 사용되는 용어 "실질적으로"는 관심의 특징 또는 특성을 전체적인 또는 거의 전체적인 크기 또는 정도로 나타내는 질적인 상태를 말한다. 생물학적 기술분야의 숙련자는 생물학적 및 화학적 현상은 완성되거나 및/ 또는 완전하게 진행되거나 또는 절대적인 결과를 이루거나 회피하는 경우는 거의 없다는 것을 인지할 것이다. 그러므로 용어 "실질적으로"는 본원에서 많은 생물학적 및 화학적 현상에 고유한 완전성의 잠재적인 결핍을 포착하기 위해 사용된다.

[0062] 본원에서 사용되는 구절 "실질적인 상동성"은 아미노산 또는 핵산 서열들 사이의 비교를 말한다. 기술분야의 숙련자들에 의해 인지되는 것과 같이, 두 개의 서열은 일반적으로, 만약 해당하는 위치에 상동하는 잔기를 함유한다면 "실질적으로 상동하는" 것으로 여겨진다. 상동성 잔기는 동일한 잔기일 수 있다. 다르게는, 상동하는 잔기는 동일하지 않은 잔기일 수 있고, 적절하게 유사한 구조적 및/또는 기능적 특성을 가질 것이다. 예를 들어 기술분야의 숙련자들에 의해 인지되는 것과 같이, 특정 아미노산들은 전형적으로 "소수성" 또는 "친수성" 아미노산으로, 및/또는 "극성" 또는 "비-극성" 측쇄를 가지는 것으로서 분류된다. 동일 유형의 다른 아미노산에 대한 한 아미노산의 치환은 자주 "상동성" 치환으로서 여겨질 수 있다. 전형적인 아미노산 범주화를 표 1 및 2에 요약한다.

표 1

[0063]	알라닌	Ala	A	비극성	중성	1.8
	아르기닌	Arg	R	극성	포지티브	-4.5
	아스파라긴	Asn	N	극성	중성	-3.5
	아스파르트산	Asp	D	극성	네거티브	-3.5
	시스테인	Cys	C	비극성	중성	2.5
	글루탐산	Glu	E	극성	네거티브	-3.5
	글루타민	Gln	Q	극성	중성	-3.5
	글리신	Gly	G	비극성	중성	-0.4
	히스티딘	His	H	극성	포지티브	-3.2
	아이소로이신	Ile	I	비극성	중성	4.5

로이신	Leu	L	비극성	중성	3.8
라이신	Lys	K	극성	포지티브	-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
쓰레오닌	Thr	T	극성	중성	-0.7
트립토판	Trp	W	비극성	중성	-0.9
타이로신	Tyr	Y	극성	중성	-1.3
발린	Val	V	비극성	중성	4.2

표 2

[0064]

명료하지 않은 아미노산	3-문자	1-문자
아스파라긴 또는 아스파르트산	Asx	B
글루타민 또는 글루탐산	Glx	Z
로이신 또는 아이소로이신	Xle	J
명시되지 않거나 미지의 아미노산	Xaa	X

[0065] 본 기술분야에서 잘 알려져 있는 것과 같이, 아미노산 또는 핵산 서열은 뉴클레오티드 서열에 대한 BLASTN 및 아미노산 서열에 대한 BLASTP, 캡이 있는 BLAST 및 PSI-BLAST와 같은 상업적 컴퓨터 프로그램들 중에서 이용 가능한 것들을 포함하여, 다양한 알고리즘 중 어느 것을 사용하여 비교될 수 있다. 예시적인 그런 프로그램들은 문헌에 기술되어 있다 (Altschul, et al, Basic local alignment search tool, *J. Mol. Biol.*, 215(3): 403-410, 1990; Altschul, et al, *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, 1997; Baxevanis, et al., *Bioinformatics: A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins*, Wiley, 1998; and Misener, et al., (eds.), *Bioinformatics Methods and Protocols* (Methods in Molecular Biology, Vol. 132), Humana Press, 1999). 상동성 서열의 확인 외에, 상기 언급된 프로그램들은 전형적으로 상동성 정도의 지표를 제공한다. 일부 구체예에서, 두 개의 서열은 그것들의 해당하는 잔기의 적어도 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상이 관련된 잔기들의 구역에 걸쳐 상동성이라면 실질적으로 상동하는 것으로 여겨진다. 일부 구체예에서, 관련된 구역은 적어도 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 또는 그 이상의 잔기이다. 일부 구체예에서, 관련된 구역은 완전한 서열을 따라 연속적인 잔기들을 포함한다. 일부 구체예에서, 관련된 구역은 완전한 서열을 따라 불연속적인 잔기들을 포함한다. 일부 구체예에서, 관련된 구역은 적어도 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 또는 그 이상의 잔기이다.

[0066] 본원에서 사용되는 구절 "실질적인 동일성"은 아미노산 또는 핵산 서열들 사이의 비교를 말한다. 기술분야의 숙련자들에 의해 인지되는 것과 같이, 두 개의 서열은 일반적으로 해당하는 위치들에 동일한 잔기들을 함유한다면 "실질적으로 동일한" 것으로 여겨진다. 본 기술분야에 잘 알려져 있는 것과 같이, 아미노산 또는 핵산 서열은 뉴클레오티드 서열에 대한 BLASTN 및 아미노산 서열에 대한 BLASTP, 캡이 있는 BLAST 및 PSI-BLAST와 같은 상업적 컴퓨터 프로그램들 중에서 이용 가능한 것들을 포함하여, 다양한 알고리즘 중 어느 것을 사용하여 비교될 수 있다. 예시적인 그런 프로그램들은 문헌에 기술되어 있다 (Altschul, et al, Basic local alignment search tool, *J. Mol. Biol.*, 215(3): 403-410, 1990; Altschul, et al, *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, 1997; Baxevanis, et al., *Bioinformatics : A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins*, Wiley, 1998; and Misener, et al., (eds.), *Bioinformatics Methods and Protocols* (Methods in Molecular Biology, Vol. 132), Humana Press, 1999). 동일한 서열의 확인 외에, 상기 언급된 프로그램들은 전형적으로 동일성 정도의 지표를 제공한다. 일부 구체예에서, 두 개의 서열은 그것들의 해당하는 잔기의 적어도 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상이 관련된 잔기들의 구역에 걸쳐 동일하다면 실질적으로 동일한 것으로 여겨진다. 일부 구체예에서, 관련된 구역은 완전한 서열이다. 일부 구체예에서, 관련된 구역은 적어도 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 또는 그 이상의 잔기이다.

[0067] 본원에서 사용되는 구절 "표적화 벡터" 또는 "표적화 구성물"은 표적화 영역을 포함하는 폴리뉴클레오티드 분자

를 말한다. 표적화 영역은 표적 세포, 조직 또는 동물의 서열에 동일하거나 또는 실질적으로 동일하고 상동 재조합을 통해 세포, 조직 또는 동물의 계놈 내에 있는 위치에 표적화 구성물의 통합을 제공하는 서열을 포함한다. 부위-특이적 재조합효소 인식 부위 (예컨대 *IoxP* 또는 *Frt* 부위)를 사용하여 표적화하는 표적화 영역이 또한 포함된다. 일부 구체예에서, 본 발명의 표적화 구성물은 추가로 특별한 관심의 핵산 서열 또는 유전자, 선택 가능한 마커, 제어 및 또는 조절 서열 및 그런 서열들을 포함하는 재조합을 보조하거나 촉진하는 단백질의 외인성 첨가를 통해 중재된 재조합을 허용하는 다른 핵산 서열들을 포함한다. 일부 구체예에서, 본 발명의 표적화 구성물은 추가로 관심의 유전자를 전체적으로 또는 부분적으로 포함하며, 이때 관심의 유전자는 내인성 서열에 의해 코드화된 단백질과 유사한 기능을 가지는 단백질을 전체적으로 또는 부분적으로 코드화하는 이종성 유전자이다.

[0068]

본원에서 사용되는 용어 "변이체"는 참조 독립체와 비교하여 하나 또는 그 이상의 화학적 부분의 존재 또는 수준에서 참조 독립체와 구조적으로 상이하지만 참조 독립체와 상당한 구조적 동일성을 보이는 독립체를 말한다. 많은 구체예에서, 변이체는 또한 참조 독립체와 기능적으로 상이하다. 일반적으로, 특정 독립체가 참조 독립체의 "변이체"인 것으로 적절하게 여겨지는 여부는 그것과 참조 독립체와의 구조적 동일성 정도를 기초로 한다. 기술분야의 숙련자들에 의해 인지되는 것과 같이, 어떠한 생물학적 또는 화학적 참조 독립체는 특정한 특정적인 구조적 요소를 가진다. 변이체는, 정의에 의하면, 하나 또는 그 이상의 그런 특정적인 구조적 요소를 공유하는 구별되는 화학적 독립체이다. 일부 실례로, 작은 분자는 특정적인 코어 구조 요소 (예컨대 거대고리 코어) 및/또는 하나 또는 그 이상의 특정적인 펜던트 부분을 가질 수 있어서, 작은 분자의 변이체는 코어 구조 요소 및 특정적인 펜던트 부분을 공유하지만 다른 펜던트 부분 및/또는 코어 내에 존재하는 결합의 유형에서 상이한 (단일 대 이중, E 대 Z 등) 것이고, 폴리펩티드는 선상으로 또는 삼차원 공간으로 서로 관련된 표시된 위치를 가지고 및/또는 특정 생물학적 기능에 기여하는 다수의 아미노산으로 구성되는 특정적인 요소를 가질 수 있으며, 핵산은 선상으로 또는 삼차원 공간에서 서로와 관련된 표시된 위치를 가지는 다수의 뉴클레오티드 잔기들로 구성된 특정적인 서열 요소를 가질 수 있다. 예를 들어, 변이 폴리펩티드는 폴리펩티드 골격에 공유적으로 부착된 아미노산 서열의 하나 또는 그 이상의 차이 및/또는 화학적 부분 (예컨대 탄수화물, 지질 등)의 하나 또는 그 이상의 차이의 결과로서 참조 폴리펩티드와 상이할 수 있다. 일부 구체예에서, 변이 폴리펩티드는 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 또는 99%인, 참조 폴리펩티드와의 전체적인 서열 동일성을 나타낸다. 다르게는 또는 추가로, 일부 구체예에서, 변이 폴리펩티드는 참조 폴리펩티드와 적어도 하나의 특정적인 서열 요소를 공유하지 않는다. 일부 구체예에서, 참조 폴리펩티드는 하나 또는 그 이상의 생물학적 활성을 가진다. 일부 구체예에서, 변이 폴리펩티드는 참조 폴리펩티드의 하나 또는 그 이상의 생물학적 활성을 공유한다. 일부 구체예에서, 변이 폴리펩티드는 참조 폴리펩티드의 하나 또는 그 이상의 생물학적 활성이 부족하다. 일부 구체예에서, 변이 폴리펩티드는 참조 폴리펩티드와 비교하여 하나 또는 그 이상의 생물학적 활성의 감소된 수준을 보여준다. 많은 구체예에서, 관심의 폴리펩티드는, 관심의 폴리펩티드가 원래의 아미노산 서열과 동일하지만 특정 위치에서 적은 수의 서열 변경을 가지는 아미노산 서열을 가진다면 원래의 또는 참조 폴리펩티드의 "변이체"인 것으로 여겨진다. 전형적으로, 변이체의 잔기의 20%, 15%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%보다 적은 잔기들이 원래의 것들과 비교하여 치환된다. 일부 구체예에서, 변이체는 원래의 것과 비교하여 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 또는 1개의 치환된 잔기를 가진다. 보통, 변이체는 매우 적은 수의 (예컨대 5, 4, 3, 2 또는 1보다 적은) 치환된 기능성 잔기 (즉 특정 생물학적 활성에 관여하는 잔기)를 가진다. 나아가, 변이체는 전형적으로 5, 4, 3, 2 또는 1개보다 많지 않은 첨가 또는 결실을 가지며, 보통 원래의 것과 비교하여 첨가 또는 결실을 갖지 않는다. 더욱이, 어떠한 첨가 또는 결실이든지 전형적으로 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 6개보다 적으며, 통상 약 5, 약 4, 약 3 또는 약 2개 잔기보다 적다. 일부 구체예에서, 원래의 또는 참조 폴리펩티드는 자연적으로 발견되는 것이다. 기술분야의 숙련자들에 의해 인지되는 것과 같이, 관심의 특정 폴리펩티드의 다수의 변이체들은 보통, 특히 관심의 폴리펩티드가 감염성 제제 폴리펩티드인 경우, 자연적으로 발견될 수 있다.

[0069]

본원에서 사용되는 용어 "벡터"는 그것이 결합되는 다른 핵산을 수송할 수 있는 핵산 분자를 말하다. 일부 구체예에서, 벡터는 진핵세포 및/또는 원핵세포와 같은 숙주 세포에서 연결되어 있는 핵산을 염색체-외 복제 및/또는 발현시킬 수 있다. 작동가능하게 연결되어 있는 유전자들의 발현을 지시할 수 있는 벡터들은 본원에서 "발현 벡터"로서 언급된다.

[0070]

본원에서 사용되는 용어 "야생형"은 자연에서 "정상" (돌연변이, 질환에 걸린, 변경된 등과 대조적인) 상태 또는 맥락에서 발견되는 것과 같은 구조 및/또는 활성을 가지는 독립체를 나타내는, 기술분야에서 인지되는 의미를 가진다. 기술분야의 숙련자들은 야생형 유전자 및 폴리펩티드들인 보통 다수의 상이한 형태 (예컨대 대립유

전자)로 존재하는 것을 인지할 것이다.

[0071] 상세한 설명

본 발명은, 다른 것들 중에서도, 이식 접목, 식세포 작용의 활성화 및 신호 변환에서의 평가를 위해 신호-조절 단백질 (예컨대 SIRP)을 코드화하는 인간화된 유전자 물질을 가지는 개선된 및/또는 엔지니어링된 비-인간 동물을 제공한다. 그런 비-인간 동물은 인간 세포의 이식 접목에서 개선을 제공하는 것으로 여겨진다. 그러므로, 본 발명은 비-인간 동물에서 인간 조혈 세포를 유지하는 데 특히 유용하다. 특히, 본 발명은 비-인간 동물의 세포의 원형질막 표면에서 인간화된 단백질의 발현을 초래하는 설치류 SIRP α 유전자의 인간화를 포함한다. 그런 인간화된 단백질은 이식된 인간 세포의 표면상에 존재하는 인간화된 SIRP α 단백질 및 리간드의 맞물림을 통해 이식된 인간 세포를 인식하는 능력을 가진다. 일부 구체예에서, 본 발명의 비-인간 동물은 이식된 인간 조혈 세포를 수용할 수 있고; 일부 구체예에서, 그런 비-인간 포유류는 인간 세포를 포함하는 면역 시스템을 발생시키거나 및/또는 가진다. 일부 구체예에서, 인간화된 SIRP α 단백질은 인간 SIRP α 단백질의 아미노산 잔기 28 내지 362에 해당하는 서열을 가진다. 일부 구체예에서, 본 발명의 비-인간 동물은 비-인간 동물 및 이종성 종 (예컨대 인간)으로부터의 유전자 물질을 함유하는 내인성 SIRP α 유전자를 포함한다. 일부 구체예에서, 본 발명의 비-인간 동물은 인간화된 SIRP α 유전자를 포함하고, 이때 인간화된 SIRP α 유전자는 인간 SIRP α 유전자의 엑손 2, 3 및 4를 포함한다.

발명의 다양한 측면이 다음 단원들에서 상세하게 설명된다. 단원들의 사용은 발명을 제한하는 것을 의미하지 않는다. 각 단원은 발명의 어떠한 측면에든지 적용될 수 있다. 본 출원에서 "또는"의 사용은 다른 언급이 없는 한 "및/또는"을 의미한다.

[0074] 신호-조절 단백질 (SIRP) 유전자 패밀리

신호-조절 단백질 (SIRP)은 립프구, 골수성 세포 (마크로파지, 호중구, 과립구, 골수성 수지상 세포 및 비만 세포를 포함함) 및 뉴런 상에서 발현되는 세포 표면 당단백질의 패밀리를 구성한다 (예컨대 Barclay and Brown, 2006, Nat Rev Immunol 6, 457-464 참조). 여러 SIRP 유전자가 보고되어 있고, 그것들은 각각의 리간드 및 그 것들의 포함되는 신호화 유형에 의해 범주화될 수 있다. SIRP α (또한 CD172A, SHPS1, P84, MYD-1, BIT 및 PTPNS1로도 언급됨)는 골수종 계통의 면역 세포들상에서 발현되고, 면역수용체 타이로신-기초 억제 모티프 (ITEM)를 통해 억제 수용체로서 기능한다. SIRP α 발현은 또한 뉴런들 상에서도 관찰되었다. SIRP α 에 대해 보고된 리간드들은 가장 현저하게는 CD47을 포함하지만, 또한 계면활성제 단백질 A 및 D를 포함한다. SIRP β (또한 CD 172b로서도 언급됨)는 마크로파지 및 호중구 상에서 발현되지만, 알려진 리간드들은 보고된 것이 없다. SIRP β 는 SIRP α 에 비교하여 짧은 세포질 영역을 함유하고 DNAX 활성화 단백질 12 (DAP12)로서 알려져 있는 신호화 성분과 결합하는 것으로 알려져 있다. 그러므로, SIRP β 는 활성화 수용체인 것으로 여겨진다. SIRP γ (또한 CD172g 및 SIRP β 2로서도 언급됨)는 립프구 및 천연 킬러 세포상에서 발현되고 또한 CD47에 결합하지만, 세포질 꼬리만이 4개의 아미노산을 함유하고 DAP12와의 결합을 촉진할 서열이 부족하기 때문에 신호화 기능이 보고된 것은 없다. 다른 구성원, SIRP δ 도 기술되었고 가용성 수용체로서 존재한다.

특히 SIRP α 의 역할은 마크로파지에 의한 숙주 세포의 식세포 작용에서 그것의 억제 역할의 관점에서 조사되었다. 예를 들어 마크로파지상에서 SIRP α 에 대한 CD47 결합은 억제 신호를 야기하고, 그것은 식세포 작용을 네거티브하게 조절한다. 다르게는, SIRP α 결합을 통해 중재된 포지티브 신호화가 보고되었다 (Shultz et al., 1995, J Immunol 154, 180-91).

[0077] SIRP α 서열

인간 및 마우스에 대한 예시적인 SIRP α 서열들은 표 3에 나타낸다. cDNA 서열에 대해, 연속적인 엑손들은 번갈아 있는 밑줄친 텍스트에 의해 분리된다. 단백질 서열에 대해, 신호 웨티드들에 밑줄이 그어졌고, 경막 및 세포질 서열들은 이텔릭체로 표시된다.

표 3

마우스 SIRP α cDNA
NM_007547.3

GCGCTCGGCCGGGCCGCCCTCGCCTGGCCTCGCACGGCTC
 CGCACAGCCCCGACTCGCTCTCGAGCTGTCCCCGCTCGCGCT
 TGCTCTCGATCTCCGTCGGCTCCCTCGCTATCCGCTCCCCGCCCGTGC
 CCCTCTTCCTTCTCCCTCGCTATCCGCTCCCCGCCCGTGC
 CTCTGGCTCTCGCCTGGCTCCCTCGCTGGGCTCGCTCCCCTTCCC
 GCCGGCTCTGGCCGGCGTCACGCTCCCGAGTCTCCCGCTCG
 GCGCGTCTCATTTGTGGAGGGGTCAGATCACCCCGCCGG
 CGGTGGCGCTGGGGGGCAGCGGAGGGGAGGGGCTTAGTC
 GTTCGCCCCGCCCCGGCCCTGCCAGGCGCCCTCACCGC
 CGCTCTCCCTCTTGCTCTGCAAGCGCCGCCCCATGGAGCCCGC
 CGGCCCCGGCCCTGGCCCTAGGGCCCTGCTGCTGCCTG
 CTGCTCTCCGCGTCTGTACAGAGGCCACGGGAAGG
[AACTGAAGGTGACTCAGCCTGAGAAATCAGTGTCTGTTGCTG](#)
[CTGGGGATTGACCGTTCTGAACTCGACTTGAACCTCCTTGT](#)
[GCCGGTGGGACCCATTAGGTGGTACAGAGGAGTAGGGCCAAG](#)
[CCGGCTGTTGATCTACAGTTGCAAGGAGAATACGTTCTCGA](#)
[ATTAGAAATGTTTCAAGATACTACTAAGAGAAACAATATGGAC](#)
[TTTCCATCCGTATCGTAATGTCACCCAGCAGATGCTGGCA](#)
[TCTACTACTGTGTGAAGTCCAGAAAGGATCATCAGAGCCTG](#)
[ACACAGAAATACAATCTGGAGGGGGAACAGAGGCTATGTAC](#)
[TCGCCAAACCTTCTCACCGGAGGTATCCGGCCAGCAGACA](#)
[GGGGCATACCTGACCAGAAAGTGAACCTCACCTGCAAGTCTC](#)
[ATGGCTCTCTCCCCGGAATATCACCCCTGAAGTGGTCAAAGA](#)
[TGGCAAGAACCTCACCCCTTGGAGACCACCGTGAACCCCTAG](#)
[TGGAAAGAATGTCCTACAACATCTCCAGCACAGTCAGGGT](#)
[GGTACTAAACTCCATGGATGTTAATTCTAAAGGTCTGCGAG](#)
[GTAGCCCACATCACCTGGATAGAAGCCCTTTCGTGGGATTG](#)
[CTAACCTGTCTAACCTCATCGGAGTTTCAACCCACCGTGAAGGT](#)
[CACCCAAACAGTCCCCGACGTCATGAACCCAGGTGAACCTCAC](#)
[CTGCCGGCTGAGAGGTTCTACCCGAGGATCTCCAGCTGATC](#)
[TGGCTGGAGAATGGAACGTATCACGGAAATGACACGCCAAG](#)
[AATCTCACAAAGAACCGGATGGGACCTATAATTACACAAGC](#)
[TTGTTCTGGTGAACTCATGCTCATAGAGAGGACGTGGTGT](#)
[TCACGTGCCAGGTGAAGCACGCCAACAGCCAGGGATCACCC](#)
[GAAACCATAACCGTCTGGGATTGCCCACTCGAGTGTCAAG](#)
[GGAGCATGCAAACCTCCCTGATAATAATGCTACCCACAAC](#)
[GGAATGTCTTCATCGGTGTTGGCGTGGCGTGTGTTGCTCGT](#)
[AGTCCTGCTGATGGCTGCTCTACCTCCCGATCAAACAG](#)
[AAGAAAGCCAAGGGGTCAACATCTCCACACGGTTGACGAG](#)
[CCCGAGAAGAACGCCAGGGAAATAACCCAGATCCAGGACAC](#)
[AAATGACATCAACGACATCACATACGGCAGACCTGAATCTGCC](#)
[CAAAGAGAAGAACGCCAACCCGGCAGGGGGGGGGCTGAGCCTAACAA](#)
[CCACACAGAAATATGCAAGCATGAGACAGGCAAAGTGCCTAG](#)
[GCCAGAGGATACCCCTCACCTATGCTGACCTGGACATGGTCCA](#)
[CCTCAGCCGGGACGCCAGGCCCCAACGCTGAGCCATCTTC](#)
[TCAGAGTATGCTAGTGTCCAGGTCCAGAGGAAGTGAATGGGG](#)
[CTGTGGTCTGTACTAGGCCCCATCCCCACAAGTTTCTGTCCT](#)
[ACATGGAGTGGCCATGACGAGGACATCCAGCCAGCCAATCCT](#)
[GTCCCCAGAAGGCCAGGTGGCACGGGTCTAGGACCAGGGT](#)

AAGGGTGGCCTTGTCTCCCTCCGTGGCTCTCAACACCTCTT
GGGCACCCACGTCCTTCTTCCGGAGGCTGGGTGTTGCAGAA
CCAGAGGGCGAACTGGAGAAAGCTGCCTGGAATCCAAGAAGT
GTTGTGCCTCGGCCATCACTCGTGGTCTGGATCCTGGTCTT
GGCAACCCAGGTGCGTCCTTGATGTTCCAGAGCTTGGTCTT
CTGTGTGGAGAAGAGCTCACCATCTACCCAACTTGAGGCTT
GGGACCAAGACTCCCTTAGATCAAACCGCCCCATGTGGAA
GAACTAACCCAGAAGTCAGCAAGTTCAGCCAACACTGCTG
GCCTCCCTCCAGGCTGACTAGCCCAGGGCATGTCAG
CCCTCTCTCCAGGCTGACTAGCCCAGGCTTGGGATGTCAG
TGTGGCCCCACCTCCAGTCCAGTCCCAGCTTGGCTTCCAGCT
AGCACTAACTCAGCAGCATCGCTGTGGACGCCTGTAATTAA
TTGAGAAATGTAACTGTGAGTCATAAGCTAAGGTGTTAG
AAAATTGATTTATGCTGTTAGTTGTTGGGTTTCTTTCT
TTTAATTCTTTCTTTGATTTTTCTTCCCTTAA
CAACAGCAGCAGCATCTGGCTCTGTCTAGTGTGAATGGT
TGGGTCTTGTGAAGTCTGAGGTCTAACAGTTATTGTCTGG
AGGATTTCTACAGCAGAAACAGATTTTTCAAATTCCAG
AATCCTGAGGACCAAGAAGGATCCCTCAGCTGCTACTCCAG
CACCCAGCGTCACTGGGACGAACCAGGCCCTTACAAG
GCCACATGGCTGGCCCTTGCCTCCATGGCTACTGTGGTAAGT
GCAGCCTTGTCTGACCCAATGCTGACCTAATGTTGGCATTCC
ACATTGAGGGGACAAGGTCACTGATGCCCTCACTCACA
AGCACCTCAGGAGCATGCAGAGAGAAGGGACACTGGCCAGC
TCTCTGAGGTAATCAGTGAAGGAGGAGTCCGTTTTGCCAG
CAAACCTCAGCAGGATCACACTGGAACAGAACCTGGTCATAC
CTGTGACAACACAGCTGAGGCCAGGGCAAACCAACCACTGT
CACTGGCTCGAGAGTCTGGCAGAGGCTCTGACCCCTCCACCC
TTAAACTGGATGCCGGGCTGGCTGGCCCAATGCCAAGTG
GTTATGGCAACCTGACTATCTGGCTTAACATGTAGCTCAGG
AAAGTGGAGGCGCTAATGCCCCAATCCCTGGGATTCTGATT
CCAGCTATTCTGTAAGCAGGCCAACCTGCCTATTCTGTAG
GTGCGACTGGATGTTAGGAGCACAGCAAGGACCCAGCTG
TAGGGCTGGTGAACCTGATACTTCTCATAATGGCATCTAGAAGT
TAGGCTGAGTTGGCTCACTGGCCAGCAAACCAAGAACCTGT
CTTGTCGGGCCATGTTCTGGGCTGTTCTAATTCAAAG
GGTTGGTGGTAAAGCTCCACCCCTTCTCCTCTGCCTAAAGA
CATCACATGTGTATAACACACAGGGTGTATAAGTGAAGTAAA
AGAATGTCTCGCTGGCATCCTAATTGTCTTAAGTTTTTG
GAGGGAGAAAGGAACAAGGCAAGGGAAAGATGTGAGCTT
GCTTAACCAGGCAGCTGGGCTCCAAACCTATGGAACC
CTGGTACAAAGAAGAGAACAGAACGCCCCGTGAGGAGTGG
GATTGTTCTGTAGACCAAGATGAGAAGGAAACAGGCC
GTTTGACATAGTTGCAACTAAAATTGGCTTGCAAAAT
ATTGGTAAAGATTCTGGTAACAATAAAAAAAAAAA
AAAAAA (SEQ ID NO: 1)

마우스 SIRP α 단백질
NP_031573.2

MEAPGPAPGRLGPLLLCLLSASCFTGATGKELKVTQPEKSVSV
AAGDSTVLNCLTLSLLPVGPIRWYRGVGVPSRLIYSFAGEYVPRI
RNVDTTKRNNMDFSIRISNVTPADAGIYYCVKFQKGSSEPDTEI
QSGGGTEVYVLA
KPSPEVSGPADRGIPDQKVNFCKSHGFSPRN
ITLKWFKDQELHPLETTVNPSGKNVSYNISSTRVVVLNSMDVN

[0080]

SKVICEVAHITLDRSPLRGIANLSNFIRVSPTVKVTQQSPTSMNQV
 NLTCAERFYPEDLQLIWLLENGNVRNDTPKNLTKNTDGTNYT
 SLFLVNSSAHREDVVFTCQVKHDQPAITRNHTVLGFAHSSDQG
 SMQTFPDNNA THNWNVFIGVGVACALLVLLMAALYLLRIKQKKAK
GSTSSTRLHEPEKNAREITQ/QDTNDINDITYADLNLPKEKKPAPRAP
EPNNHTEYASIEGKVPRPEDTLTYADLDMVHLSRAQPAPKPEPSFS
EYASVQVORK (SEQ ID NO: 2)

인간 SIRP α DNA
 NM_001040022.1

TCCGGCCCCGACCCACCCCCAAGAGGGCCTTCAGCTTG
 GCTCAGAGGCACGACCTCCTGGGAGGGTTAAAGGCAGACG
 CCCCCCGCCCCCGCGCCCCCGCGACTCCTCGCCGC
 CTCCAGCCTCTGCCAGTGGGAAGCGGGGAGCAGCCGCG
 CCGGAGTCGGAGGCAGGGGAGGTGCGCCGA
CTTCCACCTTAAGAGGACGATGTAGCCAGCTCGCAGCGCTGAC
CTTAGAAAAACAAGTTGCGAAAGTGGAGCGGGGACCCGC
CTCTGGCAGCCCCGGCGCTTCAGTGCCTCCAGCCCTC
GCGGGCGGCCAGCCGCGGCCATGGAGCCGCCGGCGCG
CCCCGGCCGCCCTCGGGCCGCTGCTGCCTGCTGCTGCCGCG
TCTGCGCCTGGTCAGGAGTGGCGGGTAGGAGGAGCTGAG
GTGATTCAAGCTGACAAGTCCGTGTTGGITGCAGCTGGAGAG
ACAGCCACTCTGCGCTGCACTGCGACCTCTGATCCCTGTGG
GGCCCACATCCAGTGGTTAGAGGAGCTGGACCAGGCCGGGAAT
TAATCTACAATCAAAAAGAAGGCCACTCCCCCGGTAACAA
CTGTTCAAGACCTCACAAAGAGAACACATGGACTTTCCAT
CCGCATCGTAACATCACCCAGCAGATGCCGCCACCTACTA
CTGTGTGAAAGTCCGGAAAGGGAGCCCGATGACGTGGAGTT
TAAGTCTGGAGCAGGCACTGAGCTGTCTGCGCGCCAACACC
CTCTGCCCCGTTGATCGGGCCCTGCGCGAGGGCCACACCT
CAGCACACAGTGAGCTCACCTCGAGTCCCACGGCTTCTCAC
CCAGAGACATCACCCCTGAAATGGTCAAAATGGGAATGAGC
TCTCAGACTTCCAGACCAACGTGGACCCCGTAGGAGAGAGCG
TGTCTACACCATCCACAGCACAGCCAAGTGGTGCTGACCC
GCGAGGACGTCACTCTAACGTCAAGTCATCTGCGAGGTGGCCACCG
TCACCTGCAAGGGGACCCCTTCTGTTGGACTGCCACTTGT
TGAGACCATCCGAGTTCCACCCACCTTGGAGGTTACTAACAG
CCCGTGAGGCAGAGAACAGGTGAATGTACCTGCCAGGTG
AGGAAGTTCTACCCCCAGAGACTACAGCTGACCTGGTGGAG
AATGGAAACCGTGTCCCCGACAGAACGGCTCAACCGTTACA
GAGAACAGGATGGTACCTACAACCTGGATGAGCTGGCTCTG
GTGAATGTATCTGCCACAGGGATGATGTGAAGCTCACCTGC
CAGGTGGAGCATGACGGCAGCCAGGGTCAGCAAAGCCAT
GACCTGAAAGGCTCAGCCCCACCCGAAGGAGCAGGGCTCAAAT
ACCGCCGCTGAGAACACTGGATCTAACGACAGAACATCTAT
ATTGTGGTGGGTGTGGTGTGACCTTGCTGGGCCCTACTGA
TGGCGGCCCTACCTCGTCCGAATCAGACAGAACAGCCC
AGGGCTCCACTTCTACAAGGTTGCATGAGCCCGAGAAGA
ATGCCAGAGAAAATAACACAGGACACAAATGATATCACATATG
CAGACCTGAACCTGCCAACGGGAGAAGCCTGCTCCCCAGG
CTCGGGAGCCAACAACCACCGGAGTATGCCAGCATTCAGA
CCAGCCCGCAGCCCGCTGGAGGACACCCCTCACCTATGCTG
ACCTGGACATGGTCCACCTCAACCGGACCCCCAAGCAGCCGG
CCCCCAAGCCTGAGCCGTCTTCAGAGTACGCCAGCGTCCA

GGTCCCGAGGAAGTGAATGGGACCGTGGTTGCTCTAGCACC
 CATCTCTACGCCTTCTTGTCCCACAGGGAGCCGCCGTGATG
 AGCACAGCCAACCCAGTCCCGAGGGCTGGGCGGTGCAAGG
 CTCTGGGACCCAGGGCCAGGGTGGCTTCTCTCCCCACCC
 TCCTTGGCTCTCAGCACTCCTGGCAGCCACGGCCCCCTCC
 CCCCACATTGCCACATACTGGAGGCTGACGTTGCCAACCA
 GCCAGGGAAACCAACCTGGAGTGCCAGAACCTGGCTGGGGT
 CCAAGAACTCTTGTGCCTCCGTCCATCACCATGTGGGTTGA
 AGACCCCTGACTGCCTCCCCGATGCTCGAAGCCTGATCTCC
 AGGGTGGGAGGAGAAAATCCCACCTCCCCGTACCTCCACCA
 CCTCCACCAACACCACCACCAACCAACCAACTACCACAC
 CACCCAACTGGGGTAGAGTGGGAAGATTCCCCTTAGAT
 CAAACTGCCCCTCCATGGAAAAGCTGGAAAAAAACTCTGGA
 ACCCATATCCAGGTTGGTAGGGTGTGCCAACAGTCCTGGC
 CTCCCCCATCCCTAGGCTAAAGAGCCATGAGTCCTGGAGGAG
 GAGAGGACCCCTCCAAAGGACTGGAGACAAACCCCTGCT
 TCCTTGGGTCCCTCCAAGACTCCCTGGGGCCAACTGTGTTGC
 TCCACCCGGACCCATCTCTCCCTAGACCTGAGCTTGGCCCC
 TCCAGCTAGCACTAACATCTCGTGTGGACGCCGTGAA
 ATTACTGAGAAATGTGAAACGTGCAATCTGAAACTGAGGTG
 TTAGAAAACCTGATCTGTGGTTTGTGTTGTTTTCTTA
 AAACAACAGCAACGTGATCTGGCTGTGTCATGTGTTGAAG
 TCCATGGTTGGGTCTTGTGAAGTCTGAGGTTAACAGTTGTT
 GTCTGGAGGGATTTCTACAGCGAAGACTTGAGTTCCCTCA
 AGTCCCAGAACCCAAGAATGGGCAAGAAGGATCAGTCAGC
 CACTCCCTGGAGACACAGCCTCTGGCTGGACTGACTTGGCC
 ATGTTCTCAGCTGAGGCCAGGGCTGTTAGTGCAGCCTCTGT
 GACCCCGCTGTGTAAGTCCAGGCTGCCCAGGGCTGCTGAGG
 GCTGCCTCTGACAGTCAGCTTATCGAGACCCAATGCCTCA
 GTCTGCTCATCGTAAAGTGGGATAGTGAAGATGACACCCC
 TCCCCACCAACCTCTCATAACACTTAAAGAACACAGAGGG
 TAGGGATAGTGGCCCTGGCGTCTATCTACCCCTTGTGAC
 CGCCCCCATCCCCCTTGAGCTGATCCCTGAAGAAGAAAT
 CTTCCATTCTGCTCTAACCCCTACTGGATCAAACACTGGAAAT
 AAATTGAAGACAGCCAGGGGATGGTCAGCTGAGCTGAAGCTG
 GGCTGATTCCCCCTGTCCCAGAAGGTTGGCCAGAGGGTGTG
 ACCCAAGTTACCCCTAACCCCCACCCCTCCAGTCGGGTGTGAG
 GGCCTGACCGGGCCAGGGCAAGCAGATGTCGCAAGCCCTAT
 TTATTCACTGCTTAACTATAACTCTAGAGTTGAGACGCTAATG
 TTCATGACTCTGGCCTTGGGATGCCAACGGGATTCTGGCTC
 AGGCTGAAAGTAGCTGAGCCATCTGCCATTCTGGAGG
 TCCTACAGGTGAAACTGCAGGGAGCTCAGCATAGACCCAGCTC
 TCTGGGGGATGGTCACCTGGTATTCAATGATGGCATCCAGG
 AATTAGCTGAGCCAACAGACCATGTGGACAGCTTGGCCAGA
 GCTCCCGTGTGCCATCTGGGAGGCCAGTGAACCCAGCCACCT
 GGCTCAGGCTAGTCCAAATTCCAAGGATTGGCTTGTAAACC
 TTCGTCCTCCCTCTTTACCCAGAGACAGCACATACGTGTC
 ACACGCATGCACACACACATTCAAGTATTAAAGAATGTTT
 CTTGGTGCCTTTTATTATTATTAAATTCTGGAGG
 GGGAAATAAGGAAATAAGGCCAAGGAAGATGTATAGCTTAG
 CTTAGCCTGGCAACCTGGAGAACACACATACCTGTGATTTG
 AACCCAGGAAAAGGAAGAGGTCGAACCAACCCCTGCGGAAG

GAGCATGGTTTCAGGAGTTATTTAAGACTGCTGGGAAGGA
 AACAGGCCCATTTGTATATAGTGCAACTAAACTTTTGG
 CTTGCAAAATATTTGTAAATAAGATTCTGGTAATAATGA
 (SEQ ID NO: 3)

인간 SIRP α 단백질
 NP_001035111.1 MEPAGPAPGRLGPLLCLLAASCASCAWSGVAGEEELQVIQPDKSVL
VAAGETATLRCTATSLIPVGPIQWFRGAGPGRELIYNQKEGHFPR
VTVSDDLTKRNNMDFSRIGNITPADAGTYYCVKFRKGSPDDVEF
KSGAGTELSVRAKPSAPVVSGPAARATPQHTSFTCESHGFSPRD
ITLKWFKNNGNELSDFQTNVDPVGEVESVSYIHSATAKVLTRDVHS
QVICEVAHVTLQGDPLRGTANLSETIRVPPTLEVTQQPVRAENQV
NVTCQVRKFYPQRQLTLWLENGNVSRTETASTVTENKDGTYNW
MSWLLVNVSahrddvklTCQVEHDGQPAVSKSHDLKVSahPK
EQGSNTAAENTGSNERNYIVVGVVCTLLVALLMAALYLVRIRQKK
QGSTSSTRLHEPEKNAREITQDTNDITYADLNLPKGKKPAPQAAEPN
NHTEYASIQTSPQPASEDTLYADLDMVHLNRTPKQPAPKPEPSFSEY
ASVQVPRK (SEQ ID NO: 4)

인간화된 SIRP α
 단백질 MEPAGPAPGRLGPLLCLLSASCFCTGVAGEEELQVIQPDKSVL
VAAGETATLRCTATSLIPVGPIQWFRGAGPGRELIYNQKEGHFPR
VTVSDDLTKRNNMDFSRIGNITPADAGTYYCVKFRKGSPDDVEF
KSGAGTELSVRAKPSAPVVSGPAARATPQHTSFTCESHGFSPRD
ITLKWFKNNGNELSDFQTNVDPVGEVESVSYIHSATAKVLTRDVHS
QVICEVAHVTLQGDPLRGTANLSETIRVPPTLEVTQQPVRAENQV
NVTCQVRKFYPQRQLTLWLENGNVSRTETASTVTENKDGTYNW
MSWLLVNVSahrddvklTCQVEHDGQPAVSKSHDLKVSahPK
EQGSNTAADNNATHNWNVFIGVGVACALLVLLMAALYLRIKQKK
AKGSTSSTRLHEPEKNAREITQIQDTNDINDITYADLNLPKEKKPAPR
APEPNNHTEYASIETGKVPRPEDTLTYADLDMVHLSRAQPAPKPEPS
FSEYASVQVQRK (SEQ ID NO: 5)

[0083]

인간화된 SIRP α 비-인간 동물

[0085]

SIRP α 단백질을 코드화하는 비-인간 동물의 내인성 유전자좌의 유전자 변형으로부터 유발되는 비-인간 동물의 면역 세포들 (예컨대 골수성 세포들)의 표면상에서 인간화된 SIRP α 단백질을 발현하는 비-인간 동물들이 제공된다. 본원에 기술된 적합한 실례들은 설치류, 특히 마우스를 포함한다.

[0086]

일부 구체예에서, 인간화된 SIRP α 유전자는 이종성 종 (예컨대 인간)으로부터의 유전자 물질을 포함하고, 이때 인간화된 SIRP α 유전자는 이종성 종으로부터의 유전자 물질의 코드화된 부분을 포함하는 SIRP α 단백질을 코드화한다. 일부 구체예에서, 본 발명의 인간화된 SIRP α 유전자는 세포의 원형질막 상에서 발현되는 SIRP α 단백질의 세포 외 부분에 해당하는 이종성 종들의 계놈 DNA를 포함한다. 상기 인간화된 SIRP α 유전자를 함유하는 비-인간 동물, 비-인간 배아 및 세포를 제조하기 위한 비-인간 동물, 배아, 세포 및 표적화 구성물 또한 제공된다.

[0087]

일부 구체예에서, 내인성 SIRP α 유전자가 결실된다. 일부 구체예에서, 내인성 SIRP α 유전자가 변경되는데, 이 때 내인성 SIRP α 유전자의 일부분은 이종성 서열 (예컨대 전체 또는 부분적인 인간 SIRP α 서열)로 대체된다. 일부 구체예에서, 모든 또는 실질적으로 모든 내인성 SIRP α 유전자는 이종성 유전자 (예컨대 인간 SIRP α 유전자)로 대체된다. 일부 구체예에서, 이종성 SIRP α 유전자의 일부분은 내인성 SIRP α 유전자좌에서 내인성 비-인간 SIRP α 유전자 안에 삽입된다. 일부 구체예에서, 이종성 유전자는 인간 유전자이다. 일부 구체예에서, 변형 또는 인간화는 내인성 SIRP α 유전자의 두 개의 복사물 중 하나에 대해 이루어지면, 비-인간 동물에 대한 발생은 인간화된 SIRP α 유전자에 관련하여 이종접합성이다. 다른 구체예에서, 비-인간 동물은 인간화된 SIRP α 유전자에 대해 동형접합성이다.

[0088]

본 발명의 비-인간 동물은 내인성 비-인간 SIRP α 유전자좌에서 전체적으로 또는 부분적으로 인간 SIRP α 유전자를 함유한다. 그러므로, 그런 비-인간 동물을 이종성 SIRP 유전자를 가지는 것으로서 기술될 수 있다. 내인성 SIRP α 유전자좌에서 대체된, 삽입된 또는 변형된 SIRP α 유전자는 예를 들면 PCR, 웨스턴 블로팅, 서던 블로팅, 제한 단편 길이 다형 현상 (RELP) 또는 대립유전자 획득 또는 상실 분석을 포함하여 다양한 방법을 사용하여 검출될 수 있다. 일부 구체예에서, 비-인간 동물은 인간화된 SIRP α 유전자에 관련하여 이형접합성이다.

[0089]

다양한 구체예에서, 본 발명에 따르는 인간화된 SIRP α 유전자는 각각 표 3의 인간 SIRP α 유전자에 나타낸 제 2, 제 3 및 제 4 엑손에 대해 적어도 50% (예컨대 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상) 동일한 서열을 가지는 제 2, 제 3 및 제 4 엑손을 가지는

SIRP α 유전자를 포함한다.

[0090] 다양한 구체예에서, 본 발명에 따르는 인간화된 SIRP α 유전자는 표 3의 인간 SIRP α cDNA에 나타낸 뉴클레오티드 352 내지 1114에 대해 적어도 50% (예컨대 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상) 동일한 뉴클레오티드 코딩 서열 (예컨대 cDNA 서열)을 가지는 SIRP α 유전자를 포함한다.

[0091] 다양한 구체예에서, 본 발명의 비-인간 동물에 의해 제조된 인간화된 SIRP α 단백질은 표 3에 나타낸 인간 SIRP α 단백질의 세포 외 부분에 대해 적어도 50% (예컨대 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상) 동일한 서열을 가지는 세포 외 부분을 포함한다.

[0092] 다양한 구체예에서, 본 발명의 비-인간 동물에 의해 제조된 인간화된 SIRP α 단백질은 표 3에 나타낸 인간 SIRP α 단백질에 나타난 아미노산 잔기 28 내지 362에 대해 적어도 50% (예컨대 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상) 동일한 서열을 가지는 세포 외 부분을 포함한다.

[0093] 다양한 구체예에서, 본 발명의 비-인간 동물에 의해 제조된 인간화된 SIRP α 단백질은 표 3에 나타낸 인간 SIRP α 단백질의 아미노산 서열에 대해 적어도 50% (예컨대 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상) 동일한 서열을 가지는 세포 외 부분을 포함한다.

[0094] 특이적인 다형 형태 또는 대립유전자 변이체 (예컨대 단일 아미노산 차이)를 포함하여 인간화된 SIRP α 단백질을 발현하는 비-인간 동물의 제조를 위한 조성물 및 방법들, 이를테면 인간 프로모터 및 인간 조절 서열로부터 그런 단백질을 발현하는 비-인간 동물의 제조를 위한 조성물 및 방법들이 제공된다. 일부 구체예에서, 내인성 프로모터 및 내인성 조절 서열로부터 그런 단백질을 발현하는 비-인간 동물의 제조를 위한 조성물 및 방법들이 또한 제공된다. 그 방법들은 내인성 SIRP α 유전자에 해당하는 비-인간 동물의 게놈의 정확한 위치에서 전체적으로 또는 부분적으로 인간 SIRP α 단백질을 코드화하는 유전자 물질을 삽입함으로써, 인간인 SIRP α 단백질을 전체적으로 또는 부분적으로 발현하는 인간화된 SIRP α 유전자를 생성하는 것을 포함한다. 일부 구체예에서, 그 방법은 인간 SIRP α 유전자의 엑손 2 내지 4에 해당하는 게놈 DNA를 비-인간 동물의 내인성 SIRP α 유전자에 삽입함으로써 삽입된 엑손에 의해 코드화된 아미노산들을 함유하는 인간 부분을 함유하는 SIRP α 단백질을 코드화하는 인간화된 유전자를 생성하는 것을 포함한다.

[0095] 인간화된 SIRP α 유전자 접근법은, 다양한 구체예에서, SIRP α 서열의 게놈 서열이 단일 단편에서 변형되고 따라서 필요한 조절 서열들을 포함함으로써 정상적인 기능성을 보유하기 때문에, 내인성 유전자의 상대적으로 최소한의 변형을 사용하고 비-인간 동물에서 자연적인 SIRP α-중재된 신호 변환을 초래한다. 그러므로 그런 구체 예에서, SIRP α 유전자 변형은 다른 주변 유전자 또는 다른 내인성 SIRP 유전자들에 영향을 미치지 않는다. 나아가, 다양한 구체예에서, 변형은 혈장 상의 기능성 수용체의 조립에 영향을 미치지 않고 결합 및 변형에 의해 영향을 받지 않는 수용체의 세포질 부분을 통한 후속적인 신호 변환을 통해 정상적인 이펙터 기능을 유지한다.

[0096] 내인성 쥐과 SIRP α 유전자 및 인간화된 SIRP α 유전자의 개략적인 예시 (실제 크기는 아님)는 도 1에 제공된다. 예시된 것과 같이, 인간 SIRP α 유전자의 엑손 2 내지 4를 함유하는 게놈 DNA는 표적화 구성물에 의해 내인성 쥐과 SIRP α 유전자의 유전자와에 삽입된다. 이 게놈 DNA는 리간드 결합의 원인이 되는 인간 SIRP α 단백질의 세포 외 부분 (예컨대 아미노산 잔기 28 내지 362)을 코드화하는 유전자의 부분을 포함한다.

[0097] 내인성 SIRP α 유전자좌에 인간화된 SIRP α 유전자를 가지는 비-인간 동물 (예컨대 마우스)은 기술분야에 공지되어 있는 어떠한 방법에 의해서든 제조될 수 있다. 예를 들어, 인간 SIRP α 유전자를 전체적으로 또는 부분적으로 선택가능한 마커 유전자와 함께 도입시키는 표적 벡터가 제조될 수 있다. 도 1은 인간 SIRP α의 엑손 2 내지 4의 삽입을 포함하는 마우스 게놈을 예시한다. 예시된 것과 같이, 표적화 구성물은 내인성 쥐과 SIRP α 유전자의 엑손 2의 상류에 있는 서열을 함유하는 5' 상동성 아암과, 이어서 인간 SIRP α 유전자의 엑손 2 내지 4를 함유하는 게놈 DNA 단편, 약물 선택 카세트 (예컨대 *LoxP* 서열이 양옆에 있는 네오마이신 내성 유전자) 및 내인성 쥐과 SIRP α 유전자의 엑손 4의 하류에 있는 서열을 함유하는 3' 상동성 아암을 함유한다. 상동성 재조합시에, 내인성 쥐과 SIRP α 유전자의 엑손 2 내지 4는 표적화 벡터에 함유된 서열에 의해 대체된다. 인간화된 SIRP α 유전자가 생성되고 결과적으로 인간 SIRP α 유전자의 엑손 2 내지 4에 의해 코드화된 아미노산을 함유하는 인간화된 SIRP α 단백질을 발현하는 세포 또는 비-인간 동물이 생성된다. 약물 선택 카세트는 재조합효소의 후속적인 첨가에 의해 (예컨대 Cre 처리에 의해) 임의로 제거될 수 있다.

[0098] 본원에서 기술된 인간화된 SIRP α 유전자를 가지는 마우스 외에, 인간화된 SIRP α 유전자를 포함하는 다른 유전

자 변형된 비-인간 동물이 본원에 제공된다. 일부 구체예에서, 그런 비-인간 동물은 내인성 SIRP α 프로모터에 작동가능하게 연결되어 있는 인간화된 SIRP α 유전자를 포함한다. 일부 구체예에서, 그런 비-인간 동물은 내인성 유전자좌로부터 인간화된 SIRP α 단백질을 발현하고, 이때 인간화된 SIRP α 단백질은 인간 SIRP α 단백질의 아미노산 잔기 28 내지 362를 포함한다.

[0099] 그런 비-인간 동물은 마우스, 쥐, 토끼, 돼지, 소 (예컨대 젖소, 황소, 벼팔로), 사슴, 양, 염소, 닭, 고양이, 개, 흰담비, 영장류 (예컨대 마모셋, 붉은털 원숭이)로 구성되는 군으로부터 선택될 수 있다. 유전적으로 변형 가능한 적합한 ES 세포가 쉽게 이용될 수 없는 비-인간 동물에 대해, 본원에서 기술되는 유전자 변형을 포함하는 비-인간 동물을 제조하기 위하여 다른 방법들이 사용된다. 그런 방법은, 예컨대 비-ES 세포 계놈 (예컨대 섬유아세포 또는 유도된 다능 세포)을 변형시키고 그 변형된 계놈을 적합한 세포, 예컨대 난모세포에 전달하기 위해 핵 전달을 사용하며, 그 변형된 세포 (예컨대 변형된 난모세포)를 비-인간 동물에 배아를 형성하기에 적합한 조건하에서 수태시키는 것을 포함한다.

[0100] 일부 구체예에서, 본 발명의 비-인간 동물은 포유류이다. 일부 구체예에서, 본 발명의 비-인간 동물은 작은 포유류, 예컨대 다이포도이데아 (Dipodoidea) 또는 뮤로이데아 (Muroidea) 상과 (superfamily)의 동물이다. 일부 구체예에서, 본 발명의 유전자 변형된 동물은 설치류이다. 일부 구체예에서, 본 발명의 설치류는 마우스, 쥐 및 햄스터로부터 선택된다. 일부 구체예에서, 본 발명의 설치류는 뮤로이데아 상과로부터 선택된다. 일부 구체예에서, 본 발명의 유전자 변형된 동물은 칼로미시다에 (Calomyscidae) (예컨대 마우스-유사 햄스터), 크리세티다에 (Cricetidae) (예컨대 햄스터, 뉴월드 쥐 및 마우스, 들쥐), 뮤리다에 (Muridae) (트루 마우스 및 참쥐, 게르빌루스 쥐, 아프리카가시쥐, 벗 쥐), 네소미이다에 (Nesomyidae) (클라이밍 마우스, 락 마우스, 워드 테일랫트, 마다가스카르 쥐 및 마우스), 플라타칸쏘미이다에 (Platacanthomyidae) (예컨대 가시겨울잠쥐) 및 스팔라시다에 (Spalacidae) (예컨대 뒤쥐, 대나무쥐 및 조커(zokor))로부터 선택된 과로부터 유래된다. 일부 특정 구체예에서, 본 발명의 유전자 변형된 설치류는 트루 마우스 또는 참쥐 (뮤리다에 과), 게르빌루스 쥐, 아프리카가시쥐 및 벗 쥐로부터 선택된다. 일부 특정 구체예에서, 본 발명의 유전자 변형된 마우스는 뮤리다에 과의 구성원으로부터 유래된다. 어떤 구체예에서, 본 발명의 비-인간 동물은 설치류이다. 일부 특정 구체예에서, 본 발명의 설치류는 마우스 및 쥐로부터 선택된다. 일부 구체예에서, 본 발명의 비-인간 동물은 마우스이다.

[0101] 일부 구체예에서, 본 발명의 비-인간 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 선택된 C57BL 계통의 마우스인 설치류이다. 일부 특정 구체예에서, 본 발명의 마우스는 29P1, 129P2, 129P3, 129X1, 129S1 (예컨대 129S1/SV, 129S1/SvIm), 129S2, 129S4, 129S5, 129S9/SvEvH, 129/SvJae, 129S6 (129/SvEvTac), 129S7, 129S8, 129T1, 129T2인 계통으로 구성되는 군으로부터 선택된 129 계통이다 (예컨대 Festing et al., 1999, Mammalian Genome 10:836; Auerbach et al., 2000, Biotechniques 29(5):1024-1028, 1030, 1032 참조). 일부 특정 구체예에서, 본 발명의 유전자 변형된 마우스는 상기 언급된 129 계통과 상기 언급된 C57BL 계통의 혼합물이다. 일부 특정 구체예에서, 본 발명의 마우스는 상기 언급된 129 계통들의 혼합물이거나, 상기 언급된 BL/6 계통들의 혼합물이다. 일부 특정 구체예에서, 본원에 기술되는 혼합물의 129 계통은 129S6 (129/SvEvTac) 계통이다. 일부 구체예에서, 본 발명의 마우스는 BALB 계통, 예컨대 BALB/c 계통이다. 일부 구체예에서, 본 발명의 마우스는 BALB 계통과 다른 상기 언급된 계통의 혼합물이다.

[0102] 일부 구체예에서, 본 발명의 비-인간 동물은 쥐이다. 일부 특정 구체예에서, 본 발명의 쥐는 Wistar 쥐, LEA 계통, Sprague Dawley 계통, Fischer 계통, F344, F6 및 Dark Agouti로부터 선택된다. 일부 특정 구체예에서, 본원에 기술되는 쥐 계통은 Wistar, LEA, Sprague Dawley, Fischer, F344, F6 및 Dark Agouti로 구성되는 군으로부터 선택되는 둘 또는 그 이상의 계통의 혼합물이다.

인간화된 SIRP α 유전자를 가지는 비-인간 동물을 사용하는 방법

[0104] SIRP α 돌연변이 및 유전자 도입된 비-인간 동물들 (예컨대 마우스)이 보고되었다 (Inagaki et al., 2000, EMBO Journal 19(24):6721-6731; Strowig et al., 2011, Proc. Nat. Acad. Sci. 108(32):13218-13223). 그런 동물들은 SIRP α 발현, 기능 및 조절의 분자적 측면들을 측정하기 위해 다양한 분석에서 사용되어 왔다. 그러나, 그것들에 제한이 없는 것이 아니다. 예를 들어, SIRP α 돌연변이 마우스의 사용은 SIRP α 의 돌연변이 형태를 함유하는 세포가 신호를 보내지 못하는 무능력으로부터 유발된 해로운 건강 상태로 인해 제한되어 왔다. 나아가, SIRP α 에 대한 리간드인 CD47은 SIRP α 의 돌연변이 형태와 동일한 세포 상에 존재해야 하고 두 단백질은 둘 다 세포 내 신호를 제공할 수 있기 때문에, 그런 결과가 SIRP α 신호화의 결핍으로부터 유래되는 지 또는 CD47 결합의 결핍으로부터 유래되는 것인지를 구별하는 것은 불가능하다. 인간 SIRP α 유전자도입 마우스의 경우에, 마

우스 SIRP α는 무상이고 기능적이다. 그러므로 다양한 생물학적 과정 (예컨대 이식)에서 SIRP α-의존성 기능은, 인간 및 마우스 SIRP α 수용체 둘 다 존재하고 기능적이기 때문에 이들 마우스에서 명백하게 인간 SIRP α 또는 마우스 SIRP α 중 어느 하나의 기능에 단독으로 기여할 수 없다.

[0105] 본 발명의 비-인간 동물은 다양한 분석에 유용한 개선된 생체 내 시스템 및 인간 SIRP α를 발현하는 생물학적 물질의 공급원 (예컨대 세포)을 제공한다. 다양한 구체예에서, 본 발명의 비-인간 동물은 SIRP α를 표적화하고 및/또는 SIRP α-CD47 신호화를 조절하는 치료제를 개발하기 위해 사용된다. 다양한 구체예에서, 본 발명의 마우스들은 인간 SIRP α에 결합하는 후보 치료제들 (예컨대 항체들)을 스크리닝하고 개발하기 위해 사용된다. 다양한 구체예에서, 본 발명의 비-인간 동물은 본원에 기술된 비-인간 동물의 세포의 표면상에서 인간화된 SIRP α의 길항제 및/또는 아고니스트의 결합 프로필을 측정하기 위해 사용된다.

[0106] 다양한 구체예에서, 본 발명의 비-인간 동물은 SIRP α 신호 변환 (예컨대 인산화)을 차단 또는 조절하는 치료적 효과 및 세포 변환의 결과로서 유전자 발현에 미치는 효과를 측정하기 위해 사용된다. 다양한 구체예에서, 세포들이 분리되는 본 발명의 비-인간 동물들은 비-인간동물의 세포 표면에서 인간 SIRP α에 결합하는 후보 치료제에 노출되고, 계속해서 일전 시간이 지난 후, SIRP α-의존성 과정, 예를 들면 B 및/또는 T 세포 증식, 혈소판의 제거 및 사이토킨 발현의 유도에 미치는 효과에 대해 분석된다.

[0107] 본 발명의 비-인간 동물들은 인간화된 SIRP α 단백질을 발현하고, 그러므로 세포, 셀라인 및 세포 배양물들은 결합 및 기능성 분석에 사용하기 위하여, 예컨대 특히 SIRP α 길항제 또는 아고니스트가 인간 SIRP α 서열 또는 에피토프에 특이적인 경우에, SIRP α 길항제 또는 아고니스트의 결합 또는 기능에 대해 분석하기 위하여, 인간화된 SIRP α의 공급원으로서 작용하기 위해 생성될 수 있다. 다양한 구체예에서, 본원에 기술된 비-인간 동물에 의해 발현된 인간화된 SIRP α 단백질은 변이 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 리간드 결합 잔기들과 결합된 변이를 가지는 변이 인간 SIRP α 단백질들이 보고되었다. 다양한 구체예에서, 본 발명의 비-인간 동물들은 인간화된 SIRP α 단백질 변이체를 발현한다. 다양한 구체예에서, 변이체는 리간드 결합과 관련된 아미노산 위치에서 다양한 형태를 가진다. 다양한 구체예에서, 본 발명의 비-인간 동물들은 인간 SIRP α의 다형태적 변이체와의 상호작용을 통하여 리간드 결합의 효과를 측정하기 위해 사용된다.

[0108] 본 발명의 비-인간 동물들로부터의 세포들은 분리되고 필요에 따라 사용되거나, 또는 많은 세대 동안 배양물로 유지될 수 있다. 다양한 구체예에서, 본 발명의 비-인간 동물로부터의 세포들은 불멸화되고 배양물로 무한하게 유지된다 (예컨대 연속적인 배양).

[0109] 다양한 구체예에서, 본 발명의 비-인간 동물들의 세포들은 인간 SIRP α를 조절하는 후보 치료제를 스크리닝하고 개발하기 위한 세포 이동 또는 확산 분석에 사용된다. 그런 과정들은 상처 치유, 분화, 증식 및 생존을 포함하여 많은 세포 과정들에 대해 필요하다.

[0110] 다양한 구체예에서, 본 발명의 비-인간 동물들의 세포들은 인간 SIRP α를 표적으로 하는 후보 치료제의 약물-독물학적 측면을 시험하기 위한 거핵구 콜로니-형성 세포들에 대한 클론성 분석에 사용된다.

[0111] 다양한 구체예에서, 본 발명의 비-인간 동물들의 세포들은 식세포 작용의 SIRP α-의존성 조절을 조절하는 화합물 또는 생물학적 제제들의 치료적 잠재력을 측정하기 위한 식세포 작용 분석에 사용된다.

[0112] 본 발명의 비-인간 동물들은 약물 또는 백신의 분석 및 시험을 위한 생체 내 시스템을 제공한다. 다양한 구체예에서, 후보 약물 또는 백신은 본 발명의 하나 또는 그 이상의 비-인간 동물에게 전달되고, 이어서 그 약물 또는 백신에 대한 하나 또는 그 이상의 면역 반응, 그 약물 또는 백신의 안전성 프로필 또는 질환 또는 상태에 미치는 영향을 측정하기 위해 비-인간 동물들이 모니터링될 수 있다. 그런 약물 또는 백신들은 그런 비-인간 동물들에서 개선되고 및/또는 개발될 수 있다.

[0113] 본 발명의 비-인간 동물들은 채택된 전달을 통한 인간 세포-대-세포 상호작용의 메커니즘을 설명하는 개선된 생체 내 시스템을 제공한다. 다양한 구체예에서, 본 발명의 비-인간 동물은 종양 이종이식편으로 이식되고, 이어서 고체 종양 또는 다른 악성 종양의 근절에서의 유효성을 측정하기 위해 채택된 전달에 의해 램프구를 침투하는 종양의 제 2 이식이 비-인간 동물에 이식될 수 있다. 그런 실험은 비-이간 동물의 내인성 SIRP α와 경합하는 일 없이 인간 SIRP α의 독점적인 존재로 인해 인간 세포를 사용하여 시행될 수 있다. 나아가, 이종이식에 사용하기 위한 치료제 및 약제들은 그런 비-인간 동물에서 개선되고 및/또는 개발될 수 있다.

[0114] 본 발명의 비-인간 동물들은 이식을 통한 인간 조혈 줄기세포의 유지 및 개발을 위한 개선된 생체 내 시스템을 제공한다. 다양한 구체예에서, 본 발명의 비-인간 동물들은 비-인간 동물 내에서 인간 줄기세포의 개선된 개발 및 유지를 제공한다. 다양한 구체예에서, 분화된 인간 B 및 T 세포의 증가된 집단이 비-인간 동물의 혈액,

골수, 비장 및 흉선에서 관찰된다. 다양한 구체예에서, 본 발명의 비-인간 동물들은 마우스 및 인간 SIRP α 둘다를 발현하는 비-인간 돈물에 비교하여 인간 세포의 이식의 수준의 증가를 제공한다.

[0115] 본 발명의 비-인간 동물들은 인간 세포를 표적화하는 치료 약물의 효능을 평가하기 위해 사용될 수 있다. 다양한 구체예에서, 본 발명의 비-인간 동물들은 인간 세포로 이식되고, 그런 인간 세포를 표적화하는 약물 후보가 그런 동물에 투여된다. 그런 다음 그 약물의 치료 효능은 약물의 투여 후에 비-인간 동물에서 인간 세포를 모니터링함으로써 측정된다. 비-인간 동물에서 시험될 수 있는 약물은 인간 세포를 표적화함으로써 (예컨대 인간 세포에 결합 및/또는 인간 세포상에서 작용함) 인간 질환 및 상태의 치료에 대한 의도된 치료 효과를 가지는, 작은 분자 화합물, 즉 분자량이 1500 kD, 1200 kD, 1000 kD 또는 800 달톤 미만인 화합물들과 큰 분자 화합물 (예컨대 단백질, 예를 들면 항체) 둘 다이다.

[0116] 일부 구체예에서, 약물은 항암 약물이고, 인간 세포는 암세포이며, 암세포는 일차 암세포 또는 일차 암으로부터 수립된 셀라인의 세포일 수 있다. 이들 구체예에서, 본 발명의 비-인간 동물은 인간 암세포로 이식되고, 항암 약물이 그 비-인간 동물에 제공된다. 약물의 효능은 비-인간 동물에서 인간 암세포의 성장 또는 전이가 약물의 투여의 결과로서 억제되었는지의 여부를 평가함으로써 측정될 수 있다.

[0117] 특정 구체예에서, 항암 약물은 인간 암세포 상에서 항원에 결합하는 항체 분자이다. 특정 구체예에서, 항암 약물은 인간 암세포 상에서 항원에 결합하고, 다른 인간 세포 상에서, 예를 들면 예컨대 B 세포 및 T 세포와 같은 인간 면역 시스템의 세포 (또는 "인간 면역 세포") 상에서 항원에 결합하는 이중특이성 항체이다.

[0118] 일부 구체예에서, 본 발명의 비-인간 동물은 인간 면역 세포 또는 인간 면역 세포로 분화하는 세포들로 이식된다. 인간 면역 세포들이 이식되어 있는 그런 비-인간 동물은 인간 암세포로 이식되고, 항암 약물, 예컨대 인간 암세포 상에서 항원에 결합하고 인간 면역 세포 (예컨대 T-세포) 상에서 항원에 결합하는 이중특이성 항체로 투여된다. 이중특이성 항체의 치료 효능은 비-인간 동물에서 인간 암세포의 성장 또는 전이를 억제하는 항체의 능력을 토대로 평가될 수 있다. 특정 구체예에서, 본 발명의 비-인간 동물은 인간 면역 세포 (다른 것들 중에서도 T 세포, B 세포, NK 세포를 포함함)를 발생시키는 인간 CD34+ 조혈 선구 세포로 이식된다. 인간 B 세포 림프종 세포 (예컨대 Raji 세포)가 인간 면역 세포로 이식되어 있는 그런 비-인간 동물안에 이식되고, 그런 다음 비-인간 동물에서 종양 성장을 억제하는 이중특이성 항체의 능력을 시험하기 위하여, CD20 (정상 B 세포 및 특정 B 세포 악성 종양 상의 항원) 및 T-세포의 CD3 하위유닛에 결합하는 이중특이성 항체로 투여된다.

실시예

[0120] 다음의 실시예들은 발명의 제조 방법 및 사용 방법 및 조성물들을 기술분야의 숙련자들에게 설명하기 위해 제공되고, 본 발명자들이 그들의 발명으로서 간주하는 범주를 제한하는 것으로 의도되지 않는다. 다르게 표시되지 않는 한, DSH도는 섭씨 온도이며, 압력은 대기압이거나 거의 대기압이다.

실시예 1. 내인성 신호-조절 단백질 (SIRP) 유전자의 인간화

[0122] 이 실시예는 설치류 (예컨대 마우스)와 같은 비-인간 포유류에서 신호-조절 단백질 알파 (SIRP α)를 코드화하는 내인성 유전자를 인간화하는 예시적인 방법을 설명한다. 인간 SIRP α 는 적어도 10개의 대립유전자 형태로 존재하는 것으로 알려져 있다. 이 실시예에서 기술되는 방법들은 어떠한 인간 대립유전자, 또는 인간 대립유전자들 (또는 대립유전자 단편들)의 조합을 필요에 따라 사용하여 비-인간 동물의 내인성 SIRP α 유전자를 인간화하기 위해 사용될 수 있다. 이 실시예에서, 인간 SIRP α 변이체 1을 마우스의 내인성 SIRP α 유전자를 인간화하는 데 사용한다.

[0123] SIRP (예컨대 SIRP α) 유전자의 세포외재성 영역의 인간화를 위한 표적화 벡터를 VELOCIGENE® 기술을 사용하여 구성하였다 (예컨대 미국 특허 제 6,586,251호 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).

[0124] 간단히 설명하면, 마우스 박테리아 인공 염색체 (BAC) 클론 bMQ-261H14를 변형시켜서 내인성 SIRP α 유전자의 엑손 2 내지 4를 함유하는 서열을 결실시키고 인간 BAC 클론 CTD-3035H21을 사용하여 인간 SIRP α 유전자의 엑손 2 내지 4를 삽입하였다. 내인성 SIRP α 유전자의 엑손 2 내지 4에 해당하는 게놈 DNA (~8555 bp)를 BAC 클론 bMQ-261H14에서 BAC 클론 CTD-3035H21로부터의 인간 SIRP α 유전자의 엑손 2 내지 4를 함유하는 ~8581bp의 DNA 단편으로 대체하였다. BAC 클론 CTD-3035H21에 함유된 인간 SIRP α 대립유전자의 서열 분석은 인간 변이체 1에 해당하는 대립유전자를 나타냈다. 양옆에 loxP 부위가 있는 네오마이신 카세트를 인간 SIRP α 유전자의 엑손 2

내지 4를 함유하는 ~8581bp의 인간 DNA 단편의 단부에 첨가하였다 (도 1).

[0125] 상류 및 하류 상동성 아암을 마우스 BAC DNA로부터 각각 엑손 2 및 4의 5' 및 3' 위치에서 얻었고, 그것을 ~8581bp의 인간 단편-네오마이신 카세트에 첨가하여 내인성 SIRP α 유전자의 인간화를 위한 최종 표적화 벡터를 만들었는데, 그것은 5'에서 3' 방향으로 내인성 SIRP α 유전자의 엑손 2의 마우스 DNA 5'의 19 kb를 함유하는 5' 상동성 아암, 양옆에 *loxP* 부위가 있는 네오마이신 카세트 및 내인성 SIRP α 유전자의 엑손 4의 마우스 DNA 3'의 21 kb를 함유하는 3' 상동성 아암을 함유하였다. 표적화 벡터의 표적화된 삽입은 엑손 4와 5 사이의 마우스 SIRP α 유전자의 제 5 인트론에 네오마이신 카세트를 위치시켰다. 표적화 벡터를 SwaI을 사용한 소화에 의해 선형화한 후 박테리아 세포에서의 상동성 재조합에 사용하여, 인간 SIRP α 유전자의 엑손 2 내지 4로 마우스 SIRP α 유전자의 엑손 2 내지 4의 표적화된 대체를 이루었다 (도 1).

[0126] 표적화된 BAC DNA (상기 기술됨)를 사용하여 마우스 ES 세포를 일렉트로포레이션하여 인간 SIRP α 유전자의 엑손 2 내지 4를 포함하는 게놈 단편으로 내인성 마우스 SIRP α 유전자의 엑손 2 내지 4의 대체를 포함하는 변형된 ES 세포를 생성하였다. 인간 SIRP α 유전자의 엑손 2 내지 4를 포함하는 게놈 단편을 함유하는 포지티브 ES 세포를 TAQMANTM 프로브를 사용한 정량 PCR에 의해 확인하였다 (Lie and Petropoulos, 1998. Curr. Opin. Biotechnology 9:43-48). 상류 삽입 지점을 가로지르는 뉴클레오티드 서열은 다음을 포함하였고, 그것은 삽입 지점에 존재하는 인간 SIRP α 게놈 서열에 연속적으로 연결된 삽입 지점 (아래에서 팔호 안에 포함됨)의 상류의 내인성 마우스 서열을 나타낸다: (AGCTCTCTTA CCACTAGACT GCTGAGACCC GCTGCTCTGC TCAGGACTCG ATTTCAGTA CACAATCTCC CTCTTTGAAA AGTACCACAC ATCCTGGGT) GCTCTTGAT TTGTGTGACA CTTTGCTAGC CAGGCTCAGT CCTGGGGTCC AGGTGGGGAC TCAAACACAC TGCGACGAGT CTACATTGGA TATTCTTGGT (SEQ ID NO:6). 네오마이신 카세트의 5' 단부에서 하류 삽입 지점을 가로지르는 뉴클레오티드 서열은 다음을 포함하였고, 그것은 삽입 지점 (이탈릭체로 표시된 *loxP* 서열을 가지는 아래 팔호 안에 포함됨)의 하류에 카세트 서열과 연속적인 인간 SIRP α 게놈 서열을 나타낸다: GCTCCCCATT CCTCACTGGC CCAGCCCCCTC TTCCCTACTC TTTCTAGGCC CTGCCTCATC TCCCTGGCTG CCATTGGGAG CCTGCCAAC TGGAGGCCAG (TCGAG A TAA CTTCGTA TAA TGTA TGCTA TA CGAA GTTA T ATGCATGGCC TCCGGCCGG GTTTTGGCGC CTCCCGCGG CGCCCCCTC CTCACGGCGA) (SEQ ID NO:7). 네오마이신 카세트의 3' 단부에서 하류 삽입 지점을 가로지르는 뉴클레오티드 서열은 다음을 포함하였고, 그것은 내인성 SIRP α 유전자 (아래에서 팔호 안에 포함됨)의 엑손 4의 마우스 게놈 서열 3'과 연속적인 카세트 서열을 나타낸다: CATTCTCAGT ATTGTTTGTC CAAGTTCTAA TTCCATCAGA CCTCGACCTG CAGCCCCTAG ATAACCTCGT ATAATGTATG CTATACGAAG TTATGCTAGC (TGTCTCATAG AGGCTGGCGA TCTGGCTCAG GGACAGGCCAG TACTGCAAAG AGTATCCTTG TTCATACCTT CTCCTAGTGG CCATCTCCCT GGGACAGTC) (SEQ ID NO:8). 그런 다음 포지티브 ES 세포 클론을 사용하여 암컷 마우스에 VELOCIMOUSE® 방법을 사용하여 이식함으로써 (예컨대 미국 특허 제 7,294,754호 및 Poueymirou et al. 2007, F0 generation mice that are essentially fully derived from the donor gene-targeted ES cells allowing immediate phenotypic analyses Nature Biotech. 25(1):91-99 참조) 마우스의 내인성 SIRP α 유전자 안에 인간 SIRP α 유전자의 엑손 2 내지 4가 삽입되어 있는 한배 새끼들을 제조하였다.

[0127] 상기 기술된 표적화된 ES 세포들을 공여 ES 세포들로서 사용하여 VELOCIMOUSE® 방법에 의해 (상기 동일) 8-세포 단계 마우스 배아에 도입하였다. 내인성 SIRP α 유전자의 엑손 2 내지 4의 인간화를 포함하는 마우스들을 인간 SIRP α 유전자 서열의 존재를 검출하는 대립유전자 분석 (Valenzuela et al., 상기 동일)을 변형시켜 사용하는 유전자 분류에 의해 확인하였다.

[0128] 인간화된 SIRP α 유전자 구성물 (즉 마우스 SIRP α 유전자에 인간 SIRP α 엑손 2 내지 4를 함유함)을 내포하는 마우스들을 Cre 딜리터 (deletor) 마우스 계통으로 사용하여 (예컨대 국제 특허 출원 공보 WO 2009/114400호 참조), 예컨대 ES 세포 단계에서 또는 배아에서 제거되지 않는 표적화 벡터에 의해 도입된 어떠한 록스드 (*loxed*, 양옆에 *loxP*가 있는) 네오마이신 카세트를 제거할 수 있다. 임의로, 네오마이신 카세트는 마우스에서 보유된다.

[0129] 새끼들을 유전형으로 분류하고 인간화된 SIRP α 유전자 구성물에 대해 이형접합성인 새끼를 특성확인을 위해 선택한다.

실시예 2: 비-인간 동물에서의 인간화된 SIRP α 의 발현

[0130] 이 실시예는 내인성 SIRP α 유전자좌에서 실시예 1에 기술된 인간화된 SIRP α 유전자 구성물을 함유하도록 엔지니어링된 비-인간 동물로부터의 세포 표면상에서의 SIRP α 단백질의 특징적인 발현을 예시한다.

[0131] 간단히 설명하면, 비장을 야생형 (WT) 및 인간화된 SIRP α 유전자에 대해 이형접합성인 마우스들로부터 분리하였다. 그런 다음 비장을 콜라게나제 D (Roche Bioscience)로 관류시키고 제조업체의 명세를 따라 적혈구를 ACK

용해 완충액으로 용해시켰다. 마우스 및 인간 SIRP α 의 세포 표면 발현을 형광 색소-포함된 항-CD3 (17A2), 항-CD19 (1D3), 항-CD11b (M1/70), 항-인간 SIRP α (SE5A5) 및 항-마우스 SIRP α (P84)를 사용하여 FACS에 의해 분석하였다. 유동 세포분석을 BD LSRFORTESSATM을 사용하여 수행하였다. CD11b+ 단핵세포의 표면 상에서 검출되는 인간 및 마우스 SIRP α 의 예시적인 발현을 도 2에 도시한다.

[0133] 도 2에서 알 수 있는 것과 같이, 마우스 및 인간화된 SIRP α 둘 다의 발현은 분명하게 이형접합성 마우스로부터의 CD11b+ 단핵세포의 표면 상에서 검출 가능하였다.

실시예 3. 인간화된 SIRP 비-인간 동물에서 인간 세포 이식

[0135] 이 실시예는 인간화된 SIRP α 유전자를 가지는 본 발명의 비-인간 동물에서 인간 조혈 줄기세포의 개선된 이식을 예시한다.

[0136] 간단히 설명하면, 인간화된 SIRP α 유전자가 있거나 없는 Rag2 KO IL2R γ^{null} 마우스들을 병원체-없는 조건하에서 길렀다. 신생 마우스 (2 내지 5일령)들을 240 cGy로 조사하고 1×10^5 CD34+ 인간 조혈 줄기세포를 간-내로 주입하였다. 마우스들을 이식후 10 내지 12주 후에 출혈시키고 혈액을 형광색소-포함된 항-인간 CD45 (HBO), 항-인간 CD3 (SK7), 항-인간 CD19 (HIB19) 및 항-마우스 CD45 (30-F11)를 사용하여 FACS에 의해 분석하여 인간 면역 시스템의 재구성에 대해 조사하였다. 마우스의 유전적 배경은 BALB/cTa x 129/SvJae이다.

[0137] 야생형, 인간화된 SIRP α 에 대해 이형접합성인 마우스, 인간화된 SIRP α 에 대해 동형접합성인 마우스 및 ALB-Rag2^{-/-} IL2R γ c^{-/-} (DKO) 마우스에서의 인간 CD34+ 세포의 예시적인 백분율을 도 3 내지 5에 나타낸다.

[0138] 이 실시예에서 알 수 있는 것과 같이, 인간화된 SIRP α 유전자에 동형접합성인 마우스들은 시험된 다른 계통에 비교하여 말초 (예컨대 혈액)에 최고 백분율의 인간 CD34+ 세포를 제공함으로써 인간 CD34+ 세포의 개선된 이식을 증명한다.

[0139] 이들 데이터를 함께 취합하면, 인간화된 SIRP α 는 본원에서 기술되는 마우스에서 마우스의 세포 표면상에서의 발현을 통해 기능적이며, 인간 CD34+ 조혈 줄기세포의 이식을 지지할 수 있음을 증명한다.

실시예 4. BRG 마우스에서 Raji 림프종 종양 성장에 미치는 Ab 1의 효능의 평가

요약

[0142] Ab 1은 T 세포 수용체 (TCR) 복합체와 결합된 T 세포 항원인 CD3, 및 정상적인 B 세포 및 여러 B 세포 계통 악성 종양에 존재하는 B 세포 표면 항원인 CD20에 결합하는 이중특이성 항체 (bsAb)이다. Ab 1은 TCR의 CD3 하위 유닛에 결합함으로써 세포독성 T 세포와 CD20-발현 세포를 가교시키기 위해 디자인되고, 결과적으로 CD20-지시된 다클론성 T 세포 사멸을 초래한다. CD20은 면역치료법에 대해 임상적으로 인증된 표적이고; 키메라 항체인 리툭시맙은 비호지킨 림프종 (NHL) 및 만성 림프구성 백혈병 (CLL)의 치료에 대해 승인되었다. 비록 환자들이 리툭시맙에 대해 내성이 될 수는 있지만, CD20의 발현의 손실은 전형적으로 관찰되지 않는다. 그러므로, CD20-포지티브 종양 세포를 세포독성 T 세포에 가교시키는 이중특이성 항체는 잠재적인 항-종양 전략을 나타낸다.

[0143] 이 연구에서, 인간 B 세포 림프종 (Raji) 종양 성장에 미치는 CD20xCD3 bsAb Ab 1을 사용한 치료 효과를 마우스 종양 모델에서 조사하였다. 모델은 SIRP α 에 대해 인간화된 hCD34+ 이식된 BALB/c-Rag2null IL2r γ null (BRG) 마우스를 활용하였다. 인간 T, B 및 NK 세포뿐만 아니라 과립구, 단핵세포 및 수지상 세포 (DC)를 가지는 이들 마우스를 Ab 1로 주 2회 처리하였고, 그 결과 비히를 대조표준 및 비-결합 대조표준 mAb, 대조표준 Ab 5와 비교하여 Raji 종양 성장의 상당한 억제를 초래하였다. Ab 1 처리는 0.4 mg/kg 및 0.04 mg/kg 둘 다에서 전 처리기간을 통해 비히를 대조표준 그룹보다 큰 유의미로 ($p < 0.0001$) 종양 성장을 억제하였다. 어떠한 처리 그룹에서도 유의미한 체중 손실은 관찰되지 않았다. 이들 결과는 인간 면역 세포를 가지는 마우스에서 Ab 1이 Raji 종양을 표적화하고, 결과적으로 상당한 종양 억제를 초래하는 것을 보여준다.

물질 및 방법

물질

시험 화합물 및 대조 항체

[0147] 시험 화합물: Ab 1.

[0148] 대조 항체: 대조표준 Ab 5.

[0149] 시약

표 4

시약 목록

시약	공급원	확인
Raji 세포	Regeneron 코어 시설	Raji P 1-4-10 4회 계대
인간 태아 간으로부터 분리된 인간 CD34+ 조혈 줄기 세포 (HSC)	Advanced Biosciences Resource, Inc.	
hPBMCs	Reachbio	카탈로그 #0500-300, Lot #130322
L-히스티딘	Amresco	카탈로그 #181164-100G, Lot #3363E344
수크로오스	Biosolutions	카탈로그 #BIO640-07, Lot #0816012
RPMI	Irvine Scientific	카탈로그 #9160, Lot #9160100803
FBS	Tissue Culture Biologicals	카탈로그 #101, Lot #107062
페니실린/스트렙토마이신 /L-글루타민	Gibco	카탈로그 #10376-016, Lot #1411480
2-머캅토에탄올	Gibco	카탈로그 #21985-023, Lot #762405
항-인간 CD45	Invitrogen	카탈로그 #MHCD4518, Clone H130
항-인간 NKp46	BD Biosciences	카탈로그 #558051, Clone 9E2
항-인간 CD19	BD Biosciences	카탈로그 #555412, Clone HIB19
항-인간 CD3	Invitrogen	카탈로그 #MHCD0328, Clone S4.1
항-인간 CD14	BD Biosciences	카탈로그 #557742, Clone M5E2
항-인간 CD45	BD Biosciences	카탈로그 #557659, Clone 30-F11
BD Fortessa	BD Biosciences	특별 주문 기구

[0150]

시험 시스템

[0151]

이 보고에서 제시된 종양 연구는 신호 조절 단백질 알파 (SIRP α) 유전자에 대해 인간화된 24 내지 32주령의 수컷 및 암컷 BALB/c-Rag2null IL2rγnull (BRG) 면역결핍 마우스를 사용하였다. 이것들은 Regeneron에서 배아 줄기 (ES) 세포 표적화에 의해 제조하였다 (Strowig et al., Proc Natl Acad Sci U S A, 108(32): 13218-13223 (2011)). CD47을 인식할 때, SIRP α는 마크로파지에 의한 CD47 포지티브 세포의 제거를 억제한다. 이전 연구들은 인간 SIRP α 트랜스유전자를 발현하는 BRG 마우스들이 인간 HSC의 이식을 증강시켰음을 보여주었다 (Strowig et al., Proc Natl Acad Sci U S A, 108(32):13218-13223 (2011)).

[0152]

신생 SIRP α BRG 새끼들을 조사하였고 (irradiated) 태아 간으로부터 유도된 hCD34+ 조혈 선구 세포로 이식하였다 (Traggiai, et al., Science, 304(5667): 104-107 (2004)). 이를 인간 HSC는 인간 T,B 및 NK 세포뿐 아니라, 과립구, 단핵세포 및 수지상 세포 (DC)에 대해 발생한다. 순환하는 인간 B 세포의 낮은 수준으로 인해, 순환하는 인간 IgG의 수준도 낮다. 나아가, 이를 마우스는 배중심 (germinal center)을 발생시키지 않고, 림프절이 부족하며 T 및 B 세포가 고갈된다면 제한된 T 및 B 세포 보충을 가진다. 쥐과 단핵세포, DC 및 과립구는 마찬가지로 존재가 유지된다. 면역 세포 조성을 혈액의 유동 세포분석에 의해 확인하였고, 마우스들을 종양 연구에 사용하기 전에 % 인간 CD45 이식에 의해 랜덤화하였다. 마우스들을 0일에 Raji 종양 세포로 이식하고, 종양 성장을 차단하는 Ab 1의 능력을 4주에 걸쳐 시험하였다. 체중 및 종양 부피를 이식 후 3, 6, 9, 13, 16, 20, 23, 27, 30 및 34일에 기록하였다.

[0153]

실험 디자인

[0154]

SIRP α BRG 마우스에서 인간 면역 시스템의 재구성

[0156] 면역결핍 BALB/c Rag2 $\text{-}\gamma\text{-c-/-}$ (BRG) 인간 SIRP alpha (SIRP α BRG) 마우스들을 Regeneron 동물 시설의 무균 분리기에서 사용하였다. 신생 마우스들을 인간 태아 간으로부터 분리한 인간 CD34+ 조혈 줄기세포 (HSC)를 주사하기 8 내지 24시간 전에 1 용량의 300cGrey로 조사하였다. 이식으로 12 내지 16주 동안 발생을 허용하고 이식된 세포의 수를 주기적으로 유동 세포분석에 의해 평가하였다. 전체 실험 기간 동안 동물들을 Regeneron 동물 시설에서 12-시간 주간/야간 리듬의 표준 조건하에 하우징하였고, 음식물과 물은 임의로 섭취하에 하였다. 우리 (cage) 당 동물의 수는 최대 5마리로 제한하였다.

[0157] 마우스 혈액을 분석하여 연구 전에 % 이식 수준을 측정하였다. 전형률 150 μL 의 2% EDTA (에틸렌다이아민테트라아세트산; 15 mg/mL)를 함유하고 있는 2개의 모세관 튜브에 수집하였다. 적혈구를 ACK 용해 완충액을 사용하여 3분 동안 용해시키고, 완충액을 PBS (칼슘 또는 마그네슘이 없음)로 중화시켰다. 세포를 Fc 블록으로 5분 동안 4°C에서 차단한 후 인간 CD45, NKp46, CD19, CD3 및 CD14로 30분 동안 4°C에서 염색하였다. 샘플을 5-레이저 유동 세포분석 (BD Fortessa)에 의해 분석하였다. % 이식을 총 세포의 % 인간 CD45+ 세포로서 측정하였다.

SIRP α BRG 마우스에서 Raji 종양 연구 과정

[0159] 0일에, 5마리씩의 SIRP α BRG 마우스 그룹에 2×10^6 의 Raji 종양 세포를 피하로 투여하였다. 동일한 날에, 마우스들을 복강 내 (IP) 용량의 Ab 1 (0.4 또는 0.04 mg/kg), 0.4 mg/kg 용량의 비-결합 대조 mAb 대조표준 Ab 5 (인간 CD20 또는 CD3에 대한 교차-반응성 없이 고양이 항원에 결합함) 또는 비히클 단독으로 처리하였다. 마우스들에게 2 용량의 항체/주를 4주 동안 피하로 주었다. 종양 성장을 캘리퍼스로 3, 6, 9, 13, 16, 20, 23, 27, 30 및 34일에 측정하였다. 연구 그룹을 표 5에 요약한다.

표 5

SIRP α BRG 마우스에서 치료 그룹의 요약

그룹	종양	항체	용량 (mg/kg)	경로	스케줄	마우스 수
대조표준 그룹	Raji	항체 없음 (비히클 단독)	0	IP	2x/wk	5
	Raji	대조표준 Ab 5	0.4	IP	2x/wk	5
실험 그룹	Raji	Ab 1	0.4	IP	2x/wk	5
	Raji	Ab 1	0.04	IP	2x/wk	5

[0160]

특수한 과정

[0162] 시약의 제조

[0163] Ab 1 및 대조표준 Ab 5를 각각 원하는 농도로 비히클 (10 mM 히스티딘, 5% 수크로오스, pH 5.8)로 회석하였다. Regeneron 코어 시설로부터 Raji 세포를 얻어서 (4 계대) 배양 배지: RPMI 1640 +10% FBS + Pen Strep-L-Glu + 머캡토에탄올에 유지하였다. Raji 세포를 원하는 농도로 배지에서 회석하였다.

통계학적 분석

[0165] GraphPad 소프트웨어 Prism 5.0 (Macintosh 버전)을 사용하여 통계학적 분석을 수행하였다. 통계상의 유의미를 Tukey의 시험-후 다중 비교를 사용하여 이원변량분석에 의해 측정하였다. 각각의 판독값으로부터의 데이터를 처리 그룹 전체에 걸쳐 비교하였다. $p < 0.05$ 의 한계값을 통계학적으로 유의미한 것으로 간주하였고, *로 표시하였다. 연구가 끝나기 전에 사망한 마우스들은 이원변량분석에 의해 분석하기 위하여 표시된 통계학적 분석으로서의 조합된 종양 성장 곡선 (개별적인 마우스 성장 곡선이 아님) 그래프로부터 제외시켰다.

결과

[0167] Ab 1은 hCD34+ 이식된 SIRP α BRG 마우스에서 Raji 종양 세포 성장을 억제한다

[0168] Ab 1은 hCD34+ 이식된 SIRP α BRG 마우스들에서 비히클 대조표준 및 비-결합 대조표준과 비교하여 Raji 종양 성장을 억제하였다 (도 6). 신생 SIRP α BRG 새끼들을 조사하였고 (irradiated) 인간 T, B 및 NK 세포뿐 아니라 파립구, 단핵세포 및 DC에 대해 발생된 조혈 선구 세포 (Traggiai, et al, Science, 304(5667):104-107

(2004))로서 hCD34+ 태아 간 세포로 이식하였다. 0일에, hCD34+ 이식된 SIRP α BRG 마우스들에게 2×10^6 의 Raji 종양 세포를 퇴여 투여하였다. 동일한 날에 마우스들을 복강내 (IP) 용량의 Ab 1 (0.4 또는 0.04 mg/kg) 또는 비-결합 대조 mAb 대조표준 Ab 5 또는 비히를 단독으로 처리하고, 이어서 연구를 통틀어 주 2회 투여하였다.

[0169] 비히를 대조표준 및 비-결합 대조 그룹에 비교하여, 종양 이식후 34일에 0.04 mg/kg ($p < 0.0001$) 또는 0.4 mg/kg ($p < 0.0001$)의 용량으로 투여된 Ab 1은 Raji 종양 성장을 상당히 억제하였다 (도 7). 나아가, Ab 1 처리의 효과는 용량-의존적이었고, 0.04 mg/kg Ab 1과 비교하여 0.4 mg/kg Ab 1이 연구를 통틀어 성장을 완전하게 억제하였는데, 30일에 종양 성장을 완전하게 억제하였다. Ab 1 또는 비-결합 대조 mAb 중 어느 것도 연구를 통틀어 마우스 체중에는 유의미한 영향을 나타내지 않았다 (도 8).

결론

[0171] Raji 종양 성장에 미치는 Ab1, CD20xCD3 bsAb로의 치료 효과를 마우스 모델에서 조사하였다. Ab 1은 인간 T, B 및 NK 세포뿐 아니라 과립구, 단핵세포 및 DC를 가지는 hCD34+ 이식된 SIRP α BRG 마우스에서의 종양 성장 억제에 효과적이었다. Ab 1으로의 주 2회 치료는 비히를 대조표준 및 비-결합 대조표준에 비교하여 Raji 인간 B 세포 럼프종 종양 성장의 상당하고 용량-의존적인 억제를 초래하였다. 유의미한 체중 손실은 어떠한 치료 그룹에서도 관찰되지 않았다. 이를 결과는 인간 면역 세포를 가지는 마우스에서 Ab 1이 Raji 종양을 표적화하고, 결과적으로 상당한 종양 성장 억제를 초래함을 보여준다.

등가율

[0173] 상기 기술된 본 발명의 적어도 하나의 구체예의 여러 측면을 가지면, 기술분야의 숙련자들에 의해 다양한 변경, 변형 및 개선이 기술분야의 숙련자들에게 쉽게 일어날 것이라는 것이 인지될 것이다. 그런 변경, 변형 및 개선은 본 개시의 일부인 것으로 의도되며 발명의 사상 및 범주 내에 있는 것으로 의도된다. 따라서, 전술한 설명 및 도면은 실례로만 제공되고 발명은 이어지는 청구범위에 의해 상세하게 기술된다.

[0174] 청구범위에서 청구 요소를 변형시키기 위해 "제 1", "제 2", "제 3" 등과 같이 서수 용어를 사용하는 것은 그 자체로서는 어떠한 우선권, 선행 또는 다른 청구 요소를 뛰어넘는 한 청구 요소의 순서 또는 방법 파트가 수행되는 시간적인 순서를 함축하는 것은 아니지만, 단순히 청구 요소들을 구별하기 위하여 어떤 명칭을 가지는 한 청구 요소를 동일 명칭을 가지는 다른 요소와 구별하기 위한 (그러나 서수 용어의 사용을 위한) 표지로서 사용된다.

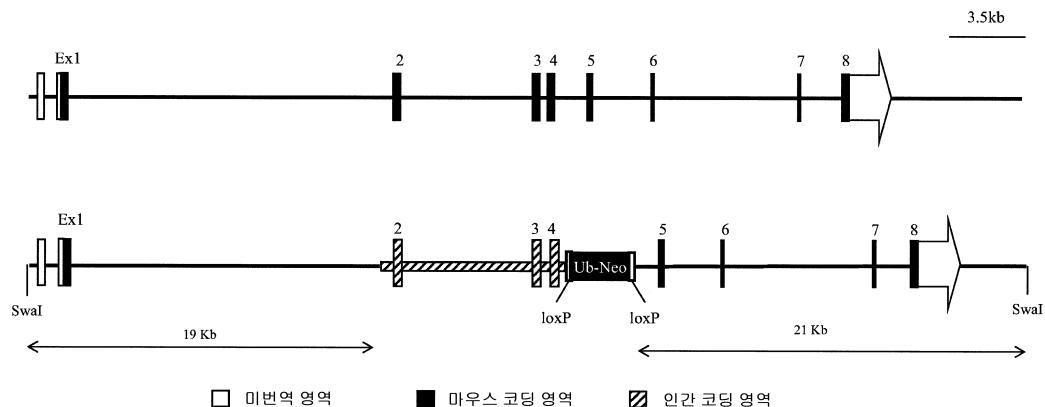
[0175] 본원의 명세서 및 청구범위에서 "하나"를 나타내는 단어들은 명백하게 반대로 표시되지 않는 한, 다수의 대상을 포함하는 것으로 인지되어야 한다. 그룹의 하나 또는 그 이상의 구성원들 사이에 "또는"을 포함하는 청구범위 또는 설명은 그 그룹의 구성원 중 하나, 하나 이상, 또는 전부가 주어진 생성물 또는 과정에 존재하거나, 사용되거나, 또는 그렇지 않고 관련된다면, 맥락으로부터 반대로 표시되거나 그렇지 않은 경우 명백하지 않는 한, 만족되는 것으로 여겨진다. 발명은 그룹의 정확하게 하나의 구성원이 주어진 생성물 또는 과정에 존재하거나, 사용되거나 또는 그렇지 않은 경우 관련되는 구체예들을 포함한다. 발명은 또한 그룹의 하나 이상, 또는 전체 구성원이 주어진 생성물 또는 과정에 존재하거나, 사용되거나 또는 그렇지 않은 경우 관련되는 구체예들을 포함한다. 나아가, 발명은 다르게 표시되지 않는 한 또는 기술분야의 숙련자에게 모순 또는 불일치가 발생할 것이 명백하지 않는 한, 하나 또는 그 이상의 열거된 청구범위로부터 하나 또는 그 이상의 제한, 요소, 절, 설명하는 용어 등이 동일한 기초 청구항 (또는, 적절하게, 어떠한 다른 청구항)에 대한 다른 종속항에 도입되는 모든 변화, 조합 및 치환을 포함하는 것이 인지될 것이다. 요소들이 목록으로서 제시되는 경우에 (예컨대 Markush 그룹으로 또는 유사한 포맷으로), 요소들의 각 하위그룹 또한 개시되는 것이고, 어떠한 요소(들)이든지 그 그룹으로부터 제거될 수 있다는 것이 인지되어야 한다. 일반적으로, 발명 또는 발명의 측면들이 특정 요소, 특징 등을 포함하는 것으로서 언급되고, 발명 또는 발명의 측면들의 특정 구체예들이 그런 요소들로 구성되거나 또는 본질적으로 구성되는 것이 인지되어야 한다. 간단함을 목적으로 그런 구체예들은 모든 경우에 본원에서 구체적으로 글자 그대로 설명되지 않았다. 또한 발명의 어떠한 구체예 또는 측면은, 어떤 구체적인 배제가 명세서에서 인용되는지와 관계없이, 청구범위로부터 명백하게 배제될 수 있다는 것이 인지되어야 한다.

[0176] 기술분야의 숙련자들은 본원에 기술된 분석 또는 다른 과정에서 얻어진 값들에 대해 전형적인 표준편차 또는 오차가 기여한다는 것을 인지할 것이다.

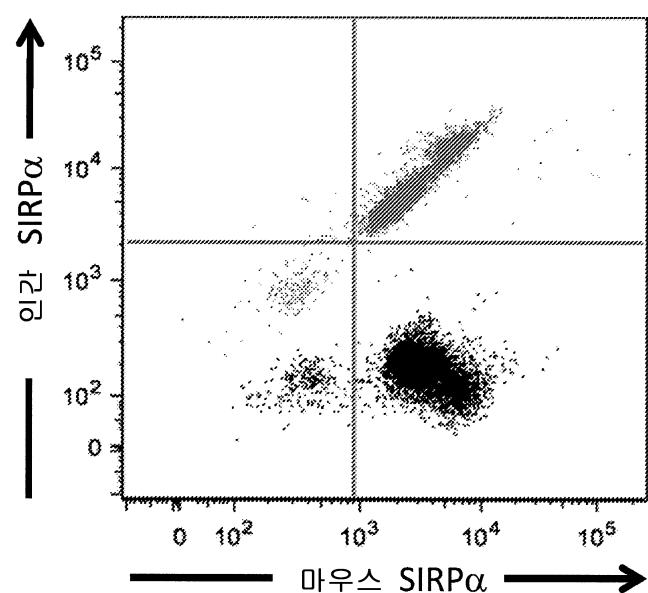
[0177] 발명의 배경을 기술하고 발명의 실시와 관련하여 추가의 상세한 설명을 제공하기 위하여 본원에서 참조된 공보물, 웹사이트 및 다른 참조 재료들은 본원에 참조로 포함된다.

도면

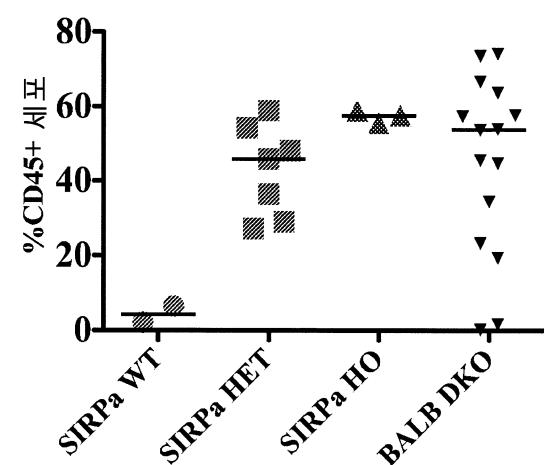
도면1



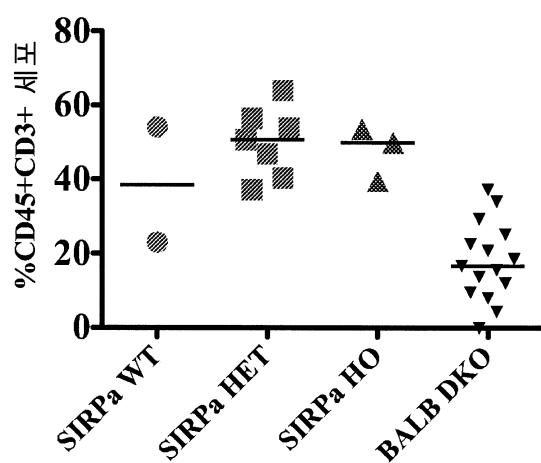
도면2



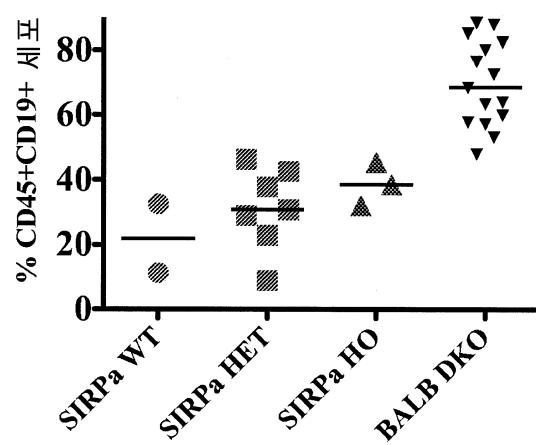
도면3



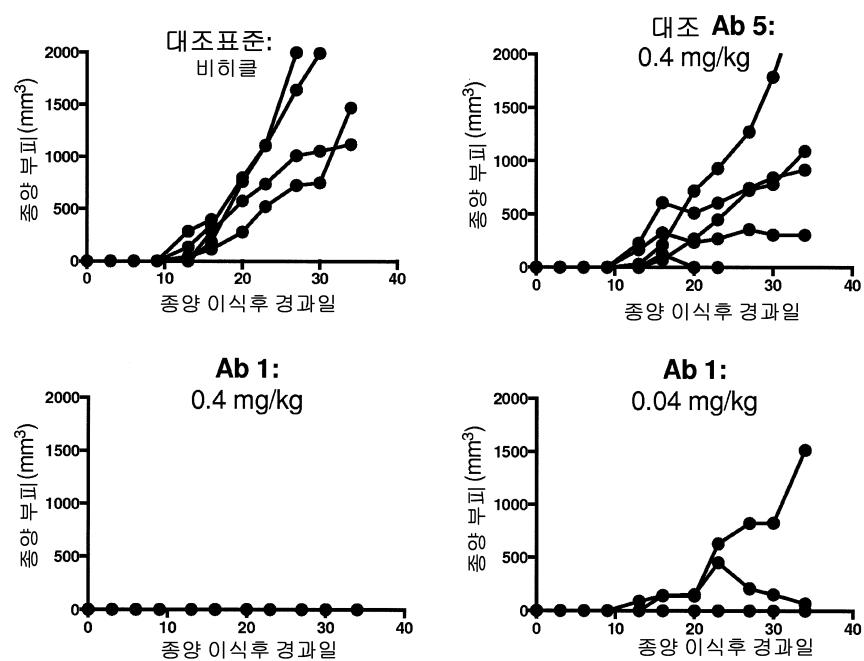
도면4



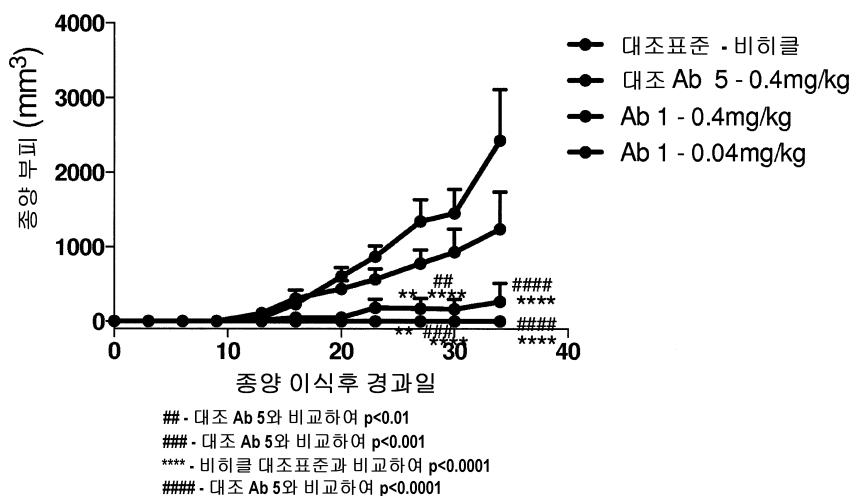
도면5



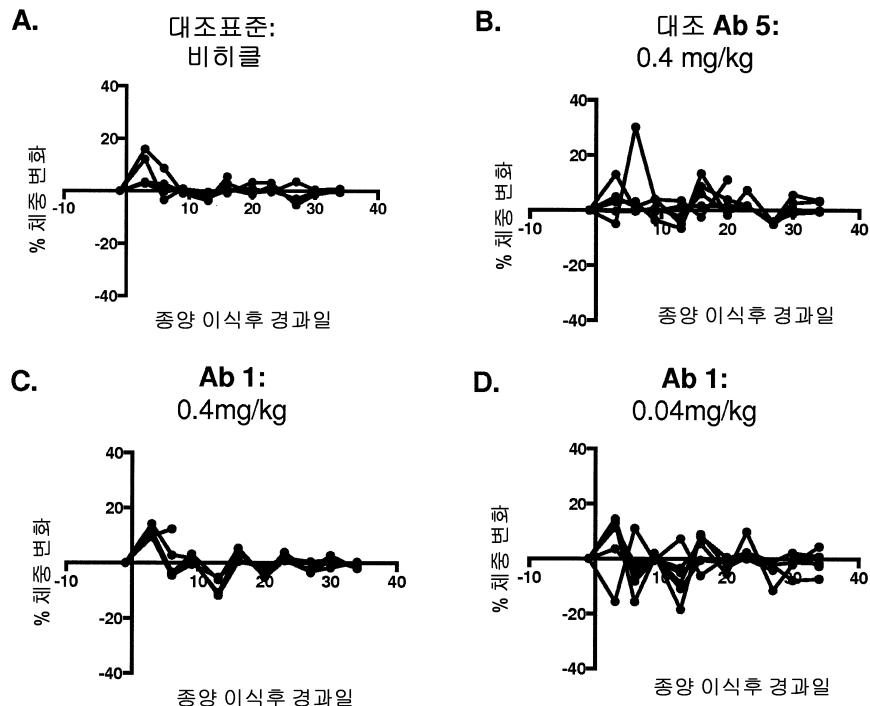
도면6



도면7



도면8



서 열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Regeneron Pharmaceuticals, Inc.

Murphy, Andrew J.

<120> NON-HUMAN ANIMALS HAVING A HUMANIZED SIGNAL-REGULATORY PROTEIN

GENE

<130> 31014 (3400P1)

<150> 61881261

<151> 2013-09-23

<160> 8

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 4007

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 1

gcgcgtggcc gggccgcct cgcgctggcc tcgcgacggc tccgcacagc ccgcactcg	60
tctgcgagct gtccccgctc gcgcttgctc tccgatctcc gtccccgctc cctctccctc	120
ttccctctccc cctcttctc ttcctctcgc tatccgctcc cccgcccccg tgcccttgcc	180
tctgcgcctg gctccctcgg gtccgctccc ctccgcgc ggcgtggccc ggcgtcacgc	240
tcccgaggatc tccccgctcg gccgcgtctc attgtggag ggggtcagat caccccgccg	300
ggcggtggcg ctggggggca gcggaggggg agggcccta gtcgttgcgc cgccgcgc	360
gcccgcctgc cgagcgcgtc accgcgcgtc ctccctcctt gctctgcagc cgccgcgc	420
ggagccgcgc ggcccgcccc ctggccgcct agggccgcgtc ctgctctgcc tgctgcctc	480
cgcgtctgt ttctgtacag gagccacggg gaaggaactg aagggtgactc agcctgagaa	540
atcagtgtct gttgtgtctc gggattcgac cgttctgaac tgcaacttgc cctccttgtt	600
gccgggtggga cccatttaggt ggtacagagg agtagggcca agccggctgt tgatctacag	660
tttcgcagga gaatacgttc ctcgaattag aaatgtttca gatactacta agagaaacaa	720
tatggacttt tccatccgta tcagtaatgt cacccagca gatgctggca tctactactg	780
tgtgaagttc cagaaggat catcagagcc tgacacagaa atacaatctg gagggggAAC	840
agaggcttat gtactcgcca aacttctcc accggaggta tccggccctc cagacagggg	900
catacctgac cagaaagtga acttcacctg caagtctcat ggctctctc cccgaaatat	960
caccctgaag tggttcaaag atggcaaga actccacccc ttggagacca cggtgaaccc	1020
tagtgaaag aatgtctctt acaacatctc cagcacagtc aggggtggta taaaactccat	1080
ggatgttaat tctaaggta tctgcgaggt agcccacatc accttggata gaagccctct	1140
tctgggatt gctaacctgt ctaacttcat ccgagttca cccaccgtga aggtcaccca	1200
acagtccccg acgtcaatga accaggtgaa cctcacctgc cgggctgaga gtttctaccc	1260
cgaggatctc cagctgatct ggctggagaa tggaaacgta tcacgaaatg acacgccccaa	1320
gaatctcaca aagaacacgg atgggaccta taattacaca agttgttcc tggtaactc	1380

atctgctcat agagaggacg tgggtttcac gtgccaggtg aagcacgacc aacagccagc	1440
gatcacccga aaccataccg tgctggatt tgcccactcg agtgatcaag ggagcatgca	1500
aaccttcct gataataatg ctacccacaa ctggaatgtc ttcatcggtg tggcggtggc	1560
gtgtgcttg ctctgttgc tgctgttgc tgctctcac ctctccgga tcaaacagaa	1620
gaaagccaag gggtaacat cttccacacg gttgcacgag cccgagaaga acgcaggaa	1680
aataacccag atccaggaca caaatgacat caacgacatc acatacgcag acctgaatct	1740
gccccaaagag aagaagcccg caccccgggc ccctgagcct aacaaccaca cagaatatgc	1800
aaggcatttag acaggcaaaag tgccttaggc agaggatacc ctacccatg ctgacctgga	1860
catggccac ctccgggg cacagccagc ccccaagcct gagccatctt tctcagagta	1920
tgcttagtgc caggtccaga ggaagtgaat ggggctgtgg tctgtactag gccccatccc	1980
cacaagttt ctgttctac atggagtggc catgacgagg acatccagcc agccaatcct	2040
gtccccagaa gcccagggtgg cacgggtctt aggaccagg gtaagggtgg ccttgcctt	2100
ccctccgtgg ctcttcaaca cctcttggc acccaegtcc cttcttcgg gaggctgggt	2160
gttgcagaac cagagggcga actggagaaa gctgcctgga atccaagaag ttttgctt	2220
cggcccatca ctctgggtc tggatcctgg tcttggcaac cccaggttgc gtccttgatg	2280
ttccagagct tggcttctg tgtggagaag agctcaccat ctctacccaa cttgagctt	2340
gggaccagac tccctttaga tcaaaccgcc ccatctgtgg aagaactaca ccagaagtca	2400
gcaagtttc agccaacagt gctggctcc ccaccccca ggctgactag ccctggggag	2460
aaggaacctt ctccctctag accagcagag actccctggg catgttcaat gtggccccac	2520
ctcccttcca gtcccagctt gtttcccca gctagacta actcagcagc atcgcttgt	2580
ggacgcctgt aaattattga gaaatgtgaa ctgtgcagtc tttaagctaa ggttttagaa	2640
aatttgattt atgctgttta gttttttttt cttttaatt tctttttttt	2700
ttttgatttt ttttcttcc cttaaaacaa cagcagcagc atcttggctc tttgtcatgt	2760
gttgaatggg tgggtttgtt gaagtctgag gtctaacat ttattgttctt ggaaggattt	2820
tcttacagca gaaacagatt ttttcaat tcccagaatc ctgaggacca agaaggatcc	2880
ctcagctgct actccagca cccagcgtca ctggacgaa ccaggccctg ttcttacaag	2940
gccacatggc tggcccttg cttccatggc tactgtggta agtgcagcct tgcgtgaccc	3000
aatgcgtacc taatgttggc cattccacat tgagggacaa agtgcagtc tgccccctt	3060
cactcacaag cacttcagag gcatgcagag agaaggacaa ctggccagc tctctgaggt	3120

aatcagtgca aggaggagtc cgaaaaaa cagcaaacct cagcaggatc acactggAAC	3180
agaacctggT catacctgtG acaacacAGC tgtgagccAG ggcaAAccAC ccactgtcac	3240
tggctcgaga gcttgggcAG aggctctgac cctccaccCT ttaaactgga tgccgggccc	3300
tggctggcc caatGCCAAG tggttatGCC aaccctgact atctggctt aacatgtAGC	3360
tcaggaagtG gaggcgctaa tgtccccat ccctgggat tcctgattcc agctattcat	3420
gtaaggcAGAG ccaacctGCC tatttctgta ggtgcgactG ggatgttagG agcacagcaa	3480
ggacccagct ctgttagggct ggtgacctGA tacttctcat aatggcatct agaagttAGG	3540

ctgagttggc ctcactggcc cagcaaACCA gaacttgtct ttgtccggc cattttttg	3600
ggctgtttc taattccaaa gggTTgggtG gtAAAGCTCC acccccttct cctctgccta	3660
aagacatcac atgtgtatac acacacGGGT gtatAGATGA gttaaaAGAA tgtcctcgct	3720
ggcatctaa ttttgttta agttttttG gagggagaaaa ggaacaaggc aaggaaagat	3780
gtgttagctt ggcttaacc aggcaGcTG ggggctccca agcctatgga accctggtaC	3840
aaagaagaga acagaagcgc cctgtgagGA gtgggatttG ttttctgta gaccagatga	3900
gaaggaaaca gcccctgttt tgtacatagt tgcaacttaa aattttggc ttgcaaaata	3960

ttttgtaat aaagatttct gggtaacaat aaaaaaaaaa aaaaaaaa	4007
---	------

<210> 2

<211> 509

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 2

Met Glu Pro Ala Gly Pro Ala Pro Gly Arg Leu Gly Pro Leu Leu Leu

1 5 10 15

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

20 25 30

Glu Leu Lys Val Thr Gln Pro Glu Lys Ser Val Ser Val Ala Ala Gly

35 40 45

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

50 55 60

Pro Ile Arg Trp Tyr Arg Gly Val Gly Pro Ser Arg Leu Leu Ile Tyr

65 70 75 80

Ser Phe Ala Gly Glu Tyr Val Pro Arg Ile Arg Asn Val Ser Asp Thr

85 90 95

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

100 105 110

Pro Ala Asp Ala Gly Ile Tyr Tyr Cys Val Lys Phe Gln Lys Gly Ser

115 120 125

Ser Glu Pro Asp Thr Glu Ile Gln Ser Gly Gly Thr Glu Val Tyr

130 135 140

Val Leu Ala Lys Pro Ser Pro Pro Glu Val Ser Gly Pro Ala Asp Arg

145 150 155 160

Gly Ile Pro Asp Gln Lys Val Asn Phe Thr Cys Lys Ser His Gly Phe

165 170 175

Ser Pro Arg Asn Ile Thr Leu Lys Trp Phe Lys Asp Gly Gln Glu Leu

180 185 190

His Pro Leu Glu Thr Thr Val Asn Pro Ser Gly Lys Asn Val Ser Tyr

195 200 205

Asn Ile Ser Ser Thr Val Arg Val Val Leu Asn Ser Met Asp Val Asn

210 215 220

Ser Lys Val Ile Cys Glu Val Ala His Ile Thr Leu Asp Arg Ser Pro

225 230 235 240

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

245 250 255

Val Lys Val Thr Gln Gln Ser Pro Thr Ser Met Asn Gln Val Asn Leu

260 265 270

Thr Cys Arg Ala Glu Arg Phe Tyr Pro Glu Asp Leu Gln Leu Ile Trp

275 280 285

Leu Glu Asn Gly Asn Val Ser Arg Asn Asp Thr Pro Lys Asn Leu Thr

290 295 300

Lys Asn Thr Asp Gly Thr Tyr Asn Tyr Thr Ser Leu Phe Leu Val Asn

305 310 315 320

Ser Ser Ala His Arg Glu Asp Val Val Phe Thr Cys Gln Val Lys His

325 330 335

Asp Gln Gln Pro Ala Ile Thr Arg Asn His Thr Val Leu Gly Phe Ala

340 345 350

His Ser Ser Asp Gln Gly Ser Met Gln Thr Phe Pro Asp Asn Asn Ala

355 360 365

Thr His Asn Trp Asn Val Phe Ile Gly Val Gly Val Ala Cys Ala Leu

370 375 380

Leu Val Val Leu Leu Met Ala Ala Leu Tyr Leu Leu Arg Ile Lys Gln

385 390 395 400

Lys Lys Ala Lys Gly Ser Thr Ser Ser Thr Arg Leu His Glu Pro Glu

405 410 415

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

420 425 430

Asp Ile Thr Tyr Ala Asp Leu Asn Leu Pro Lys Glu Lys Pro Ala

435 440 445

Pro Arg Ala Pro Glu Pro Asn Asn His Thr Glu Tyr Ala Ser Ile Glu

450 455 460

Thr Gly Lys Val Pro Arg Pro Glu Asp Thr Leu Thr Tyr Ala Asp Leu

465 470 475 480

Asp Met Val His Leu Ser Arg Ala Gln Pro Ala Pro Lys Pro Glu Pro

485 490 495

Ser Phe Ser Glu Tyr Ala Ser Val Gln Val Gln Arg Lys

500 505

<210> 3

<211> 4201

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 3

tccggccgc acccaccccc aagaggggcc ttcagtttgcggctcagag gcacgaccc	60
ctggggagggttaaaaggca gacgcccccc cgccccccgc gcccccgcc cccgactcct	120
tgcgcgcctc cagcctctcg ccagtggaa gcggggagca gccgcgcggc cggagtcgg	180
aggcgagggg aggtcgccg caactcccc ggtccacctt aagaggacga tgtagccagc	240
tgcagcgct gaccttagaa aaacaagttt gcgcaaagt gagcggggac ccggcctctg	300

ggcagcccc gccgcgttc cagtgcctc cagccctcg gggcgccgca gccgcggccc	360
atggagccg ccggcccgcc ccccgccgc ctggggccgc tgctctgcct gctgctcgcc	420
gcgtcctgcg cctggtcagg agtggcggtt gaggaggagc tgcaggtgat tcagcctgac	480
aagtccgtt tggtgtcagc tggagagaca gccactctgc gctgcactgc gacctcttg	540
atccctgtgg ggcccatcca gtggttcaga ggagctggac caggccggga attaatctac	600
aatcaaaaag aaggccactt ccccccggta acaactgtt cagacctcac aaagagaaac	660
aacatggact ttccatccg catcgtaac atcaccctcag cagatgccgg cacctactac	720
tgtgtgaagt tccggaaagg gagcccccgt gacgtggagt ttaagtctgg agcaggcact	780
gagctgtctg tgccgcctaa accctctgcc cccgtggat cggccctgc ggcgaggccc	840
acacccctcagc acacagttagt cttcacctgc gagtcccacg gttctcacc cagagacatc	900
accctgaaat gttcaaaaaa tgggaatgag ctctcagact tccagaccaa cgtggacccc	960
gtaggagaga gcgtgtccta cagcatccac agcacagcca aggtggtgct gaccgcgag	1020
gacgttcaact ctcaagtcat ctgcgaggtg gcccacgtca cttgcaggg ggacccttt	1080
cgtggactg ccaacttgc ttagaccatc cgagttccac ccaccttggg gttactcaa	1140
cagcccggtga gggcagagaa ccaggtgaat gtcacctgcc aggtgaggaa gtttacccc	1200
cagagactac agctgacctg gttggagaat ggaaacgtgt cccggacaga aacggcctca	1260
accgttacag agaacaagga tggtaacctac aactggatga gctggctct ggtaatgtt	1320
tctggccaca gggatgatgt gaagctcacc tgccaggtgg agcatgacgg gcagccagcg	1380
gtcagcaaaa gccatgacct gaaggcttca gcccacccga aggagcaggg ctcaaatacc	1440
gccgctgaga acactggatc taatgaacgg aacatctata ttgtggggg tttgtgtgc	1500
accttgcgtt tggccctact gatggcggcc ctctacccgt tccgaatcag acagaagaaa	1560
gcccaggcgtt ccacttcttc tacaagggtt catgagcccg agaagaatgc cagagaaata	1620
acacaggaca caaatgatata cacatatgca gacccgttacc tgcccaaggg gaagaaggct	1680
gctccccagg ctgcggagcc caacaaccac acggaggatgt ccaggattca gaccagcccg	1740
cagcccggtt cgaggacac cctcacctat gctgacccgtt acatggtcca cctcaacccgg	1800
accccaagg agccggcccc caagccttag ccgttccctt cagagtacgc cagcgtccag	1860
gtcccgagga agtgaatggg accgtggttt gctctagcac ccatctctac ggcgttttt	1920
gtcccacagg gagccggcgtt gatgagcaca gccaacccag ttccggagg gctggggcgg	1980
tgcaggctct gggacccagg ggccagggtt gctttctct ccccacccct cttggctct	2040
ccagcacttc ctggcagcc acggccccc ccccccacat tgccacatac ctggaggctg	2100
acgttgccaa accagccagg gaaccaacctt gggaaatggc cagaactgcc tgggtccaa	2160

ccttgttat tgaacccag gaaaaggaag aggtcgaacc aaccctgcgg aaggagcatg 4080

gttcaggag ttatattaa gactgctggg aaggaaacag gccccattt gtatatagtt 4140

gcaactaaa cttttgct tgcaaaatat tttttaata aagatttctg gctaataatg 4200

a 4201

<210> 4

<211> 504

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Met Glu Pro Ala Gly Pro Ala Pro Gly Arg Leu Gly Pro Leu Leu Cys

1	5	10	15
---	---	----	----

Leu Leu Leu Ala Ala Ser Cys Ala Trp Ser Gly Val Ala Gly Glu Glu

20	25	30
----	----	----

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

35	40	45
----	----	----

Glu Thr Ala Thr Leu Arg Cys Thr Ala Thr Ser Leu Ile Pro Val Gly

50	55	60
----	----	----

Pro Ile Gln Trp Phe Arg Gly Ala Gly Pro Gly Arg Glu Leu Ile Tyr

65	70	75	80
----	----	----	----

Asn Gln Lys Glu Gly His Phe Pro Arg Val Thr Thr Val Ser Asp Leu

85	90	95
----	----	----

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

100	105	110
-----	-----	-----

Pro Ala Asp Ala Gly Thr Tyr Tyr Cys Val Lys Phe Arg Lys Gly Ser

115	120	125
-----	-----	-----

Pro Asp Asp Val Glu Phe Lys Ser Gly Ala Gly Thr Glu Leu Ser Val

130	135	140
-----	-----	-----

Arg Ala Lys Pro Ser Ala Pro Val Val Ser Gly Pro Ala Ala Arg Ala

145	150	155	160
-----	-----	-----	-----

Thr Pro Gln His Thr Val Ser Phe Thr Cys Glu Ser His Gly Phe Ser

165	170	175
-----	-----	-----

Pro Arg Asp Ile Thr Leu Lys Trp Phe Lys Asn Gly Asn Glu Leu Ser

180 185 190

Asp Phe Gln Thr Asn Val Asp Pro Val Gly Glu Ser Val Ser Tyr Ser

195 200 205

Ile His Ser Thr Ala Lys Val Val Leu Thr Arg Glu Asp Val His Ser

210 215 220

Gln Val Ile Cys Glu Val Ala His Val Thr Leu Gln Gly Asp Pro Leu

225 230 235 240

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

245 250 255

Glu Val Thr Gln Gln Pro Val Arg Ala Glu Asn Gln Val Asn Val Thr

260 265 270

Cys Gln Val Arg Lys Phe Tyr Pro Gln Arg Leu Gln Leu Thr Trp Leu

275 280 285

Glu Asn Gly Asn Val Ser Arg Thr Glu Thr Ala Ser Thr Val Thr Glu

290 295 300

Asn Lys Asp Gly Thr Tyr Asn Trp Met Ser Trp Leu Leu Val Asn Val

305 310 315 320

Ser Ala His Arg Asp Asp Val Lys Leu Thr Cys Gln Val Glu His Asp

325 330 335

Gly Gln Pro Ala Val Ser Lys Ser His Asp Leu Lys Val Ser Ala His

340 345 350

Pro Lys Glu Gln Gly Ser Asn Thr Ala Ala Glu Asn Thr Gly Ser Asn

355 360 365

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

370 375 380

Ala Leu Leu Met Ala Ala Leu Tyr Leu Val Arg Ile Arg Gln Lys Lys

385 390 395 400

Ala Gln Gly Ser Thr Ser Ser Thr Arg Leu His Glu Pro Glu Lys Asn

405 410 415

Ala Arg Glu Ile Thr Gln Asp Thr Asn Asp Ile Thr Tyr Ala Asp Leu

420	425	430
Asn Leu Pro Lys Gly Lys Pro Ala Pro Gln Ala Ala Glu Pro Asn		
435	440	445
Asn His Thr Glu Tyr Ala Ser Ile Gln Thr Ser Pro Gln Pro Ala Ser		
450	455	460
Glu Asp Thr Leu Thr Tyr Ala Asp Leu Asp Met Val His Leu Asn Arg		
465	470	475
480		
Thr Pro Lys Gln Pro Ala Pro Lys Pro Glu Pro Ser Phe Ser Glu Tyr		
485	490	495
Ala Ser Val Gln Val Pro Arg Lys		
500		
<210> 5		
<211> 508		
<212> PRT		
<213> Homo sapiens		
<400> 5		
Met Glu Pro Ala Gly Pro Ala Pro Gly Arg Leu Gly Pro Leu Leu Leu		
1	5	10
15		
Cys Leu Leu Leu Ser Ala Ser Cys Phe Cys Thr Gly Val Ala Gly Glu		
20	25	30
Glu Glu Leu Gln Val Ile Gln Pro Asp Lys Ser Val Leu Val Ala Ala		
35	40	45
Gly Glu Thr Ala Thr Leu Arg Cys Thr Ala Thr Ser Leu Ile Pro Val		
50	55	60
Gly Pro Ile Gln Trp Phe Arg Gly Ala Gly Pro Gly Arg Glu Leu Ile		
65	70	75
80		
Tyr Asn Gln Lys Glu Gly His Phe Pro Arg Val Thr Thr Val Ser Asp		
85	90	95
Leu Thr Lys Arg Asn Asn Met Asp Phe Ser Ile Arg Ile Gly Asn Ile		
100	105	110
Thr Pro Ala Asp Ala Gly Thr Tyr Tyr Cys Val Lys Phe Arg Lys Gly		
115	120	125

Ser Pro Asp Asp Val Glu Phe Lys Ser Gly Ala Gly Thr Glu Leu Ser
 130 135 140
 Val Arg Ala Lys Pro Ser Ala Pro Val Val Ser Gly Pro Ala Ala Arg
 145 150 155 160

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

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

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

 His Pro Lys Glu Gln Gly Ser Asn Thr Ala Ala Asp Asn Asn Ala Thr
 355 360 365
 His Asn Trp Asn Val Phe Ile Gly Val Gly Val Ala Cys Ala Leu Leu

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

Asn Ala Arg Glu Ile Thr Gln Ile Gln Asp Thr Asn Asp Ile Asn Asp		
420	425	430
Ile Thr Tyr Ala Asp Leu Asn Leu Pro Lys Glu Lys Lys Pro Ala Pro		
435	440	445
Arg Ala Pro Glu Pro Asn Asn His Thr Glu Tyr Ala Ser Ile Glu Thr		
450	455	460
Gly Lys Val Pro Arg Pro Glu Asp Thr Leu Thr Tyr Ala Asp Leu Asp		
465	470	475
Met Val His Leu Ser Arg Ala Gln Pro Ala Pro Lys Pro Glu Pro Ser		
485	490	495

Phe Ser Glu Tyr Ala Ser Val Gln Val Gln Arg Lys	
500	505

<210> 6

<211> 200

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 6

agctctccta ccactagact gctgagaccc gctgctctgc tcaggactcg atttccagta	60
cacaatctcc ctcttgaaa agtaccacac atcctgggt gctttgcatt ttgtgtgaca	120
ctttgcttagc caggctcagt cctgggttcc aggtgggac tcaaacacac tggcacgagt	180

ctacatttggaa tatttttgtt	200
-------------------------	-----

<210> 7

<211> 199

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 7

gctccccatt cctcaactggc ccagccctc ttccctactc tttctagccc ctgcctcatc	60
tccctggctg ccattgggag cctgccccac tggaagccag tcgagataac ttcgtataat	120
gtatgtata cgaagtata tgcattgcct ccgcgcggg ttttggcgcc tcccgccggc	180
gccccctcc tcacggcga	199

<210> 8

<211> 200

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 8

cattctcagt attgtttgc caagttctaa ttccatcaga cctcgacactg cagccccctag	60
ataacttcgt ataatgtatg ctatacgaag ttatgcttagc tgtctcatag aggctggcga	120
tctggctcag ggacagccag tactgcaaag agtatccttg ttcatacctt ctcctagtg	180
ccatctccct gggacagtca	200