

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 969 389**

51 Int. Cl.:

A01K 67/027 (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.11.2015** **E 20215046 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.09.2023** **EP 3850946**

54 Título: **Animales no humanos que tienen un gen del grupo de diferenciación 47 humanizado**

30 Prioridad:

05.12.2014 US 201462087992 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
17.05.2024

73 Titular/es:

REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.
(100.0%)
777 Old Saw Mill River Road
Tarrytown, NY 10591-6707, US

72 Inventor/es:

GURER, CAGAN;
IOFFE, ELLA;
MUJICA, ALEXANDER y
THURSTON, GAVIN

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

Observaciones:

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o
Bemerkungen) en el folleto original publicado por
la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 969 389 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Animales no humanos que tienen un gen del grupo de diferenciación 47 humanizado

5 Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

Esta solicitud reivindica el beneficio de la solicitud de patente provisional de Estados Unidos n.º de serie 62/087.992, presentada el 5 de diciembre de 2014.

10 Antecedentes

La terapia contra el cáncer se puede dividir en cuatro categorías principales: quimioterapia/radioterapia, terapia hormonal, terapia dirigida e inmunoterapia. Se ha centrado intensamente la investigación y el desarrollo médicos en la terapia dirigida y se han logrado mejoras significativas, sin embargo, el cáncer sigue siendo un problema importante para los pacientes y para la industria de la salud en todo el mundo. Este gran problema se debe, en parte, a la capacidad de las células cancerosas para evadir los mecanismos de seguimiento de los sistemas inmunitarios innato y adaptativo, que es en parte el resultado de la inhibición de la eliminación fagocítica. En la actualidad, no existe un sistema *in vivo* para determinar de manera óptima el potencial terapéutico de nuevas terapias contra el cáncer diseñadas para activar la eliminación fagocítica de las células cancerosas y determinar los aspectos moleculares de cómo las células cancerosas proporcionan señales inhibitorias a los macrófagos y a las células fagocíticas. Un sistema de este tipo proporciona una fuente para ensayos de fagocitosis y funciones de macrófagos *in vivo*, y la identificación de nuevas terapias contra el cáncer dirigidas a proporcionar un entorno antitumoral mediante la promoción de señales profagocíticas al sistema inmunitario.

25 Sumario

La presente invención se basa en el reconocimiento de que es deseable genomanipular animales no humanos para permitir sistemas mejorados para identificar y desarrollar nuevas terapias contra el cáncer. La presente invención se basa también en el reconocimiento de que es deseable genomanipular animales no humanos para permitir un injerto mejorado de células madre hematopoyéticas humanas. Además, la presente invención también se basa en el reconocimiento de que son deseables animales no humanos que tengan un gen *CD47* humanizado y/o que expresen, que contengan o produzcan de otro modo un polipéptido *CD47* humano o humanizado, por ejemplo, para su uso en la identificación y desarrollo de terapias contra el cáncer que superen la toxicidad sistémica asociada con el bloqueo de *CD47* y superen la inhibición de la fagocitosis de células tumorales mediada por *CD47*, y proporcionen un sistema *in vivo* más eficaz para el injerto de células madre hematopoyéticas humanas que proporciona un aumento en la homeostasis de un número más amplio de tipos de células humanas. La invención se define mediante las reivindicaciones. En consecuencia, la presente invención proporciona un vector de ácido nucleico dirigido, que comprende

- 40 un brazo de homología en 5' que comprende una secuencia genómica cadena arriba del exón 2 de un gen *CD47* de ratón,
- un fragmento de ADN genómico que comprende los exones 2 a 7 de un gen *CD47* humano, un casete de selección de fármacos y
- 45 un brazo de homología en 3' que comprende una secuencia genómica cadena abajo del exón 7 de un gen *CD47* de ratón,
- en donde los brazos de homología en 5' y en 3' median la integración del fragmento genómico que comprende los exones 2 a 7 de un gen *CD47* humano en un locus *CD47* de ratón.

La presente invención también proporciona un roedor cuyo genoma comprende un gen *CD47* humanizado,

- 50 en donde el gen *CD47* humanizado codifica un polipéptido *CD47* humanizado que comprende una parte de un polipéptido *CD47* humano y una parte intracelular de un polipéptido *CD47* de roedor;
- en donde la parte del polipéptido *CD47* humano comprende el dominio extracelular y los dominios transmembrana del polipéptido *CD47* humano, y está codificada por los exones 2 a 7 de un gen *CD47* humano;
- 55 en donde la parte intracelular del polipéptido *CD47* de roedor está codificada por los exones cadena abajo del exón 7 de un gen *CD47* de roedor;
- en donde el gen *CD47* humanizado está operativamente unido a un promotor *CD47* de roedor; y
- en donde el genoma de roedor comprende además uno o más genes humanos o humanizados seleccionados de SIRPα, IL-3, M-CSF, GM-CSF y TPO.

- 60 El roedor de la presente invención tiene, por tanto, un genoma que comprende un gen *CD47* humanizado que comprende material genético de dos especies diferentes (un ser humano y un roedor). El gen *CD47* humanizado del roedor codifica un polipéptido *CD47* que comprende partes humanas y de roedor, en donde las partes humana y de roedor están unidas entre sí y forman un polipéptido *CD47* funcional.

- 65 El roedor de la presente invención puede comprender un gen *CD47* humanizado que comprende una parte intracelular

endógena de un polipéptido CD47 de roedor como se definió anteriormente y una parte de un polipéptido CD47 humano como se definió anteriormente, en donde el gen *CD47* humanizado está operativamente unido a un promotor CD47 endógeno de roedor.

- 5 Una parte intracelular de un polipéptido CD47 de roedor comprende los exones cadena abajo del exón 7 de un gen *CD47* de roedor. El gen *CD47* humanizado puede comprender opcionalmente además el exón 1 de un gen *CD47* de roedor. El exón 1 y los exones cadena abajo del exón 7 de un gen *CD47* de roedor pueden ser al menos un 50 %, al menos un 55 %, al menos un 60 %, al menos un 65 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 % o al menos un 98 % idénticos a los correspondientes exón 1 y los exones cadena abajo del exón 7 de un gen *CD47* de roedor que aparece en la tabla 3. El exón 1 y los exones cadena abajo del exón 7 de un gen *CD47* de roedor pueden ser idénticos a los correspondientes exón 1 y los exones cadena abajo del exón 7 de un gen *CD47* de ratón que aparece en la tabla 3.
- 10
- 15 Una parte humana puede codificar los aminoácidos 16 a 292 de un polipéptido CD47 humano. Una parte humana puede codificar los aminoácidos 19 a 292 de un polipéptido CD47 humano. La parte humana puede codificar los aminoácidos 19 a 141 de un polipéptido CD47 humano. La parte humana puede codificar los aminoácidos 19 a 127 de un polipéptido CD47 humano.
- 20 Los exones 2 a 7 de un gen *CD47* humano pueden ser al menos un 50 %, al menos un 55 %, al menos un 60 %, al menos un 65 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 % o al menos un 98 % idénticos a los correspondientes exones 2 a 7 de un gen *CD47* humano que aparece en la tabla 3. Los exones 2 a 7 de un gen *CD47* humano pueden ser idénticos a los exones 2 a 7 correspondientes de un gen *CD47* humano que aparece en la tabla 3.
- 25 Un roedor de la presente invención expresa un polipéptido CD47 que comprende el dominio extracelular y los dominios transmembrana de un polipéptido CD47 humano y una parte intracelular de un polipéptido CD47 de roedor. Un polipéptido CD47 puede traducirse en una célula de un roedor con un péptido señal de roedor. Un péptido señal de roedor puede ser un péptido señal de ratón o de rata.
- 30 Se puede expresar un polipéptido CD47 a partir de un gen *CD47* endógeno de roedor.
- 35 Una parte intracelular de un polipéptido CD47 de roedor puede comprender una cola intracitoplasmática que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos un 50 %, al menos un 55 %, al menos un 60 %, al menos un 65 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 % o al menos un 98 % idéntica a una cola intracitoplasmática de un polipéptido CD47 de ratón que aparece en la tabla 3. Una parte intracelular del polipéptido CD47 de roedor puede comprender una cola intracitoplasmática que tiene una secuencia de aminoácidos que es idéntica a una cola intracitoplasmática de un polipéptido CD47 de ratón que aparece en la tabla 3.
- 40 El dominio extracelular de un polipéptido CD47 humano puede comprender aminoácidos correspondientes a los restos 19 a 141 de un polipéptido CD47 humano. El dominio extracelular de un polipéptido CD47 humano puede comprender aminoácidos correspondientes a los restos 19 a 127 de un polipéptido CD47 humano. El dominio extracelular de un polipéptido CD47 humano puede comprender una secuencia de aminoácidos que es al menos un 50 %, al menos un 55 %, al menos un 60 %, al menos un 65 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 % o al menos un 98 % idéntica a una secuencia de aminoácidos correspondiente de un dominio extracelular de un polipéptido CD47 humano que aparece en la tabla 3. El dominio extracelular de un polipéptido CD47 humano puede comprender una secuencia de aminoácidos que es idéntica a una secuencia de aminoácidos correspondiente de un dominio extracelular de un polipéptido CD47 humano que aparece en la tabla 3.
- 45
- 50 También se describe en el presente documento un polipéptido CD47 codificado por el gen *CD47* de un roedor como se describe en el presente documento. Un polipéptido CD47 codificado puede comprender una secuencia de aminoácidos que es al menos un 50 %, al menos un 55 %, al menos un 60 %, al menos un 65 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 % o al menos un 98 % idéntica a la SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 o SEQ ID NO: 20. Un polipéptido CD47 codificado puede comprender una secuencia de aminoácidos que es idéntica a la SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 o SEQ ID NO: 20.
- 55
- 60 También se describe en el presente documento un gen *CD47* humanizado que comprende exones cadena abajo del exón 7 de un gen *CD47* de roedor unido operativamente a los exones 2 a 7 de un gen *CD47* humano. Un gen *CD47* humanizado descrito en el presente documento comprende exones de roedor cadena abajo del exón 7 de un gen *CD47* de roedor que codifica una parte intracelular de un polipéptido CD47 de roedor y los exones 2 a 7 humanos de un gen *CD47* humano que codifican el dominio extracelular y los dominios transmembrana de un polipéptido CD47 humano. Un gen *CD47* humanizado puede comprender además exones de roedor que codifican un péptido señal, en su totalidad o en parte.
- 65

La presente invención también proporciona una célula o tejido aislado de un roedor de la presente invención, en donde la célula o tejido aislado comprende el gen *CD47* humanizado y uno o más genes humanos o humanizados en el genoma. Una célula puede seleccionarse de una célula dendrítica, linfocito (p. ej., un linfocito B o T), macrófago y monocito. Se puede seleccionar un tejido de tejido adiposo, vejiga, cerebro, mama, médula ósea, ojo, corazón, intestino, riñón, hígado, pulmón, ganglio linfático, músculo, páncreas, plasma, suero, piel, bazo, estómago, timo, testículos, óvulo y una combinación de los mismos.

La presente invención también proporciona una célula madre embrionaria (ME) de roedor aislada, cuyo genoma comprende un gen *CD47* humanizado,

en donde el gen *CD47* humanizado codifica un polipéptido *CD47* humanizado que comprende una parte de un polipéptido *CD47* humano y una parte intracelular de un polipéptido *CD47* de roedor;

en donde la parte del polipéptido *CD47* humano comprende el dominio extracelular y los dominios transmembrana del polipéptido *CD47* humano, y está codificada por los exones 2 a 7 de un gen *CD47* humano;

en donde la parte intracelular del polipéptido *CD47* de roedor está codificada por los exones cadena abajo del exón 7 de un gen *CD47* de roedor;

en donde el gen *CD47* humanizado está operativamente unido a un promotor *CD47* de roedor; y

en donde el genoma de roedor comprende además uno o más genes humanos o humanizados seleccionados de *SIRPα*, *IL-3*, *M-CSF*, *GM-CSF* y *TPO*.

Una célula madre embrionaria de roedor aislada puede ser una célula madre embrionaria de ratón y puede ser de la cepa 129, la cepa C57BL/6 o la cepa BALB/c. Una célula madre embrionaria de roedor aislada puede ser una célula madre embrionaria de ratón y puede provenir de una mezcla de cepas 129 y C57BL/6.

También se describe en el presente documento el uso de una célula madre embrionaria de roedor aislada como se describe en el presente documento para crear un roedor. Una célula madre embrionaria de roedor aislada puede ser una célula madre embrionaria de ratón y puede utilizarse para producir un ratón que comprenda un gen *CD47* como se describe en el presente documento. Una célula madre embrionaria de roedor puede ser una célula madre embrionaria de rata y puede utilizarse para producir una rata que comprenda un gen *CD47* como se describe en el presente documento.

La presente invención también proporciona un embrión de roedor que comprende la célula madre embrionaria de roedor de la presente invención. Un embrión de roedor puede ser un embrión de ratón. Un embrión de roedor puede ser un embrión de rata.

También se describe en el presente documento un método para fabricar un roedor que exprese un polipéptido *CD47* a partir de un gen *CD47* endógeno, en donde el polipéptido *CD47* comprende una secuencia humana, comprendiendo el método insertar un fragmento genómico en un gen *CD47* endógeno en una célula madre embrionaria de roedor, comprendiendo dicho fragmento genómico una secuencia de nucleótidos que codifica una parte del polipéptido *CD47* humano que comprende el dominio extracelular y los dominios transmembrana del polipéptido *CD47* humano, codificado por los exones 2 a 7 de un gen *CD47* humano; obtener una célula madre embrionaria de roedor que comprende un gen *CD47* endógeno que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica la parte del polipéptido *CD47* humano; y crear un roedor mediante la célula madre embrionaria de roedor que comprende dicha secuencia de nucleótidos que codifica la parte del polipéptido *CD47* humano.

La secuencia humana puede comprender aminoácidos correspondientes a los restos 19 a 141 (o 19 a 292) de un polipéptido *CD47* humano. La secuencia humana puede comprender aminoácidos correspondientes a los restos 19 a 127 de un polipéptido *CD47* humano.

La secuencia de nucleótidos comprende los exones 2 a 7 de un gen *CD47* humano. La secuencia de nucleótidos puede comprender uno o más marcadores de selección. La secuencia de nucleótidos puede comprender sitios de recombinación específicos de sitio.

El método puede comprender además una etapa de insertar un fragmento genómico en un gen *SIRPα* endógeno de una célula madre embrionaria de roedor, comprendiendo dicho fragmento genómico una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido *SIRPα* humano en su totalidad o en parte (por ejemplo, codifica una parte extracelular de un polipéptido *SIRPα* humano). Un fragmento genómico puede comprender una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido *SIRPα* humano en su totalidad o en parte (por ejemplo, codifica una parte extracelular de un polipéptido *SIRPα* humano) que se inserta en un gen *SIRPα* endógeno de la célula madre embrionaria de roedor antes de una inserción en un gen *CD47* endógeno.

También se describe en el presente documento la cría de un roedor que comprende un gen *CD47* endógeno que incluye una secuencia de nucleótidos que codifica una parte del polipéptido *CD47* humano que comprende al menos el dominio extracelular y los dominios transmembrana del polipéptido *CD47* humano, codificado por los exones 2 a 7 de un gen *CD47* humano, con un segundo roedor, teniendo dicho segundo roedor un genoma que comprende un gen *SIRPα* que codifica un polipéptido *SIRPα* que comprende una parte extracelular de un polipéptido *SIRPα* humano (por

ejemplo, aminoácidos correspondientes a los restos 28 a 362 de un polipéptido SIRPα humano) y una parte intracelular de un polipéptido SIRPα endógeno.

También se describe en el presente documento un método para proporcionar un roedor cuyo genoma comprende un gen *CD47* humanizado que codifica el dominio extracelular y los dominios transmembrana de un polipéptido *CD47* humano, codificado por los exones 2 a 7 de un gen *CD47* humano, unido a una parte intracelular de un polipéptido *CD47* endógeno, comprendiendo el método modificar el genoma de un roedor para que comprenda un gen *CD47* humanizado que codifica el dominio extracelular y los dominios transmembrana de un polipéptido *CD47* humano unido a la parte intracelular de un polipéptido *CD47* endógeno proporcionando así dicho roedor.

La modificación del genoma de un roedor puede realizarse en una célula madre embrionaria de roedor. La célula madre embrionaria de roedor puede ser una célula madre embrionaria de ratón o una célula madre embrionaria de rata.

El método puede comprender además modificar el genoma del roedor para que comprenda un gen *SIRPα* que codifica la parte extracelular de un polipéptido SIRPα humano (por ejemplo, aminoácidos correspondientes a los restos 28 a 362 de un polipéptido SIRPα humano) unido a la parte intracelular de un polipéptido SIRPα endógeno. La modificación del genoma del roedor para que comprenda un gen *SIRPα* que codifica la parte extracelular de un polipéptido SIRPα humano (por ejemplo, aminoácidos correspondientes a los restos 28 a 362 de un polipéptido SIRPα humano) unido a la parte intracelular de un polipéptido SIRPα endógeno puede realizarse antes de modificar el genoma del roedor de modo que comprenda un gen *CD47* que codifica el dominio extracelular y los dominios transmembrana de un polipéptido *CD47* humano unido a la parte intracelular de un polipéptido *CD47* endógeno.

También se describe en el presente documento la cría de un roedor cuyo genoma comprende un gen *CD47* humanizado que codifica el dominio extracelular y los dominios transmembrana de un polipéptido *CD47* humano, codificado por los exones 2 a 7 de un gen *CD47* humano, unido a una parte intracelular de un polipéptido *CD47* endógeno, con un segundo roedor, teniendo dicho segundo roedor un genoma que comprende un gen *SIRPα* que codifica un polipéptido SIRPα que comprende una parte extracelular de un polipéptido SIRPα humano (por ejemplo, aminoácidos correspondientes a los restos 28 a 362 de un polipéptido SIRPα humano) y una parte intracelular de un polipéptido SIRPα endógeno.

También se describe en el presente documento un roedor que se puede obtener mediante métodos como los descritos en el presente documento.

En el presente documento también se describe un método para injertar células humanas en un roedor, comprendiendo el método las etapas de proporcionar un roedor cuyo genoma comprende un gen *CD47* humanizado que codifica el dominio extracelular y los dominios transmembrana de un polipéptido *CD47* humano, codificado por los exones 2 a 7 de un gen *CD47* humano, unido a la parte intracelular de un polipéptido *CD47* endógeno; y trasplantar una o más células humanas a dicho roedor. El método puede comprender además una etapa de ensayo del injerto de una o más células humanas en dicho roedor. Una etapa de ensayo puede comprender comparar el injerto de una o más células humanas con el injerto en uno o más roedores de tipo silvestre o en uno o más roedores cuyo genoma no comprende un gen *CD47* que codifica el dominio extracelular y los dominios transmembrana de un polipéptido *CD47* humano unido a la parte intracelular de un polipéptido *CD47* endógeno.

Las células humanas pueden ser células madre hematopoyéticas. Las células humanas pueden trasplantarse por vía intravenosa. Las células humanas pueden trasplantarse por vía intraperitoneal. Las células humanas pueden trasplantarse por vía subcutánea. También se describe en el presente documento un método para evaluar la eficacia terapéutica de un fármaco dirigido a células humanas, comprendiendo el método proporcionar un roedor cuyo genoma comprende un gen *CD47* humanizado que codifica el dominio extracelular y los dominios transmembrana de un polipéptido *CD47* humano, codificado por los exones 2 a 7 de un gen *CD47* humano, unido a una parte intracelular de un polipéptido *CD47* endógeno; trasplantar una o más células humanas a dicho roedor; administrar un fármaco candidato a dicho roedor; y controlar las células humanas en el roedor para determinar la eficacia terapéutica del fármaco candidato.

Las células humanas pueden ser células cancerosas y el fármaco candidato puede ser un fármaco candidato contra el cáncer. Un fármaco candidato puede ser un anticuerpo.

Un roedor puede comprender además células inmunitarias humanas. Un fármaco candidato puede ser un anticuerpo biespecífico que se une al *CD47* humano y a un antígeno en células cancerosas humanas trasplantadas.

También se describe en el presente documento un método que comprende proporcionar una o más células cuyo genoma incluye un gen *CD47* humanizado que codifica el dominio extracelular y los dominios transmembrana de un polipéptido *CD47* humano, codificado por los exones 2 a 7 de un gen *CD47* humano, unido a una parte intracelular de un polipéptido *CD47* endógeno; incubar una o más células con un sustrato marcado; y medir la fagocitosis del sustrato marcado por una o más células. El sustrato puede estar marcado con fluorescencia. El sustrato puede estar marcado con un anticuerpo. El sustrato puede ser uno o más glóbulos rojos. El sustrato puede ser una o más células

bacterianas. El sustrato puede ser una o más células tumorales.

También se describe en el presente documento un método que comprende proporcionar un roedor cuyo genoma incluye un gen *CD47* humanizado que codifica el dominio extracelular y los dominios transmembrana de un polipéptido *CD47* humano, codificado por los exones 2 a 7 de un gen *CD47* humano, unido a una parte intracelular de un polipéptido *CD47* endógeno; exponer al roedor a un antígeno; y medir la fagocitosis del antígeno por una o más células del roedor. La etapa de exposición puede comprender exponer el roedor a un antígeno que esté marcado con fluorescencia. La etapa de exposición puede comprender exponer el roedor a una o más células que comprenden el antígeno. La etapa de exposición puede comprender exponer el roedor a una o más células humanas que comprenden el antígeno o a una o más células bacterianas que comprenden el antígeno. La etapa de exposición puede comprender exponer el roedor a una o más células que se han transformado con el antígeno de modo que el antígeno se exprese en la superficie de una o más células transformadas. La etapa de exposición puede comprender exponer el roedor a una o más células tumorales que comprenden el antígeno.

En el presente documento también se describen métodos para la identificación o validación de un fármaco o vacuna, comprendiendo el método las etapas de administrar un fármaco o vacuna a un roedor cuyo genoma incluye un gen *CD47* humanizado que codifica el dominio extracelular y los dominios transmembrana de un polipéptido *CD47* humano, codificado por los exones 2 a 7 de un gen *CD47* humano, unido a una parte intracelular de un polipéptido *CD47* endógeno, y controlar una o más de las respuestas inmunitarias al fármaco o vacuna, el perfil de seguridad del fármaco o vacuna, o el efecto en una enfermedad o afección. El control del perfil de seguridad puede incluir determinar si el roedor presenta un efecto secundario o una reacción adversa como resultado de la administración del fármaco o de la vacuna. Un efecto secundario o reacción adversa puede seleccionarse de morbilidad, mortalidad, alteración en el peso corporal, alteración del nivel de una o más enzimas (por ejemplo, hepáticas), alteración en el peso de uno o más órganos, pérdida de función (por ejemplo, sensorial, motora, orgánica, etc.), mayor susceptibilidad a una o más enfermedades, alteraciones en el genoma del roedor, aumento o disminución del consumo de alimentos y complicaciones de una o más enfermedades.

También se describe en el presente documento el uso de un roedor como se describe en el presente documento en el desarrollo de un fármaco o vacuna para su uso en medicina, tal como su uso como medicamento.

También se describe en el presente documento el uso de un roedor como se describe en el presente documento en la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer o una neoplasia.

En el presente documento también se describe el uso de un roedor como se describe en el presente documento para evaluar la eficacia de un fármaco terapéutico dirigido a células humanas. A un roedor descrito en el presente documento se le pueden trasplantar células humanas y se le puede administrar al roedor un candidato a fármaco dirigido a dichas células humanas. La eficacia del fármaco se puede determinar mediante el seguimiento de las células humanas en el roedor después de la administración del fármaco.

También se describe en el presente documento un roedor o una célula como se describe en el presente documento para su uso en el desarrollo y/o identificación de un fármaco (por ejemplo, un anticuerpo) para terapia o diagnóstico.

También se describe en el presente documento un roedor o una célula como se describe en el presente documento para su uso en el desarrollo y/o identificación de un fármaco (por ejemplo, un anticuerpo) para el tratamiento, prevención o mejora del cáncer o una neoplasia.

La invención también proporciona un método para evaluar las propiedades farmacocinéticas de un fármaco dirigido a *CD47* humano, comprendiendo el método:

(i) administrar un fármaco candidato dirigido al *CD47* humano a un roedor cuyo genoma comprende un gen *CD47* humanizado,

en donde el gen *CD47* humanizado codifica un polipéptido *CD47* humanizado que comprende una parte de un polipéptido *CD47* humano y una parte intracelular de un polipéptido *CD47* de roedor;

en donde la parte del polipéptido *CD47* humano comprende el dominio extracelular y los dominios transmembrana del polipéptido *CD47* humano, y está codificada por los exones 2 a 7 de un gen *CD47* humano; en donde la parte intracelular del polipéptido *CD47* de roedor está codificada por los exones cadena abajo del exón 7 de un gen *CD47* de roedor; y

en donde el gen *CD47* humanizado está operativamente unido a un promotor *CD47* de roedor; y

(ii) realizar uno o más ensayos para evaluar las propiedades farmacocinéticas del fármaco candidato.

También se describe en el presente documento un método para evaluar la toxicidad específica de un fármaco dirigido al *CD47* humano, comprendiendo el método las etapas de administrar el fármaco a un roedor como se describe en el presente documento y realizar un ensayo para uno o más parámetros asociados con la toxicidad específica de un fármaco.

También se describe en el presente documento un método para evaluar la toxicidad colateral de un fármaco dirigido al CD47 humano, comprendiendo el método las etapas de administrar el fármaco a un roedor como se describe en el presente documento y realizar un ensayo para uno o más parámetros asociados con la toxicidad colateral de un fármaco.

Un roedor como se describe en el presente documento es un roedor cuyo genoma incluye un gen *CD47* humanizado que codifica el dominio extracelular y los dominios transmembrana de un polipéptido CD47 humano unido a una parte intracelular de un polipéptido CD47 endógeno; un roedor puede ser un ratón; un roedor puede ser una rata.

Un fármaco dirigido al CD47 humano puede ser un antagonista de CD47. Un antagonista de CD47 puede ser un anticuerpo anti-CD47. Un fármaco dirigido al CD47 humano puede ser un agonista de CD47.

El gen *CD47* humanizado puede incluir cualquier gen *CD47* humanizado descrito en el presente documento. El polipéptido CD47 humano puede incluir cualquier polipéptido CD47 humano descrito en el presente documento.

Es posible que un roedor descrito en el presente documento no exprese de manera detectable un polipéptido CD47 endógeno de roedor de longitud completa. Es posible que un roedor descrito en el presente documento no exprese de manera detectable una parte extracelular de un polipéptido CD47 endógeno. Es posible que un roedor descrito en el presente documento no exprese de manera detectable una parte extracelular tanto de un polipéptido CD47 endógeno como de un polipéptido SIRPα endógeno.

Un dominio extracelular de un polipéptido CD47 humano puede comprender aminoácidos correspondientes a los restos 19 a 141 de un polipéptido CD47 humano como se describe en el presente documento.

Un dominio de inmunoglobulina V aminoterminal de un polipéptido CD47 humano puede comprender aminoácidos correspondientes a los restos 19 a 127 de un polipéptido CD47 humano como se describe en el presente documento.

Los roedores, células, tejidos, células madre embrionarias y/o embriones de la presente invención pueden tener un genoma que comprende además un gen *SIRPα* que codifica un polipéptido SIRPα que comprende una parte extracelular de un polipéptido SIRPα humano (p. ej., aminoácidos correspondientes a los restos 28 a 362 de un polipéptido SIRPα humano polipéptido) y una parte intracelular de un polipéptido SIRPα endógeno.

Un roedor descrito en el presente documento puede ser un ratón; o una rata.

Como se utiliza en la presente solicitud, los términos "alrededor de" y "aproximadamente" se utilizan como equivalentes. Cualquier numeral usado en la presente solicitud usado con o sin alrededor de/aproximadamente pretende abarcar cualquier fluctuación normal apreciada por un experto habitual en la materia relevante.

Otras características, objetos y ventajas descritas en el presente documento son evidentes en la descripción detallada que sigue. Se debe entender, sin embargo, que la descripción detallada se proporciona únicamente a modo de ilustración, no de limitación. Diversos cambios y modificaciones resultarán evidentes para los expertos en la materia a partir de la descripción detallada.

Breve descripción de los dibujos

El archivo de patente o solicitud contiene al menos un dibujo realizado a color. La oficina proporcionará copias de esta patente o publicación de solicitud de patente con dibujos a color previa solicitud y pago de la tarifa necesaria.

Los dibujos incluidos en el presente documento, que están compuestos por las siguientes figuras, son solo a fines ilustrativos.

En la **figura 1** se muestra un diagrama, no a escala, de la organización genómica de genes del grupo de diferenciación 47 (CD47, del inglés *Cluster of Differentiation 47*) no humanos (por ejemplo, de ratón) y humanos. Los exones están numerados debajo de cada exón.

En la **figura 2** se muestra un diagrama, no a escala, de un método ilustrativo para la humanización de un gen del grupo de diferenciación 47 (CD47) no humano.

En la **figura 3** se muestra un diagrama, no a escala, de la organización genómica de los genes del grupo de diferenciación 47 (CD47) de ratón y humano. Se indican las ubicaciones de las sondas utilizadas en un ensayo descrito en el ejemplo 1.

En la **figura 4** se muestra un histograma ilustrativo de la expresión de CD47 en glóbulos rojos de ratones CD47 humanizados detectados mediante anticuerpos anti-CD47. Ac A, Ac B, Ac C, Ac D y Ac E: anticuerpos anti-CD47; hlgG4s: IgG4 humana de especificidad irrelevante con región Fc modificada que tiene función efectora reducida; hlgG4: anticuerpo IgG4 humano de especificidad irrelevante.

En la **figura 5** se muestra un ejemplo de hemaglutinación de glóbulos rojos de ratón procedentes de ratones CD47 de tipo silvestre (n=2) y humanizados (n=2) mediante anticuerpos anti-CD47. TS: tipo silvestre; HuCD47: CD47

humanizado; Ac A, Ac B, Ac C, Ac D y Ac E: anticuerpos anti-CD47; hlgG4s: IgG4 humana de especificidad irrelevante con región Fc modificada que tiene función efectora reducida; hlgG4: anticuerpo IgG4 humano de especificidad irrelevante.

En la **figura 6** se muestran perfiles farmacocinéticos ilustrativos de anticuerpos anti-CD47 en ratones CD47 humanizados representados como concentración de anticuerpos (en µg/ml, eje de ordenadas) a lo largo del tiempo (en días, eje de abscisas); Ac F, Ac G, Ac H y Ac I: anticuerpos anti-CD47; hlgG4s: anticuerpo IgG4 humano de especificidad irrelevante con región Fc modificada que tiene función efectora reducida.

En la **figura 7** se muestran perfiles farmacocinéticos ilustrativos de anticuerpos anti-CD47 en ratones CD47/SIRPα humanizados (CD47^{hu/hu}SIRPα^{hu/hu}) representado como concentración de anticuerpos (en µg/ml, eje de ordenadas) a lo largo del tiempo (en días, eje de abscisas). Ac J, Ac F, Ac G y Ac I: anticuerpos anti-CD47; hlgG4s: anticuerpo IgG4 humano de especificidad irrelevante con región Fc modificada que tiene función efectora reducida.

En la **figura 8** se muestran perfiles farmacocinéticos ilustrativos de anticuerpos anti-CD47 en ratones CD47/SIRPα humanizados (CD47^{hu/hu}SIRPα^{hu/hu}) representado como concentración de anticuerpos (en µg/ml, eje de ordenadas) a lo largo del tiempo (en días, eje de abscisas). Ac J, Ac F: anticuerpos anti-CD47; Ac Fs: Ac F con región Fc modificada que tiene función efectora reducida; Ac Fmono: versión monovalente del Ac F; hlgG4s: anticuerpo IgG4 humano de especificidad irrelevante con región Fc modificada que tiene función efectora reducida.

En la **figura 9** se muestran perfiles farmacocinéticos ilustrativos de anticuerpos anti-CD47 en ratones de tipo silvestre representados como concentración de anticuerpos (en µg/ml, eje de ordenadas) a lo largo del tiempo (en días, eje de abscisas). Se excluyeron los ratones que demostraron una respuesta de anticuerpos antihumanos de ratón (MAHA). Ac J, Ac F, Ac I y Ac G: anticuerpos anti-CD47; hlgG4s: anticuerpo IgG4 humano de especificidad irrelevante con región Fc modificada que tiene función efectora reducida (estrella: todos los puntos después de 15 días fueron excluidos del grupo de tratamiento con hlgG4s debido a MAHA); Ac J F(ab')₂: Fragmento F(ab')₂ del Ac J.

Definiciones

Los métodos particulares y las condiciones experimentales descritas en el presente documento pueden variarse. También debe entenderse que la terminología utilizada en el presente documento tiene el propósito de describir realizaciones particulares únicamente y no pretende ser limitante, ya que alcance de la presente invención viene definido por las reivindicaciones.

A menos que se defina de otra manera, todos los términos y expresiones utilizados en el presente documento incluyen los significados que los términos y las expresiones tienen en la materia, a menos que se indique claramente lo contrario o sea claramente evidente a partir del contexto en el que se utiliza un término o expresión. Aunque pueden utilizarse en la práctica o el ensayo de la presente invención cualesquiera métodos y materiales similares o equivalentes a los que se describen en el presente documento, a continuación, se describen métodos y materiales particulares.

El término "*aproximadamente*", tal como se aplica en el presente documento a uno o más valores de interés, se refiere a un valor que es similar a un valor de referencia indicado. El término "*aproximadamente*" o "*alrededor de*" puede referirse a un intervalo de valores que pertenecen al 25 %, 20 %, 19 %, 18 %, 17 %, 16 %, 15 %, 14 %, 13 %, 12 %, 11 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 % o menos en cualquier dirección (mayor o menor que) del valor de referencia indicado, a menos que se indique de otro modo o resulte evidente de otro modo a partir del contexto (excepto cuando tal número exceda el 100 % de un posible valor).

La expresión "*biológicamente activo*", como se utiliza en el presente documento, se refiere a una característica de cualquier agente que tiene actividad en un sistema biológico, *in vitro* o *in vivo* (p. ej., en un organismo). Por ejemplo, un agente que, cuando está presente en un organismo, tiene un efecto biológico en ese organismo, se considera que es biológicamente activo. Cuando una proteína o polipéptido es biológicamente activo, una parte de esa proteína o polipéptido que comparte al menos una actividad biológica de la proteína o polipéptido se denomina normalmente parte "*biológicamente activa*".

El término "*comparable*", como se utiliza en el presente documento, se refiere a dos o más agentes, entidades, situaciones, conjuntos de condiciones, etc., que pueden no ser idénticos entre sí, pero que son lo suficientemente similares para permitir la comparación entre ellos, de modo que se puedan extraer conclusiones razonablemente basándose en las diferencias o similitudes observadas. Los expertos en la materia entenderán, en el contexto, qué grado de identidad se requiere en cualquier circunstancia dada para dos o más de estos agentes, entidades, situaciones, conjuntos de condiciones, etc. para considerarlos comparables.

El término "*conservadora*", cuando se utiliza para describir una sustitución conservadora de aminoácidos, se refiere a una sustitución de un resto de aminoácido por otro resto de aminoácido que tiene un grupo R de la cadena lateral con propiedades químicas similares (por ejemplo, carga o hidrofobicidad). En general, una sustitución de aminoácidos conservadora no cambiará sustancialmente las propiedades funcionales de interés de una proteína, por ejemplo, la capacidad de un receptor para unirse a un ligando. Los ejemplos de grupos de aminoácidos que tienen cadenas laterales con propiedades químicas similares incluyen: cadenas laterales alifáticas, tales como glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina; cadenas laterales de hidroxilo alifáticas, tales como serina y treonina; cadenas laterales que contienen amida, tales como asparagina y glutamina; cadenas laterales aromáticas, tales como fenilalanina, tirosina y

triptófano; cadenas laterales básicas, tales como lisina, arginina e histidina; cadenas laterales ácidas, tales como ácido aspártico y ácido glutámico; y cadenas laterales que contienen azufre, tales como cisteína y metionina. Los grupos de sustituciones de aminoácidos conservadoras incluyen, por ejemplo, valina/leucina/iso-leucina, fenilalanina/arginina, lisina/arginina, alanina/valina, glutamato/aspartato y asparagina/glutamina. Una sustitución de aminoácidos conservadora puede ser una sustitución de cualquier resto natural en una proteína con alanina, tal como se utiliza, por ejemplo, en la mutagénesis por barrido de alanina. Se puede realizar una sustitución conservadora que tiene un valor positivo en la matriz de probabilidad logarítmica PAM250 divulgada en Gonnet *et al.* (1992), "Exhaustive Matching of the Entire Protein Sequence Database", Science 256:1443-45. Una sustitución puede ser una sustitución moderadamente conservadora en donde la sustitución tiene un valor no negativo en la matriz de probabilidad logarítmica PAM250.

El término "control", como se utiliza en el presente documento, se refiere al significado entendido en la materia de un "control" que es un patrón con el que se comparan los resultados. Normalmente, los controles se usan para aumentar la integridad en los experimentos mediante el aislamiento de variables con el fin de llegar a una conclusión sobre dichas variables. Un control puede ser una reacción o ensayo que se realiza simultáneamente con una reacción o ensayo de prueba para proporcionar un elemento de comparación. Como se utiliza en el presente documento, un "control" puede referirse a un "animal de control". Un "animal de control" puede tener una modificación como se describe en el presente documento, una modificación que es diferente a como se describe en el presente documento, o ninguna modificación (es decir, un animal de tipo silvestre). En un experimento, se aplica el "ensayo" (es decir, la variable que se ensaya). En el segundo experimento, el "control", la variable que se ensaya no se aplica. Un control puede ser un control histórico (es decir, de una prueba o ensayo realizado previamente, o una cantidad o resultado que se conoce previamente). Un control puede ser o comprender un registro impreso o salvado de otro modo. Un control puede ser un control positivo o un control negativo.

El término "interrupción", como se utiliza en el presente documento, puede referirse al resultado de un acontecimiento de recombinación homóloga con una molécula de ADN (por ejemplo, con una secuencia homóloga endógena tal como un gen o locus génico). Una interrupción puede lograr o representar una inserción, eliminación, sustitución, reemplazo, mutación de aminoácido, o un cambio de marco de una o más secuencias de ADN o cualquier combinación de los mismos. Las inserciones pueden incluir la inserción de genes completos o fragmentos de genes, por ejemplo, exones, que pueden ser de un origen distinto de la secuencia endógena (por ejemplo, una secuencia heteróloga). Una interrupción puede aumentar la expresión y/o la actividad de un gen o producto génico (por ejemplo, de una proteína codificada por un gen). Una interrupción puede disminuir la expresión y/o actividad de un gen o producto génico. Una interrupción puede alterar la secuencia de un gen o un producto génico codificado (por ejemplo, una proteína codificada). Una interrupción puede truncar o fragmentar un gen o un producto génico codificado (por ejemplo, una proteína codificada). Una interrupción puede extender un gen o un producto génico codificado; en algunos de dichos casos, una interrupción puede lograr el ensamblaje de una proteína de fusión. Una interrupción puede afectar el nivel, pero no la actividad, de un gen o producto génico. Una interrupción puede afectar la actividad, pero no el nivel, de un gen o producto génico. Una interrupción puede no tener un efecto significativo en el nivel de un gen o producto génico. Una interrupción puede no tener un efecto significativo en la actividad de un gen o producto génico. Una interrupción puede no tener un efecto significativo ni en el nivel o ni en la actividad de un gen o producto génico.

Los términos "determinar", "medir", "evaluar", "valorar", "ensayar" y "analizar" se utilizan indistintamente en el presente documento para referirse a cualquier forma de medición, e incluyen determinar si un elemento está presente o no. Estos términos incluyen determinaciones tanto cuantitativas como cualitativas. El ensayo puede ser relativo o absoluto. "Ensayar la presencia de" puede ser determinar la cantidad de algo presente y/o determinar si está o no presente o ausente.

La expresión "locus endógeno" o "gen endógeno", como se utiliza en el presente documento, se refiere a un locus genético encontrado en un organismo parental o de referencia antes de la introducción de una interrupción, eliminación, reemplazo, alteración o modificación como se describe en el presente documento. El locus endógeno puede tener una secuencia que se encuentra en la naturaleza. El locus endógeno puede ser un locus de tipo silvestre. El organismo de referencia puede ser un organismo de tipo silvestre. El organismo de referencia puede ser un organismo genomanipulado. El organismo de referencia puede ser un organismo criado en laboratorio (ya sea de tipo silvestre o genomanipulado).

La expresión "promotor endógeno" se refiere a un promotor que está asociado de manera natural, por ejemplo, en un organismo de tipo silvestre, con un gen endógeno.

El término "heterólogo", como se utiliza en el presente documento, se refiere a un agente o entidad de una fuente diferente. Por ejemplo, cuando se usa en referencia a un polipéptido, gen o producto génico presente en una célula u organismo en particular, el término aclara que el polipéptido, gen o producto genético en cuestión: 1) se genomanipuló por la mano del hombre; 2) se introdujo en la célula u organismo (o un precursor de los mismos) a través de la mano del hombre (por ejemplo, mediante genomanipulación); y/o 3) no se produjo de forma natural ni está presente en la célula u organismo en cuestión (por ejemplo, el tipo de célula u organismo en cuestión).

Las células de acuerdo con la invención son células de roedores. La expresión "célula hospedadora", como se utiliza

en el presente documento, se refiere a una célula en la que se ha introducido un ácido nucleico o proteína heterólogos (por ejemplo, exógenos). Los expertos tras la lectura de la presente divulgación comprenderán que dichos términos se refieren no solo a la célula en cuestión en particular, sino que también se utilizan para referirse a la descendencia de dicha célula. Debido a que determinadas modificaciones pueden producirse en generaciones sucesivas debido a mutaciones o influencias ambientales, dicha descendencia puede, de hecho, ser idéntica a la célula original, pero aun así se incluye en el alcance de la expresión "*célula hospedadora*", como se utiliza en el presente documento. Las células hospedadoras, como se describen generalmente en el presente documento, comprenden una célula procariota o eucariota. En general, una célula hospedadora es cualquier célula que sea adecuada para recibir y/o producir un ácido nucleico o proteína heterólogo, independientemente del Reino de vida al que esté designada la célula. Las células ilustrativas incluyen las de procariotas y eucariotas (unicelulares o pluricelulares), células bacterianas (por ejemplo, cepas de *E. coli*, *Bacillus* spp., *Streptomyces* spp., etc.), células micobacterianas, células fúngicas, células de levadura (por ejemplo, *S. cerevisiae*, *S. pombe*, *P. pastoris*, *P. methanolica*, etc.), células vegetales, células de insecto (por ejemplo, SF-9, SF-21, células de insecto infectadas por baculovirus, *Trichoplusia ni*, etc.), células animales no humanas, células humanas o fusiones de células, tales como, por ejemplo, híbridomas o cuadromas. La célula puede ser una célula humana, de mono, de simio, de hámster, de rata o de ratón. La célula puede ser eucariota y puede seleccionarse de las siguientes células: CHO (por ejemplo, CHO K1, DXB-11 CHO, Veggie-CHO), COS (por ejemplo, COS-7), célula de la retina, Vero, CV1, de riñón (por ejemplo, HEK293, 293 EBNA, MSR 293, MDCK, HaK, BHK), HeLa, HepG2, WI38, MRC 5, Colo205, HB 8065, HL-60, (por ejemplo, BHK21), Jurkat, Daudi, A431 (epidérmica), CV-1, U937, 3T3, célula L, célula C127, SP2/0, NS-0, MMT 060562, célula de Sertoli, célula BRL 3A, célula HT1080, célula de mieloma, célula tumoral y una estirpe celular procedente de una célula mencionada anteriormente. La célula puede comprender uno o más genes víricos, por ejemplo, una célula de la retina que expresa un gen vírico (por ejemplo, una célula PER.C6™). Una célula hospedadora puede ser o comprender una célula aislada. Una célula hospedadora puede ser parte de un tejido. Una célula hospedadora puede ser parte de un organismo.

El término "*humanizado/a*", se utiliza en el presente documento de acuerdo con su significado entendido en la materia para referirse a ácidos nucleicos o proteínas cuyas estructuras (es decir, secuencias de nucleótidos o aminoácidos) incluyen partes que corresponden sustancial o idénticamente con estructuras de un gen o proteína particular que se encuentra en la naturaleza en un animal no humano, y también incluyen partes que difieren de las encontradas en el gen o proteína no humano particular en cuestión y en cambio se corresponden más estrechamente con estructuras comparables encontradas en un gen o proteína humano correspondiente. Un gen "*humanizado*" descrito en el presente documento codifica un polipéptido que tiene sustancialmente la secuencia de aminoácidos como la de un polipéptido humano (por ejemplo, una proteína humana o una parte de la misma, por ejemplo, una parte característica de la misma). Por poner solo un ejemplo, en el caso de un receptor de membrana, un gen "*humanizado*" puede codificar un polipéptido que tiene una parte extracelular que tiene una secuencia de aminoácidos como la de una parte extracelular humana y la secuencia restante como la de un polipéptido no humano (por ejemplo, de ratón). Un gen humanizado puede comprender al menos una parte de una secuencia de ADN de un gen humano. Un gen humanizado puede comprender una secuencia de ADN completa de un gen humano. De acuerdo con la invención, un gen *CD47* humanizado codifica un polipéptido *CD47* humanizado que comprende una parte de un polipéptido *CD47* humano y una parte intracelular de un polipéptido *CD47* de roedor, en donde la parte del polipéptido *CD47* humano comprende el dominio extracelular y los dominios transmembrana del polipéptido *CD47* humano, y está codificado por los exones 2 a 7 de un gen *CD47* humano, en donde la parte intracelular del polipéptido *CD47* de roedor está codificada por los exones cadena abajo del exón 7 de un gen *CD47* de roedor. Una proteína humanizada descrita en el presente documento comprende una secuencia que tiene una parte que aparece en una proteína humana. De acuerdo con la invención, un polipéptido *CD47* humanizado comprende el dominio extracelular y los dominios transmembrana del polipéptido *CD47* humano, codificado por los exones 2 a 7 de un gen *CD47* humano, y la parte intracelular del polipéptido *CD47* de roedor, codificada por los exones cadena abajo del exón 7 de un gen *CD47* de roedor.

El término "*identidad*", como se usa en el presente documento en relación con una comparación de secuencias, se refiere a la identidad como se determina por una serie de algoritmos diferentes conocidos en la materia que se pueden utilizar para medir la identidad de secuencia de nucleótidos y/o aminoácidos. Las identidades como se describen en el presente documento pueden determinarse con una alineación ClustalW v. 1.83 (lenta) empleando una penalización por hueco abierto de 10,0, una penalización por extensión de hueco de 0,1, y con una matriz de similitud de Gonnet (MACVECTOR™ 10.0.2, MacVector Inc., 2008).

El término "*aislado*", como se utiliza en el presente documento, se refiere a una sustancia y/o entidad (1) que se ha separado de al menos algunos de los componentes a los que estaba asociada cuando se produjo inicialmente (ya sea en la naturaleza y/o en un entorno experimental), y/o (2) que se ha diseñado, producido, preparado y/o fabricado por la mano del hombre. Las sustancias y/o entidades aisladas pueden separarse de aproximadamente un 10 %, aproximadamente un 20 %, aproximadamente un 30 %, aproximadamente un 40 %, aproximadamente un 50 %, aproximadamente un 60 %, aproximadamente un 70 %, aproximadamente un 80 %, aproximadamente un 90 %, aproximadamente un 91 %, aproximadamente un 92 %, aproximadamente un 93 %, aproximadamente un 94 %, aproximadamente un 95 %, aproximadamente un 96 %, aproximadamente un 97 %, aproximadamente un 98 %, aproximadamente un 99 % o más de aproximadamente un 99 % de los demás componentes con los que estaban asociadas inicialmente. Los agentes aislados pueden tener aproximadamente un 80 %, aproximadamente un 85 %, aproximadamente un 90 %, aproximadamente un 91 %, aproximadamente un 92 %, aproximadamente un 93 %, aproximadamente un 94 %, aproximadamente un 95 %, aproximadamente un 96 %, aproximadamente un 97 %, aproximadamente un 98 %, aproximadamente un 99 % o más de aproximadamente un 99 % de los demás componentes con los que estaban asociadas inicialmente.

aproximadamente un 98 %, aproximadamente un 99 % o más de aproximadamente un 99 % de pureza. Como se utiliza en el presente documento, una sustancia es "*pura*" si está sustancialmente libre de otros componentes. Tal como entenderán los expertos en la materia, una sustancia puede seguir considerándose "*aislada*" o incluso "*pura*", después de haberse combinado con otros componentes determinados tales como, por ejemplo, uno o más portadores o excipientes (por ejemplo, tampón, disolvente, agua, etc.); en dichos casos, el porcentaje de aislamiento o pureza de la sustancia se calcula sin incluir dichos portadores o excipientes. Por poner solo un ejemplo, un polímero biológico, tal como un polipéptido o polinucleótido, que se produce en la naturaleza se puede considerar "*aislado*" cuando: a) en virtud de su origen o fuente de derivación no está asociado con alguno o con todos los componentes que lo acompañan en su estado natural en la naturaleza; b) está sustancialmente libre de otros polipéptidos o ácidos nucleicos de la misma especie de la especie que lo produce en la naturaleza; o c) se expresa o está asociado de otro modo con componentes de una célula u otro sistema de expresión que no es de la especie que lo produce en la naturaleza. Por tanto, por ejemplo, un polipéptido que se sintetiza químicamente o se sintetiza en un sistema celular diferente del que lo produce en la naturaleza puede considerarse que es un polipéptido "*aislado*". Como alternativa o adicionalmente, un polipéptido que se ha sometido a una o más técnicas de purificación puede considerarse un polipéptido "*aislado*" en la medida en que se haya separado de otros componentes: a) con los que está asociado en la naturaleza; y/o b) con los que estaba asociado cuando se produjo inicialmente.

La expresión "*animal no humano*", como se utiliza en el presente documento, se refiere a cualquier organismo vertebrado que no es un ser humano. Un animal no humano puede ser aciclostoma, un pez óseo, un pez cartilaginoso (por ejemplo, un tiburón o una raya), un anfibio, un reptil, un mamífero o un ave. Un mamífero no humano puede ser un primate, una cabra, una oveja, un cerdo, un perro, una vaca o un roedor. Un animal no humano de la presente invención es un roedor, tal como una rata o un ratón.

La expresión "*ácido nucleico*", como se utiliza en el presente documento, en su sentido más amplio, se refiere a cualquier compuesto y/o sustancia que se incorpora o puede incorporarse en una cadena oligonucleotídica. Un "*ácido nucleico*" puede ser un compuesto y/o sustancia que se incorpora o puede incorporarse en una cadena oligonucleotídica a través de un enlace fosfodiéster. Como quedará claro por el contexto, "*ácido nucleico*" puede referirse a restos de ácido nucleico individuales (por ejemplo, nucleótidos y/o nucleósidos); "*ácido nucleico*" puede referirse a una cadena oligonucleotídica que comprende restos de ácido nucleico individuales. Un "*ácido nucleico*" puede ser o comprender ARN; un "*ácido nucleico*" puede ser o comprender ADN. Un "*ácido nucleico*" puede ser, comprender o consistir en uno o más restos de ácido nucleico naturales. Un "*ácido nucleico*" puede ser, comprender o consistir en uno o más análogos de ácido nucleico. Un análogo de ácido nucleico puede diferir de un "*ácido nucleico*" en el sentido de que no utiliza una cadena principal fosfodiéster. Por ejemplo, un "*ácido nucleico*" puede ser, comprender o consistir en uno o más "*ácidos nucleicos peptídicos*", que son conocidos en la materia y tienen enlaces peptídicos en lugar de enlaces fosfodiéster en la cadena principal. Como alternativa o adicionalmente, un "*ácido nucleico*" tiene uno o más enlaces fosforotioato y/o 5'-N-fosforamídita en lugar de enlaces fosfodiéster. Un "*ácido nucleico*" puede ser, comprender o consistir en uno o más nucleósidos naturales (por ejemplo, adenosina, timidina, guanosina, citidina, uridina, desoxiadenosina, desoxitimidina, desoxiguanosina y desoxicitidina). Un "*ácido nucleico*" puede ser, comprender o consistir en uno o más análogos de nucleósidos (por ejemplo, 2-aminoadenosina, 2-tiotimidina, inosina, pirrolopirimidina, 3-metil adenosina, 5-metilcitidina, C-5 propinilcitidina, C-5 propiniluridina, 2-aminoadenosina, C5-bromouridina, C5-fluorouridina, C5-yodouridina, C5-propiniluridina, C5-propinilcitidina, C5-metilcitidina, 2-aminoadenosina, 7-desazaadenosina, 7-deazaguanosina, 8-oxoadenosina, 8-oxoguanosina, O(6)-metilguanina, 2-tiocitidina, bases metiladas, bases intercaladas y combinaciones de las mismas). Un "*ácido nucleico*" puede comprender uno o más azúcares modificados (por ejemplo, 2'-fluororribosa, ribosa, 2'-desoxirribosa, arabinosa y hexosa) en comparación con los de los ácidos nucleicos naturales. Un "*ácido nucleico*" puede tener una secuencia de nucleótidos que codifica un producto génico funcional, tal como un ARN o una proteína. Un "*ácido nucleico*" puede incluir uno o más intrones. Un "*ácido nucleico*" puede prepararse mediante uno o más de aislamiento de una fuente natural, síntesis enzimática por polimerización basada en una plantilla complementaria (*in vivo* o *in vitro*), reproducción en una célula o sistema recombinante y síntesis química. Un "*ácido nucleico*" puede tener al menos 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, 5000 o más restos de longitud. Un "*ácido nucleico*" puede ser monocatenario; o un "*ácido nucleico*" puede ser bicatenario. Un "*ácido nucleico*" puede tener una secuencia de nucleótidos que comprende al menos un elemento que codifica, o es el complemento de una secuencia que codifica, un polipéptido. Un "*ácido nucleico*" puede tener actividad enzimática.

La expresión "*unido/a operativamente*", como se utiliza en el presente documento, se refiere a una yuxtaposición en donde los componentes descritos están en una relación que les permite funcionar de la manera prevista. Una secuencia de control "*unida operativamente*" a una secuencia codificante se une de tal manera que la expresión de la secuencia codificante se consigue en condiciones compatibles con las secuencias de control. Las secuencias "*unidas operativamente*" incluyen tanto las secuencias de control de la expresión que son contiguas con el gen de interés como las secuencias de control de la expresión que actúan en *trans* o a una distancia para controlar el gen de interés. La expresión "*secuencia de control de la expresión*", como se utiliza en el presente documento, se refiere a secuencias polinucleotídicas, que son necesarias para afectar a la expresión y el procesamiento de secuencias codificantes a las que están unidas. Las "*secuencias de control de expresión*" incluyen: secuencias de iniciación de transcripción adecuada, de terminación, del promotor y del potenciador; señales de procesamiento del ARN eficaces, tales como

las señales de corte y empalme y de poliadenilación; secuencias que estabilizan el ARNm citoplásmico; secuencias que potencian la eficacia de la traducción (es decir, secuencia de consenso Kozak); secuencias que potencian la estabilidad de las proteínas; y cuando se desee, secuencias que potencian la secreción de proteínas. La naturaleza de dichas secuencias de control difiere dependiendo del organismo hospedador. Por ejemplo, en procariotas, dichas

5 secuencias de control incluyen generalmente un promotor, un sitio de unión ribosomal y una secuencia de terminación de la transcripción, mientras que en eucariotas, normalmente, dichas secuencias de control incluyen promotores y secuencia de terminación de la transcripción. La expresión "*secuencias de control*" se pretende que incluya componentes cuya presencia es esencial para la expresión y el procesamiento, y también puede incluir componentes adicionales cuya presencia es ventajosa, por ejemplo, secuencias líder y secuencias de compañero de fusión.

10 El término "*polipéptido*", como se utiliza en el presente documento, se refiere a cualquier cadena polimérica de aminoácidos. Un polipéptido puede tener una secuencia de aminoácidos que se produce en la naturaleza. Un polipéptido puede tener una secuencia de aminoácidos que no se produce en la naturaleza. Un polipéptido puede tener una secuencia de aminoácidos que contiene partes que se producen en la naturaleza por separado unas de

15 otras (es decir, de dos o más organismos diferentes, en particular, partes humanas y de roedores). Un polipéptido puede tener una secuencia de aminoácidos que está genomanipulada en el sentido de diseñada y/o producida mediante la acción de la mano del hombre.

20 El término "*recombinante*", como se utiliza en el presente documento, pretende referirse a polipéptidos (por ejemplo, polipéptidos CD47 como se describe en el presente documento) que están diseñados, genomanipulados, preparados, expresados, creados o aislados por medios recombinantes, tales como polipéptidos expresados mediante un vector de expresión recombinante transfectado en una célula hospedadora, polipéptidos aislados de una biblioteca combinatoria de polipéptidos humanos recombinantes (Hoogenboom H. R., (1997) TIB Tech. 15:62-70; Azzazy H. y Highsmith W. E., (2002) Clin. Biochem. 35:425-445; Gavilondo J. V. y Larrick J. W. (2002) BioTechniques 29:128-145;

25 Hoogenboom H. y Chames P. (2000) Immunology Today 21:371-378), anticuerpos aislados de un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico para genes de inmunoglobulina humana (véase, por ejemplo, Taylor, L. D., *et al.* (1992) Nucl. Acids Res. 20:6287-6295; Kellermann S. A. y 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) o polipéptidos preparados, expresados, creados o aislados por cualquier otro medio que implique cortar y empalmar elementos de secuencia seleccionados entre sí. Uno o más de dichos elementos de secuencia seleccionados pueden encontrarse en la naturaleza. Uno o más de dichos elementos de secuencia seleccionados pueden estar diseñados por ordenador. Uno o más de dichos elementos de secuencia seleccionados pueden ser el resultado de mutagénesis (por ejemplo, *in vivo* o *in vitro*) de un elemento de secuencia conocido, por ejemplo, de una fuente natural o sintética. Por ejemplo, un polipéptido recombinante comprende secuencias que se encuentran en el

30 genoma de un organismo fuente de interés (por ejemplo, ser humano, ratón, etc.). Un polipéptido recombinante puede tener una secuencia de aminoácidos que fue el resultado de mutagénesis (por ejemplo, *in vitro* o *in vivo*, por ejemplo, en un animal no humano), de modo que las secuencias de aminoácidos de los polipéptidos recombinantes son secuencias que, mientras se originan de y se relacionan con secuencias de polipéptidos, pueden no existir de forma natural en el genoma de un animal no humano *in vivo*.

40 El término "*reemplazo*" se utiliza en el presente documento para referirse a un proceso mediante el cual una secuencia de ácido nucleico "*reemplazada*" (por ejemplo, un gen) encontrada en un locus hospedador (por ejemplo, en un genoma) se elimina de ese locus y en su lugar se ubica un ácido nucleico diferente de "*reemplazo*". La secuencia del ácido nucleico reemplazada y las secuencias del ácido nucleico de reemplazo son comparables entre sí en que, por

45 ejemplo, son homólogas entre sí y/o contienen elementos correspondientes (p. ej., elementos que codifican proteínas, elementos reguladores, etc.). Una secuencia de ácido nucleico reemplazada puede incluir uno o más de un promotor, un potenciador, un sitio donante de corte y empalme, un sitio receptor de corte y empalme, un intrón, un exón, una región no traducida (UTR, del inglés *untranslated region*); una secuencia de ácido nucleico de reemplazo puede incluir una o más secuencias codificantes. Una secuencia de ácido nucleico de reemplazo puede ser un homólogo de la secuencia de ácido nucleico reemplazada. Una secuencia de ácido nucleico de reemplazo puede ser un ortólogo de la secuencia reemplazada. Una secuencia de ácido nucleico de reemplazo puede ser o comprender una secuencia de ácido nucleico humana. En algunos casos, incluyendo cuando la secuencia de ácido nucleico de reemplazo es o comprende una secuencia de ácido nucleico humana, la secuencia del ácido nucleico reemplazada puede ser o comprender una secuencia de roedor (p. ej., una secuencia de ratón o rata). La secuencia de ácido nucleico así

50 colocada puede incluir una o más secuencias reguladoras que forman parte de la secuencia de ácido nucleico fuente usada para obtener la secuencia así colocada (por ejemplo, promotores, potenciadores, regiones no traducidas en 5' o en 3', etc.). Por ejemplo, el reemplazo es una sustitución de una secuencia endógena por una secuencia heteróloga que da como resultado la producción de un producto génico a partir de la secuencia de ácido nucleico así colocada (que comprende la secuencia heteróloga), pero no la expresión de la secuencia endógena; el reemplazo es de una secuencia genómica endógena con una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína que tiene una función similar a la de una proteína codificada por la secuencia endógena. Un gen endógeno o fragmento del mismo puede reemplazarse con un gen humano correspondiente o fragmento del mismo. Un gen humano correspondiente o fragmento del mismo es un gen o fragmento humano que es un ortólogo de, o es sustancialmente similar o igual en estructura y/o función, que el gen endógeno o fragmento del mismo que se reemplaza. De acuerdo con la invención,

60 se puede formar un CD47 humanizado a partir de un reemplazo de un fragmento genómico que comprende los exones 2 a 7 de un gen *CD47* endógeno de roedor en un locus *CD47* endógeno de roedor, con un fragmento genómico que

65

comprende los exones 2 a 7 del gen *CD47* humano.

La expresión "*proteína grupo de diferenciación 47*" o "*proteína CD47*", como se utiliza en el presente documento, se refiere a una proteína transmembrana de múltiples pasos que pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas y tiene un dominio de inmunoglobulina V aminoterminal extracelular, cinco dominios transmembrana y una cola intracelular carboxiterminal corta. *CD47* se expresa en la superficie celular y participa en interacciones entre proteínas de la superficie de la membrana, tales como, por ejemplo, integrinas, SIRPα y trombospondina-1 (TSP-1). *CD47* se expresa en tejidos normales y está regulada positivamente en muchos cánceres humanos. Se ha demostrado que *CD47* está implicada en varios procesos celulares, tales como, por ejemplo, la apoptosis, la proliferación, la adhesión y la migración. Se han identificado varias isoformas de *CD47* empalmadas de manera alternativa entre el ratón y el hombre. A modo ilustrativo, en la tabla 3 se proporcionan secuencias de nucleótidos y aminoácidos de genes *CD47* de ratón y humanos. Las personas con experiencia al leer esta divulgación reconocerán que uno o más genes *CD47* endógenos en un genoma (o todos) se pueden reemplazar por uno o más genes *CD47* heterólogos (por ejemplo, variantes polimórficas, subtipos o mutantes, genes de otra especie, formas humanizadas, etc.).

Una "*célula que expresa CD47*", como se utiliza en el presente documento, se refiere a una célula que expresa una proteína transmembrana *CD47*. Una célula que expresa *CD47* puede expresar una proteína transmembrana *CD47* en su superficie. Una proteína *CD47* puede expresarse en la superficie de la célula en una cantidad suficiente para mediar las interacciones entre células a través de la proteína *CD47* expresada en la superficie de la célula. Las células que expresan *CD47* ilustrativas incluyen neuronas, células inmunitarias, queratinocitos y células circulantes. Las células que expresan *CD47* regulan la interacción de las células inmunitarias y las células circulantes para regular diversos procesos celulares, tales como la adhesión, la proliferación celular y/o la apoptosis, la angiogénesis y la inflamación. Los roedores de la presente invención pueden demostrar la regulación de diversos procesos celulares (como se describe en el presente documento) mediante proteínas *CD47* humanizadas expresadas en la superficie de una o más células del roedor.

El término "*referencia*" se utiliza en el presente documento para describir un agente, cohorte, individuo, población, muestra, secuencia o valor convencional o de control contra el cual un agente, animal, cohorte, individuo, población, muestra, secuencia o valor de interés se compara. Un agente, cohorte, individuo, población, muestra, secuencia o valor de referencia se ensaya y/o se determina de manera sustancialmente simultánea con la prueba o determinación de un agente, cohorte, individuo, población, muestra, secuencia o valor de interés. Un agente, cohorte, individuo, población, muestra, secuencia o valor de referencia puede ser una referencia histórica, opcionalmente incorporada en un medio tangible. Una referencia puede referirse a un control. Como se utiliza en el presente documento, una "*referencia*" puede referirse a un "*animal de referencia*". Un "*animal de referencia*" puede tener una modificación como se describe en el presente documento, una modificación que es diferente a la descrita en el presente documento o ninguna modificación (es decir, un animal de tipo silvestre). Normalmente, como comprenderían los expertos en la materia, un agente, animal, cohorte, individuo, población, muestra, secuencia o valor de referencia se determina o se caracteriza en condiciones comparables a las utilizadas para determinar o caracterizar el agente, animal (por ejemplo, un mamífero), cohorte, individuo, población, muestra, secuencia o valor de interés.

El término "*sustancialmente*", como se utiliza en el presente documento, se refiere a la condición cualitativa de mostrar la extensión o el grado total o casi total de una característica o propiedad de interés. Un experto en la materia biológica comprenderá que los fenómenos biológicos y químicos rara vez, o nunca, llegan a completarse y/o transcurrir hasta completarse o consiguen o impiden un resultado absoluto. Por lo tanto, el término "*sustancialmente*" se utiliza en el presente documento para capturar la posible falta de completitud inherente a muchos fenómenos biológicos y químicos.

La expresión "*homología sustancial*", como se utiliza en el presente documento, se refiere a una comparación entre secuencias de aminoácidos o de ácidos nucleicos. Como apreciarán los expertos en la materia, generalmente se considera que dos secuencias son "*sustancialmente homólogas*" si contienen restos homólogos en las posiciones correspondientes. Los restos homólogos pueden ser restos idénticos. De manera alternativa, los restos homólogos pueden ser restos no idénticos con características estructurales y/o funcionales apropiadamente similares. Por ejemplo, como es bien conocido por los expertos en la materia, determinados aminoácidos se clasifican normalmente como aminoácidos "*hidrófobos*" o "*hidrófilos*", y/o que tienen cadenas laterales "*polares*" o "*no polares*". La sustitución de un aminoácido por otro del mismo tipo con frecuencia puede considerarse una sustitución "*homóloga*". Las categorizaciones normales de aminoácidos se resumen en las tablas 1 y 2.

TABLA 1

Alanina	Ala	A	No polar	Neutro	1,8
Arginina	Arg	R	Polar	Positivo	-4,5
Asparagina	Asn	N	Polar	Neutro	-3,5
Ácido aspártico	Asp	D	Polar	Negativo	-3,5
Cisteína	Cys	C	No polar	Neutro	2,5
Ácido glutámico	Glu	E	Polar	Negativo	-3,5
Glutamina	Gln	Q	Polar	Neutro	-3,5
Glicina	Gly	G	No polar	Neutro	-0,4

(continuación)

Histidina	His	H	Polar	Positivo	-3,2
Isoleucina	Ile	I	No polar	Neutro	4,5
Leucina	Leu	L	No polar	Neutro	3,8
Lisina	Lys	K	Polar	Positivo	-3,9
Metionina	Met	M	No polar	Neutro	1,9
Fenilalanina	Phe	F	No polar	Neutro	2,8
Prolina	Pro	P	No polar	Neutro	-1,6
Serina	Ser	S	Polar	Neutro	-0,8
Treonina	Thr	T	Polar	Neutro	-0,7
Triptófano	Trp	W	No polar	Neutro	-0,9
Tirosina	Tyr	Y	Polar	Neutro	-1,3
Valina	Val	V	No polar	Neutro	4,2

TABLA 2

Aminoácidos ambiguos	3 letras	1 letra
Asparagina o ácido aspártico	Asx	B
Glutamina o ácido glutámico	Glx	Z
Leucina o isoleucina	Xle	J
Aminoácido no especificado o desconocido	Xaa	X

- 5 Como se conoce bien en la materia, las secuencias de aminoácidos o ácidos nucleicos pueden compararse usando cualquiera de una diversidad de algoritmos, incluidos los disponibles en programas informáticos comerciales, tales como BLASTN para secuencias nucleotídicas, y BLASTP, gapped BLAST y PSI-BLAST para secuencias de aminoácidos. Programas de este tipo se describen a modo de ejemplo en Altschul *et al.* (1990) Basic local alignment search tool, J. Mol. Biol., 215(3): 403-410; Altschul *et al.* (1997) Methods in Enzymology; Altschul *et al.*, "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402; Baxevanis *et al.* (1998) Bioinformatics: A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins, Wiley; y Misener *et al.* (eds.) (1999) Bioinformatics Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology, Vol. 132), Humana Press. Además de identificar secuencias homólogas, los programas mencionados anteriormente normalmente proporcionan una indicación del grado de homología. Se puede considerar que dos secuencias son sustancialmente homólogas si al menos un 50 %, un 55 %, un 60 %, un 65 %, un 70 %, un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o más de sus restos correspondientes son homólogos en un tramo de restos de interés. El tramo de interés puede ser una secuencia completa. El tramo de interés puede tener al menos 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 o más restos. El tramo de interés puede incluir restos contiguos a lo largo de una secuencia completa. El tramo de interés puede incluir restos discontinuos a lo largo de una secuencia completa. El tramo de interés puede tener al menos 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 o más restos.

- La expresión "*sustancialmente idéntico*", como se utiliza en el presente documento, se refiere a una comparación entre secuencias de aminoácidos o de ácidos nucleicos. Como apreciarán los expertos en la materia, generalmente se considera que dos secuencias son "*sustancialmente idénticas*" si contienen restos idénticos en posiciones correspondientes. Como se conoce bien en la materia, las secuencias de aminoácidos o ácidos nucleicos pueden compararse usando cualquiera de una diversidad de algoritmos, incluidos los disponibles en programas informáticos comerciales, tales como BLASTN para secuencias nucleotídicas, y BLASTP, gapped BLAST y PSI-BLAST para secuencias de aminoácidos. Programas de este tipo se describen a modo de ejemplo en Altschul *et 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; y Misener *et al.*, (eds.) (1999) Bioinformatics Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology, Vol. 132), Humana Press. Además de identificar secuencias idénticas, los programas mencionados anteriormente normalmente proporcionan una indicación del grado de identidad. Se puede considerar que dos secuencias son sustancialmente idénticas si al menos un 50 %, un 55 %, un 60 %, un 65 %, un 70 %, un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o más de sus restos correspondientes son idénticos en un tramo de restos de interés. El tramo de interés puede ser una secuencia completa. El tramo de interés puede tener al menos 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 o más restos.

- La expresión "*vector de orientación*" o "*construcción de direccionamiento*", como se utiliza en el presente documento, se refiere a una molécula polinucleotídica que comprende una región de direccionamiento. Una región de direccionamiento comprende una secuencia que es idéntica o sustancialmente idéntica a una secuencia en una célula, tejido o animal diana y proporciona la integración de la construcción de direccionamiento en una posición dentro del genoma de la célula, tejido o animal mediante recombinación homóloga. También se incluyen las regiones de direccionamiento que se dirigen utilizando sitios de reconocimiento de recombinasas específicas de sitio (por ejemplo, sitios *loxP* o *Frt*). Una construcción de direccionamiento de la presente invención comprende un brazo de homología

en 5' que comprende una secuencia genómica cadena arriba del exón 2 de un gen *CD47* de ratón, un brazo de homología en 3' que comprende una secuencia genómica cadena abajo del exón 7 de un gen *CD47* de ratón, un fragmento de ADN genómico que comprende los exones 2 a 7 de un gen *CD47* humano y un casete de selección de fármacos, opcionalmente comprende además secuencias de control y/o reguladoras, y otras secuencias de los ácido nucleico que permiten la recombinación mediada por la adición exógena de proteínas que ayudan o facilitan la recombinación que implica dichas secuencias. Otras construcciones de direccionamiento descritas en el presente documento comprenden un gen de interés en su totalidad o en parte, en donde el gen de interés es un gen heterólogo que codifica una proteína, en su totalidad o en parte, que tiene una función similar a la de una proteína codificada por una secuencia endógena. Otras construcciones de direccionamiento descritas en el presente documento comprenden un gen humanizado de interés, en su totalidad o en parte, en donde el gen humanizado de interés codifica una proteína, en su totalidad o en parte, que tiene una función similar a la de una proteína codificada por la secuencia endógena.

El término "*variante*", como se utiliza en el presente documento, se refiere a una entidad que muestra una identidad estructural significativa con una entidad de referencia, pero difiere estructuralmente de la entidad de referencia en la presencia o nivel de uno o más restos químicos en comparación con la entidad de referencia. Una "*variante*" también puede diferir funcionalmente de su entidad de referencia. En general, que una entidad en particular se considera adecuadamente como una "*variante*" de una entidad de referencia se basa en su grado de identidad estructural con la entidad de referencia. Como apreciarán los expertos en la materia, cualquier entidad de referencia biológica o química tiene determinados elementos estructurales característicos. Una "*variante*", por definición, es una entidad química distinta que comparte uno o más de estos elementos estructurales característicos. Por proporcionar unos pocos ejemplos, una molécula pequeña puede tener un elemento estructural central característico (por ejemplo, un núcleo de macrociclo) y/o una o más fracciones colgantes características de modo que una variante de la molécula pequeña es aquella que comparte el elemento estructural central y las fracciones colgantes características, pero difiere en otras fracciones colgantes y/o en tipos de enlaces presentes (simple frente a doble, E frente a Z, etc.) dentro del núcleo, un polipéptido puede tener un elemento de secuencia característico compuesto por una pluralidad de aminoácidos que tienen posiciones designadas entre sí en un espacio lineal o tridimensional y/o que contribuyen a una función biológica particular, un ácido nucleico puede tener un elemento de secuencia característico compuesto por una pluralidad de restos de nucleótido que tienen posiciones designadas con respecto a otro en un espacio lineal o tridimensional. Por ejemplo, un "*polipéptido variante*" puede diferir de un polipéptido de referencia como resultado de una o más diferencias en la secuencia de aminoácidos y/o una o más diferencias en los restos químicos (p. ej., hidratos de carbono, lípidos, etc.) unidos covalentemente a la cadena principal polipeptídica. Un "*polipéptido variante*" puede mostrar una identidad de secuencia general con un polipéptido de referencia que es al menos un 85 %, un 86 %, un 87 %, un 88 %, un 89 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 % o un 99 %. Como alternativa o adicionalmente, un "*polipéptido variante*" puede no compartir al menos un elemento de secuencia característico con un polipéptido de referencia. El polipéptido de referencia puede tener una o más actividades biológicas. Un "*polipéptido variante*" puede compartir una o más de las actividades biológicas del polipéptido de referencia. Un "*polipéptido variante*" puede carecer de una o más de las actividades biológicas del polipéptido de referencia. Un "*polipéptido variante*" puede mostrar un nivel reducido de una o más actividades biológicas en comparación con el polipéptido de referencia. Se considera que un polipéptido de interés es una "*variante*" de un polipéptido precursor o de referencia si el polipéptido de interés tiene una secuencia de aminoácidos que es idéntica a la del precursor a excepción de un pequeño número de modificaciones de la secuencia en posiciones particulares. Normalmente, menos de un 20 %, un 15 %, un 10 %, un 9 %, un 8 %, un 7 %, un 6 %, un 5 %, un 4 %, un 3 %, un 2 % de los restos de la variante están sustituidos en comparación con el precursor. Una "*variante*" puede tener 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 resto sustituido en comparación con un precursor. A menudo, una "*variante*" tiene un número muy pequeño (por ejemplo, menos de 5, 4, 3, 2 o 1) de restos funcionales sustituidos (es decir, restos que participan en una actividad biológica particular). Además, una "*variante*" normalmente no tiene más de 5, 4, 3, 2 o 1 adición o eliminación, y a menudo no tiene adiciones o eliminaciones, en comparación con el precursor. Por otra parte, cualquier adición o eliminación son normalmente inferiores a aproximadamente 25, aproximadamente 20, aproximadamente 19, aproximadamente 18, aproximadamente 17, aproximadamente 16, aproximadamente 15, aproximadamente 14, aproximadamente 13, aproximadamente 10, aproximadamente 9, aproximadamente 8, aproximadamente 7, aproximadamente 6 y comúnmente son menos de aproximadamente 5, aproximadamente 4, aproximadamente 3 o aproximadamente 2 restos. El polipéptido precursor o de referencia puede ser uno que se encuentra en la naturaleza. Como entenderán los expertos en la materia, una pluralidad de variantes de un polipéptido de interés particular pueden encontrarse comúnmente en la naturaleza, en particular cuando el polipéptido de interés es un polipéptido de agente infeccioso.

El término "*vector*", como se utiliza en el presente documento, se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que está unido. Los vectores pueden ser capaces de realizar la replicación y/o expresión extracromosómica de los ácidos nucleicos a los que están unidos en una célula hospedadora, tal como una célula eucariota y/o procariota. Los vectores que pueden dirigir la expresión de genes unidos operativamente se denominan en el presente documento "*vectores de expresión*".

El término "*tipo silvestre*", como se utiliza en el presente documento, tiene su significado entendido en la materia que se refiere a una entidad que tiene una estructura y/o actividad tal como se encuentra en la naturaleza en un estado o contexto "*normal*" (en contraste con mutante, enfermo, alterado, etc.). Los expertos en la materia apreciarán que los genes y polipéptidos de tipo silvestre con frecuencia existen en múltiples formas diferentes (por ejemplo, alelos).

Descripción detallada de determinadas realizaciones

La presente invención se refiere a, entre otras cosas, roedores mejorados y/o genomanipulados que tienen material genético humanizado que codifica un gen del grupo de diferenciación 47 (CD47) para determinar la eficacia terapéutica de antagonistas de CD47 (por ejemplo, un anticuerpo anti-CD47) para el tratamiento del cáncer, y a ensayos en injertos de trasplantes, activación de la fagocitosis y transducción de señales. Se contempla que dichos roedores proporcionan una mejora en la determinación de la eficacia terapéutica de los antagonistas de CD47 y su potencial para el bloqueo de CD47. También se contempla que dichos roedores proporcionan una mejora en el injerto de células humanas en trasplantes. Por lo tanto, la presente invención es particularmente útil para el desarrollo de terapias anti-CD47 para el tratamiento de diversos cánceres, así como para el mantenimiento de células hematopoyéticas humanas en roedores. En particular, la presente divulgación se refiere a la humanización de un gen *CD47* murino que da como resultado la expresión de una proteína CD47 humanizada en la superficie de células del roedor. Dichas proteínas CD47 humanizadas tienen la capacidad de proporcionar una fuente de células CD47⁺ humanas para determinar la eficacia de terapias anti-CD47 para activar la fagocitosis de células tumorales. Además, dichas proteínas CD47 humanizadas tienen la capacidad de reconocer células humanas injertadas mediante la participación de proteínas y ligandos de la superficie celular presentes en la superficie de las células humanas injertadas (por ejemplo, SIRPα). Los roedores de la presente invención pueden ser capaces de activar la fagocitosis mediante el bloqueo de la señalización de CD47 a través de la proteína CD47 humanizada expresada en la superficie de las células del roedor. Los roedores de la presente invención pueden ser capaces de recibir células hematopoyéticas humanas trasplantadas; dichos roedores pueden desarrollar y/o tener un sistema inmunitario que comprende células humanas. De acuerdo con la invención, las proteínas CD47 humanizadas comprenden una parte de un polipéptido CD47 humano y una parte intracelular de un polipéptido CD47 de roedor, en donde la parte del polipéptido CD47 humano comprende el dominio extracelular y los dominios transmembrana del polipéptido CD47 humano, y está codificada por los exones 2 a 7 de un gen *CD47* humano, y en donde la parte intracelular del polipéptido CD47 de roedor está codificada por el exón 7 de un gen *CD47* de roedor. Una proteína CD47 humanizada descrita en el presente documento tiene una secuencia correspondiente al dominio V de inmunoglobulina aminoterminal de una proteína CD47 humana. Una proteína CD47 humanizada descrita en el presente documento tiene una secuencia correspondiente a una parte aminoterminal de una proteína CD47 humana que comprende el dominio extracelular y los dominios transmembrana de una proteína CD47 humana, en donde el dominio extracelular incluye el dominio V de inmunoglobulina aminoterminal de la proteína CD47 humana y el dominio transmembrana incluye los cinco dominios transmembrana de la proteína CD47 humana. Una proteína CD47 humanizada descrita en el presente documento tiene una secuencia correspondiente a la cola intracitoplasmática de una proteína CD47 de roedor (por ejemplo, murina). Las proteínas CD47 humanizadas descritas en el presente documento tienen una secuencia correspondiente a los restos de aminoácidos 19 a 292 (o 19 a 141 o 19 a 127) de una proteína CD47 humana. Los roedores de la presente invención pueden comprender un gen *CD47* endógeno humanizado de acuerdo con la invención que contiene material genético del roedor y de un ser humano). Un gen *CD47* humanizado descrito en el presente documento comprende exones de un gen *CD47* humano que codifica una parte extracelular que incluye el dominio V de inmunoglobulina aminoterminal de un gen *CD47* humano. Un gen *CD47* humanizado descrito en el presente documento comprende los exones 2 a 7 de *CD47* humano, que codifica una parte aminoterminal de una proteína CD47 humana que comprende el dominio extracelular y los dominios transmembrana de una proteína CD47 humana, en donde el dominio extracelular incluye el dominio V de inmunoglobulina aminoterminal de la proteína CD47 humana y el dominio transmembrana incluye los cinco dominios transmembrana de la proteína CD47 humana. Un gen *CD47* humanizado descrito en el presente documento comprende exones *CD47* de roedor que codifican el péptido señal, en su totalidad o en parte, y la cola intracitoplasmática de una proteína CD47 de roedor. Un gen *CD47* humanizado descrito en el presente documento comprende el exón 1 de *CD47* de roedor y el exón(es) cadena abajo del exón 7 que codifican la cola intracitoplasmática y la UTR en 3'. Dependiendo de las isoformas, puede haber uno o más exones cadena abajo del exón 7, estando el codón de parada y la UTR en 3' presentes en el último exón para todas las isoformas. Por ejemplo, la isoforma 2 del *CD47* tanto de ratón como humano que se muestra en la tabla 3 tiene dos exones cadena abajo del exón 7, designados como exón 8 y 9.

Diversos aspectos de la invención se describen en detalle en las siguientes secciones. En la presente solicitud, el uso de "o" significa "y/o" a menos que se indique otra cosa.

55 Gen del grupo de diferenciación 47 (CD47)

CD47, originalmente llamada proteína asociada a integrinas (IAP, del inglés *integrin-associated protein*) por su papel en la transducción de señales de las integrinas en las células inmunitarias, es una proteína transmembrana que incluye un dominio V de inmunoglobulina (IgV) aminoterminal, cinco dominios transmembrana y una cola intracitoplasmática corta carboxiterminal. La cola intracitoplasmática difiere en longitud según cuatro isoformas empalmadas de manera alternativa que se han identificado. Inicialmente se describió que CD47 (o IAP) se expresaba en todos los tejidos (isoforma 2), neuronas (isoforma 4) y queratinocitos y macrófagos (isoforma 1; véase Reinhold *et al.* (1995) J. Cell Sci. 108:3419-3425). Se sabe poco de la isoforma 3 a pesar de que esta forma tiene la segunda cola intracitoplasmática más larga entre las cuatro isoformas. Además de las integrinas, se sabe que CD47 interactúa con varias otras proteínas de la superficie celular, tal como, por ejemplo, trombospodina y miembros de la familia SIRP. De manera más destacable, CD47 interactúa con SIRPα y conduce a una señalización bidireccional que regula una variedad de

respuestas de célula a célula, tales como, por ejemplo, inhibición de la fagocitosis y activación de linfocitos T. De hecho, la interacción CD47-SIRPα se ha centrado en los últimos años por su papel al proporcionar a las células tumorales la capacidad de evadir la vigilancia inmunitaria. La unión de CD47 a SIRPα normalmente proporciona protección a través de señales antifagocíticas ("no me comas") para las células normales. Sin embargo, se ha

- 5 descubierto que los tumores también expresan señales antifagocíticas, incluida CD47, para evadir la destrucción por fagocitosis. De manera interesante, se sabe que CD47 está regulado positivamente en varios cánceres hemáticos y contribuye tanto al crecimiento como a la diseminación de tumores (Chao *et al.* (2012) *Curr Opin Immunol.* 24(2): 225-232).
- 10 Se desconocen los efectos completos de atacar CD47 y la vía CD47-SIRPα como nuevo tratamiento para el cáncer y se han explorado algunas posibles toxicidades. Se necesita una comprensión más profunda y detallada de la señalización de CD47 y de la vía CD47-SIRPα para desarrollar terapias mejor dirigidas para el tratamiento del cáncer del futuro.

15 *Secuencias de CD47*

En la tabla 3 se exponen secuencias de CD47 ilustrativas para ratón y ser humano. Para las secuencias de ARNm, la fuente en negrita indica la secuencia de codificación y los exones consecutivos, cuando se indican, están separados por texto subrayado alterno. Para secuencias de proteínas humanas y de ratón, los péptidos señal están subrayados, las secuencias extracelulares están en negrita y las secuencias intracitoplasmáticas están en cursiva. Para secuencias de proteínas humanizadas, las secuencias no humanas se indican en fuente normal, las secuencias humanas se indican en negrita y los péptidos señal están subrayados. Tal como se muestra, las isoformas difieren en el número de exones. Por ejemplo, las isoformas 1 a 4 del gen *CD47* humano tienen un total de 8, 9, 10 y 11 exones, respectivamente, con los exones 2 a 7 de cada isoforma codificando el dominio extracelular y los cinco dominios transmembrana.

TABLA 3

Isoforma 1 del ARNm de CD47 de ratón (XM_006521810.1)

GCCTACACCGGGAGAGCAGGGAGGAGGAGTTGGACTGAGGTTGGGCGGCTC
CGAGGTCCAGGGCGAGCTTGGCCAGAGGGAGTAGAGAGCAGCGGGGCTGC
GCAGGGACGCGTGCCGTGAGTTCGGTGAGCGTGTGTGTCCCATGCTCCCCG
CTTTCAGGCCCGGCCAGGACACGAAGCCGGAAGAGAGCTGGCTGGAGGGAC
GGGGCGCGTGAGCAGAGAGTGCAACCCGCGCAGCCCCGGGGACAGGCTGA
TTCTTGGCGCTCTCCGCCGAGCCTGCCAGGGCTGGGTGTGAGGCTGGCGT
CACGTCAACGAGCAGAGGCGGCCAGGCGGGGCGGAGTGCGCGTGCGCGGG
GCGGCGAGCAGCGCGCGCGCGCACCCCCGGGCAGCCTGGGCGGCCGCTCC
TGCCTGTCACTGCTGCGGCGCTGCTGGTTCGGTTCGTTTCCCTTGAAGGCAGCA
GCGGAGGCGGCGGCTGCTCCAGACACCTGCGGCGGCGACCCCCGGCGGCG
CGGAGATGTGGCCCTTGGCGGCGGCGCTGTTGCTGGGCTCCTGCTGCT
GCGGTTTCAGCTCAACTACTGTTTAGTAACGTCAACTCCATAGAGTTTAC
TTCATGCAATGAAACTGTGGTCATCCCTTGCATCGTCCGTAATGTGGAG
GCGCAAAGCACCGAAGAAATGTTTGTGAAGTGGAAGTTGAACAAATCG
TATATTTTCATCTATGATGGAAATAAAAATAGCACTACTACAGATCAAA
ACTTTACCAGTGCAAAAATCTCAGTCTCAGACTTAATCAATGGCATTGC
CTCTTTGAAAATGGATAAGCGCGATGCCATGGTGGGAAACTACACTTGC
GAAGTGACAGAGTTATCCAGAGAAGGCCAAAACAGTTATAGAGCTGAAA
AACCGCACGGCCTTCAACACTGACCAAGGATCAGCCTGTTCTTACGAGG
AGGAGAAAGGAGGTTGCAAATTAGTTTCGTGGTTTTCTCCAAATGAAA
GATCCTCATTGTTATTTTCCCAATTTTGGCTATACTCCTGTTCTGGGGAA
AGTTTGGTATTTTAACTCAAAATATAAATCCAGCCATACGAATAAGAG
AATCATTCTGCTGCTCGTTGCCGGGCTGGTGCTCACAGTCATCGTGGTT
GTTGGAGCCATCCTTCTCATCCCAGGAGAAAAGCCCGTGAAGAATGCTT
CTGGACTTGGCCTCATTGTAATCTCTACGGGGATATTAATACTACTTCA
GTACAATGTGTTTATGACAGCTTTTGGAAATGACCTCTTTCACCATTTGCC
ATATTGATCACTCAAGTGCTGGGCTACGTCCTTGCTTTGGTTCGGGCTGT

(continuación)

GTCTCTGCATCATGGCATGTGAGCCAGTGCACGGCCCCCTTTTGATTTC
 AGGTTTGGGGATCATAGCTCTAGCAGAACTACTTGGATTAGTTTATATG
 AAGTTTGTCTGAATAGGTGAAGGGAAGTGACGGACTGTAAGTTGGAAGTCA
 GAAATGGAAGAATACAGTTGTCTAAGCACCAGGTCTTCACGACTCACAGCT
 GGAAGGAACAGACAACAGTAAGTACTGACTTCCATCCAGGAAAACATGTCACAT
 AAATGATTACTAAGTTTATATTCAAAGCAGCTGTACTTTACATAATAAAAAA
 AATATGATGTGCTGTGTAACCAATTGGAATCCCATTTTTCTATTGTTTCTACT
 CAACTAGGGGGCAAACGTTTCAGGGGGCAACTTCCAAGAATGATGCTTGTTAG
 ATCCTAGAGTCTCTGAACACTGAGTTTAAATTGATTCCGAGTGAGACTCGCC
 AAGCACTAACCTGAGGGTTAGTTACCCAGAGATACCTATGAAAAACAGTGG
 TATCCAGCAAGCCTTAGTAACTCAGGTTGCCAGCAGCTTTGCCACTTCCGC
 TGCTAGCTGAATAACAAGACTGCCACTTCTGGGTCATAGTGATAGAGACTG
 AAGTAGAAAAACGAATGTGGTTGGGCAAATCCCGTGTGGCCCCCTCTGTGTG
 CTATGATATTGATGGCACTGGTGTCTTCATTCTTGGGGGTTGCCATCATTAC
 ACACACCCCTTTGACATACAGTGCACCCCAAGTTTGAATACATTTTTTTTGCA
 CCCTGTCCCGTTCTGCTACTTTGATTTGCGTTATGATATATATATATATAT
 AATACCTTTTCTCCTCTTTAAACATGGTCCTGTGACACAATAGTCAGTTGCA
 GAAAGGAGCCAGACTTATTCGCAAAGCACTGTGCTCAAACCTTTCAGAAAA
 AAAGGAAAAAAAAAAAAAAAAAGCTATAGTTGTAACATATGTATTCCAGACCTCT
 GGTTTAAAGGCAAAAAGAAAAAAAAATCTACAGTGTCTTCTCATGTTTTCTG
 ATCGGAGGCATGACAAAGCAAGACTGAAATCTGAACTGTGTCTCCTGCATG
 GCAACACGTGTCTCCGTCAGGCCCTCGCAAGGCCCGGGGAGGGGGTTCTAC
 GCCTCTTGTCTCTTTGTTGCATGCTGAACACTCATCGCCTTCCTACTGTATCC
 TGCCTCCTGCAGCCTCCCTCTTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTC
 TCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTC
 CTACCCAGTTAGAAGAAAACCAAGTTCCTGACAGTTGTGATCGCATGGAGT
 ACTTTTAGATTATTAGCACCTGTTTTTACCTCGTTTGTGGGCGTGTGTGTATG
 TGCACATGTATGAAGTCGGCACATGCACCTTCTGTATGGGCAGAGGCGTGG
 CATCTACAGAAGAGCAGATGCCAACTTTGTGCTTTTAGTGAATACATTAAAA
 AAAAAAAAAACCAACGGTCTTATTGAGTGGAATTCTATTTGATGCAAATATTT
 GAGCTCTTTAAGACTTTAAACTAGATAATGTGCCAAGCTTTTAGGACTGCT
 CACCAGTGCCCTCTGAAGAAACACCAGTACTTTTTCTGTTTGTGTAATAAA
 GGCATATTTGTATTTGTGTTTGCATCACTAATGGTTATTTCTTCTTAGTCCAC
 TGAATGTTTCCATGTGCCTCTCGTATGCCAACTTTTGTGTCATCTTTCATGTG
 GGGACCAAATGGTTTGTCTGTGGCAAACCTAAACCTATGACCTGCTGAGGCC
 TCTCAGAAAAGTACCACAGTACCAAGATAGTACTTCGCAAGAAAAGTAG
 GTTCCCTCCCTGGTTTTGTAGCTGTGCGCAATATTAGCGTAATCCAAGGAG
 CTGAACGCCCTTATATAAATCTGATGGCACCTGATGCTTTTAGTTCGAAAA
 TATTTACACTCGGATCATGTTGTTGATGACTTAAACAAAGTTTTGATGAAGA
 GAGCAAAAAAAAAAGCAGGTGGATTGGAACAGTTTCAGGGTTTTTTTTGTTT
 TTTGTTTTTTGTTTTTTGTTTTTTTTTTTTTTATTTTTGTTTTTCTGTTCTCTGTTAG
 AAAAGTCAGGTGTTCTCTGTGTCAGGCTATCTTTATAGTCAATTTTTTTTACGAA
 CTAAGTAGTACCTTTTAATATGTAGTCAACGCCCTCTGCTCGGGGTTTCAG
 TTTTGGGTCTTAACCAGCTGTGATGTTCTCTATGCTGCCTGCCACTTGAGGCA
 CTGAGTGCCCTAGACAGTCCCATCGGTGGTAGCCAGGGAAACGAAAGACGA
 ACTCAACTCTTGCTCCTAATAAATCAACTCTCTGTATGAAGGATGGCAGCATT
 AAGAGTCCCTCGCTGGGCATTATTGGGCCAGTTCACCTCTTTAAATCAA
 ACCCGCAGTGGCTCCAGTTCTCGTCCCATCAGATTTAAATTGCTAACAGTA

(continuación)

TTGGGGGGGCCACCAACGCATCTGTTTTGTCCACAATGCGCTTTTCTCTCCCAA
TCCCGATTTCTGCTGTCATAGCCTCTATTCAATTTTTATTATTGTCTGCCCTC
CACTTATACAATCGTAGAGAGCAATGCCATTTGTCACCTTTCTGCAACAGTTT
TTTGAGCCTTTATGGCTGAATCCCATTTTTCTTCTCTTTCAAACGTGTTTGCTCC
ATTGCTCCTCCCGCACGGCTGTCCGTACAGTCATCCCATCCATCTGGGGGGCC
TCTTTTCATCTCTCACCCCTTCCTGGTGCTTCGTGGATCTCTGCTTACCTCTGTG
GGTTTTTTTTTTTTTTTTTTGACTTATTCTTCTCACTGGACTTTAAGATTACTTC
CACAGCGAAAGTGCTGCCTCCCTTTTCTGCCCCGAGTGTTCTGCGTACTTTA
GATACTACTCAGTGCTGACATTTGATGGCAAAGTTGCCTGCACTTAAATTT
CTCTTTTAAATAGGGTGAAGTAGAGTTGGAGTTTTTTTCTCTTTTTTCTCTTTT
CTCCCTCCCTCCCTC
CCTCCCTCCCTCCCTCCCTCTCTCTCTCTTTTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCT
TTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTTTTTGACAAATCTCACAGGCTTTGA
GAATTATAAAAGGTGACAGTTCACCTGAAAATCACAGGTCTGGTCTGTTTAA
ATTGTTGAGAAATATCCGATTAAAAGTCTTGTGGCTGTGTCTTAATAGGCTC
TCTTTTACAGGACGTTGTAGTCAATAGAGTGGCTGAACCATACTTGAGTTTATA
AAGCTCAAAAACGTGATGCACCCACTCTGCTATTATCGTGTTAGTAAGAGTTC
AGCTGTATATCATTGTCTAGGTTTATCTTGTCTACAGTGGGTATTCAAATAT
GGCCACCAGAGGATATGTGTAAATATAAGCACCTGTATTTGCCTGTTGTTGA
GAACTGGAGGGGAAAAACAAAAAATGTCTGGCAACCCTTTGCCTTTTTAACCCT
AATTAATTGACAGTTTATTTAGAGATAAGAGTTTTCAAAAATCTCTTAACTG
CCACAACCCACAGAGGGTCTTGTTTTGCCATCTTCAGTGGCTCACAGATATG
ATCCAAGTTAACTTGAAAGAGATGAGCAGTACCCAGGAAATTGTCCTGCCTT
TAACTCTGGCTGTCTTAATTATGACTGTTTAAATGCTGAATTTTCCATCCGTC
TAGTGTTTGAGGGTAAAGAAAAGCCTTTTTTAAATAAGTATTTCTGTAAAAAC
GGCATCGGTGGGATCTTCTGTGTTGCTATCACGGGTGAAAGAGGGGAAACAT
TTCTTATTTTTTATTAAGCAGAGCATTATTTACAGAAAGCCATTGTTGAGAATT
AGTTCCACATCATATAAATATCCATTAACCATTCTAAATTGTAAGAGAACT
CCAGTGTTGCTATGCACAAGGAACTCTCCTGGGGGGCCTTTTTTTGCATAGCA
ATTAAAGGTATGCTATTTGTCAGTAGCCATTTTTTGCAGTGATTTAAAGACC
AAAGTTGTTTTACAGCTGTGTTACCCTTAAAGGTTTTTTTTTTTATGTATTAA
TCAATTTATCACTGTTTGAAGCTTTGAATACCTGCAATCTTTGCCAAGATACT
TTTTTATTTAAAAAAATAACTGTGTAAATATTACCCTGTAATATTATATATAC
TTAATAAAACATTTTAAAGCTA (SEQ ID NO: 1)

Isoforma 1 de aminoácidos CD47 de ratón (XP_006521873.1)

MWPLAAALLGSCCCGSAQLLFNSVNSI~~EFT~~SCNETVVICIVRNVEAQSTEE
MFVKWKLNKSYIFIYDGNK**NSTTTDQ**NFTSAKISVSDLINGIASLKMDKRDA
MVGNYTCEVTELSREGKTVIELKNRTAFNTDQGSACSYEEEEKGGCKLVS**W**
FSPNEKILIVIFPILAILFWGKFGILTLKYKSSHTNKRILLLVAGLVLT**VIVVVG**
 AILLIPGEKPVKNASGLGLIVISTGILLQYNVFMTAFGMTSFTIAILITQVLGYV
 LALVGLCLCIMACEPVHGPLLLISGLGIIALAE**LLGLVYM**KF**VE**(SEQ ID NO: 2)

Isoforma 2 del ARNm de CD47 de ratón (XM 006521811.1)

GCCTACACCGGGAGAGCAGGGAGGAGGAGTTGGACTGAGGTTGGGCGGCTC
CGAGGTCCAGGGCGAGCTTGCCAGAGGGAGTAGAGAGCAGCGGGGCTGC
GCAGGGACGCGTGCCGTGAGTTCCGGTGAGCGTGTGTGTCCCATGCTCCCGT
CTTTCAGGCCGGCCAGGACACGAAGCCGGAAGAGAGCTGGCTGGAGGGAC

(continuación)

GGGGGCCGTGAGCAGAGAGTGCAACCCGCGCAGCCCCGGGGACAGGCTGA
 TTCTTGCGCTCTCCGCCGAGCCTGCCAGGGCTGGGTGTGAGGCTGGCGT
 CACGTCAACGAGCAGAGGCGGCCAGGCGGGGCGGAGTGCGCGTGCGCGGG
 GCGGCGAGCACGCGCGCGCGCACCCCCGGGCAGCCTGGGCGGCCGCTCC
 TGCCTGTCACTGCTGCGGCGCTGCTGGTCGGTCGTTTCCCTTGAAGGCAGCA
 GCGGAGGCGGCGGCTGCTCCAGACACCTGCGGCGGCGACCCCCGGCGGGCG
 CGGAGATGTGGCCCTTGGCGGCGGCGCTGTTGCTGGGCTCCTGCTGCT
 GCGGTTACAGCTCAACTACTGTTTAGTAACGTCAACTCCATAGAGTTTAC
 TTCATGCAATGAACTGTGGTCATCCCTTGCATCGTCCGTAATGTGGAG
 GCGCAAAGCACCGAAGAAATGTTTGTGAAGTGGAAGTTGAACAAATCG
 TATATTTTCATCTATGATGGAAATAAAAAATAGCACTACTACAGATCAAA
 ACTTTACCAGTGCAAAAATCTCAGTCTCAGACTTAATCAATGGCATTGC
 CTCCTTTGAAAATGGATAAAGCGCGATGCCATGGTGGGAAACTACACTTGC
 GAAGTGACAGAGTTATCCAGAGAAGGCAAAACAGTTATAGAGCTGAAA
 AACCGCACGGTTTCGTGGTTTTCTCCAAATGAAAAGATCCTCATTGTTA
 TTTTCCCAATTTTGGCTATACTCCTGTTCTGGGGAAAGTTTGGTATTTTA
 AACTCAAATATAAATCCAGCCATACGAATAAGAGAATCATTCTGTGCTG
 TCGTTGCCGGGCTGGTGCTCACAGTCATCGTGGTTGTTGGAGCCATCCT
 TCTCATCCCAGGAGAAAAGCCCGTGAAGAATGCTTCTGGACTTGGCCTC
 ATTGTAATCTCTACGGGGATATTAATACTACTTCAGTACAATGTGTTTAT
 GACAGCTTTTGGAAATGACCTCTTTCACCATTTGCCATATTGATCACTCAA
 GTGCTGGGCTACGTCCTTGCTTTGGTCGGGCTGTGTCTCTGCATCATGG
 CATGTGAGCCAGTGCACGGCCCCCTTTTGATTTTCAAGTTTGGGGATCAT
 AGCTCTAGCAGAACTACTTGGATTAGTTTATATGAAGTTTGTGCTTCC
 AACCAGAGGACTATCCAACCTCCTAGGAATAGGTGAAGGGAAGTGACGG
 ACTGTAACCTGGAAGTCAGAAATGGAAGAATACAGTTGTCTAAGCACCAGG
 TCTTCACGACTCACAGCTGGAAGGAACAGACAACAGTAACTGACTTCCATC
 CAGGAAAACATGTACATAAATGATTACTAAGTTTATATTCAAAGCAGCTGT
 ACTTTACATAATAAAAAAATATGATGTGCTGTGTAACCAATTGGAATCCCA
 TTTTCTATTGTTTCTACTCAACTAGGGGCAAACGTTTCAGGGGCAACTTCCA
 AGAATGATGCTTGTAGATCCTAGAGTCTCTGAACACTGAGTTTAAATTGAT
 TCCGAGTGAGACTCGCCAAGCACTAACCTGAGGGTTAGTTACCCAGAGATA
 CCTATGAAAAACAGTGGTATCCAGCAAGCCTTAGTAAACTCAGGTTGCCAG
 CAGCTTTGCCACTTCCGCTGCTAGCTGAATAACAAGACTGCCACTTCTGGGT
 CATAGTGATAGAGACTGAAGTAGAAAAACGAATGTGGTTGGGCAAAATCCCG
 TGTGGCCCCCTCTGTGTGCTATGATATTGATGGCACTGGTGTCTTCATTCTTGG
 GGGTTGCCATCATTCACACACACCCCTTTGACATACAGTGCACCCAGTTTT
 GAATACATTTTTTTTGCACCCTGTCCCGTTCTGCTACTTTGATTTGCGTTATG
 ATATATATATATATATAAATACCTTTTCTCCTCTTTAAACATGGTCCTGTGA
 CACAATAGTCAGTTGCAGAAAGGAGCCAGACTTATTCGCAAAGCACTGTGC
 TCAAACCTCTCAGAAAAAAGGAAAAAAGCTATAGTTGTAACAT
 ATGTATTCCAGACCTCTGGTTTAAAGGCAAAAGAAAAAATCTACAGTGT
 TTCTTCTCATGTTTTCTGATCGGAGGCATGACAAAGCAAGACTGAAATCTGA
 ACTGTGTCTCCTGCATGGCAACACGTGTCTCCGTCAGGCCCTCGCAAGGCC
 GGGGAGGGGGTTCTACGCCTCTTGTCTCTTTGTTGCATGCTGAACACTCATC
 GCCTTCCTACTGTATCCTGCCTCCTGCAGCCTCCCTCTTCCTCCTCCTCTTCT
 CTCCTCCTCTTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCAAGTTTGAAAGGTCAAAC
 AAAACTACCACATTCCCTACCCAGTTAGAAGAAAACCACCGTCTGACAGTT

(continuación)

GTGATCGCATGGAGTACTTTTAGATTATTAGCACCTGTTTTACCTCGTTTGT
 GGGCGTGTGTGTATGTGCACATGTATGAAGTCGGCACATGCACCTTCTGTAT
 GGGCAGAGGCGTGGCATCTACAGAAGAGCAGATGCCAACTTTGTGCTTTTA
 GTGAATACATTAAAAAACCACGGTCCTTATTGAGTGGAATTCTA
 TTTGATGCAAATATTTGAGCTCTTTAAGACTTTAAACTAGATAATGTGCCA
 AGCTTTTAGGACTGCTCACCAGTGCCCTCTGAAGAAACACCAGTACTTTTTC
 CTGTTTGTGTAATAAAGGCATATTTGTATTTGTGTTTGCATCACTAATGGTTA
 TTTCTTCTTAGTCCACTGAATGTTTCCATGTGCCTCTCGTATGCCAACTTTT
 TGTCATCTTTTATGTGGGGACCAAATGGTTTGTCTGTGGCAAACCTAAACCT
 ATGACCTGCTGAGGCCTCTCAGAAAACCTGACCACAGTACCAAGATAGTACT
 TCGCAAAGAAAAGTAGGTTCCCTCCCTGGTTTTGTAGCTGTGCGCAATATTA
 GCGTAATTCCAAGGAGCTGAACGCCCTTATATAAATCTGATGGCACCTGATG
 CTTTGTAGTTCTGAAAATATTTACACTCGGATCATGTTGTTGATGACTTAAACA
 AAGTTTTGTAGAGAGAGCAAAAAAAGCAGGTGGATTGGAACAGTTTC
 AGGGTT
 TTCTGTTCTCTGTTAGAAAAGTCAGGTGTTCTCTGTCAGGCTATCTTTATAGT
 CAATTTTTTTTACGAACATAAAGTAGTACCTTTTAATATGTAGTCAACGCCCT
 CTGCTCGGGGTTTCAAGTTTTGGGTCTTAACCAGCTGTCATGTTCTCTATGCTGC
 CTGCCACTTGAGGCACTGAGTGCCCTAGACAGTCCCATCGGTGGTAGCCAG
 GGAAACGAAAGACGAACTCAACTCTTGCTCCTAATAATCAACTCTCTGTATG
 AAGGATGGCAGCATTAAGAGTCCTCCTGCCTGGGCATTATTGGGCCAGTTCA
 CCTCTTTAAATCAAACCCGCAGTGGCTCCCAGTTCTCGTCCCATCAGATTT
 AAATTGCTAACAGTATGGGGGGCACCACGCATCTGTTTTGTCCCAATGCG
 CTTTTCTCTCCCAAATCCCGATTTCTGCTGTCATAGCCTCTATTCAATTTTTAT
 TTATTGTCTGCCCTCCACTTATACAATCGTAGAGAGCAATGCCATTTGTCACT
 TTCTGCAACAGTTTTTTGAGCCTTTATGGCTGAATCCCATTTTTCTTCTCTTTC
 AAAGTGTGCTCCATTGCTCCTCCCGCACGGCTGTCCGTACAGTCATCCCAT
 CCATCTGGGGGCCCTTTTCATCTCTCACCCCTTCTGGTGCTTCGTGGATCTCT
 GCTTACCTCTGTGGGTTTTTTTTTTTTTTTTTTGACTTATTCTTCTCACTGGACT
 TTAAGATTACTTCCACAGCGAAAGTGCTGCCTCCCTTTTCTGCCCGCAGTGTT
 CTGCGTACTTTAGATACTACTCAGTGCTGACATTTGATGGCAAAAGTTGCCT
 GCACTTAAATTTCTCTTTTAAATAGGGTGAAGTAGAGTTGGAGTTTTTTTCTC
 TTTTTTCTCTTTTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT
 CCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCTCTCTCTCTTTTTTCTTTCTTC
 TTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTTTTTGACAAATCT
 CACAGGCTTTGAGAATTATAAAAGGTGACAGTTCACCTGAAAATCACAGGT
 CTGGTCTGTTTAAATTGTTGAGAAATATCCGATTAAAAGTCTTGTGGCTGTG
 TCCTAATAGGCTCTCTTTCAGGACGTTGTAGTCAATAGAGTGGCTGAACCAT
 ACTTGAGTTTATAAAGCTCAAAAACCTGATGCACCCACTCTGCTATTATCGTG
 TTAGTAAGAGTTTCACTGTATATCATTTGTCTAGGTTTATCTTGTCTACAGTG
 GGTATTCAAATATGGCCACCAGAGGATATGTGTAATATAAGCACCTGTATT
 TGCCTGTTGTTGAGAACTGGAGGGGAAAACAAAAAATGTCTGGCAACCCTTT
 GCCTTTTTAACCAGTAATTAATTGACAGTTTATTTAGAGATAAGAGTTTTCAA
 AAATCTCTTAACCTGCCACAACCCACAGAGGGTCTTGTGTTGCCATCTTCAGT
 GGCTCACAGATATGATCCAAGTTAACTTGAAAGAGATGAGCAGTACCCAGG
 AAATTGTCCTGCCTTTAACTCTGGCTGTCCTTAATTATGACTGTTTAAATGCTG
 AATTTTCCATCCGTCTAGTGTTGAGGGTAAAGAAAAGCCTTTTTTAAATAA
 GTATTTCTGTAAAACGGCATCGGTGGGATCTTCTGTGTTGCTATCACGGGTG
 AAAGAGGGAAACATTTCTTATTTTATTAAGCAGAGCATTATTTACAGAAAG
 CCATTGTTGAGAATTAGTTCCACATCATATAAATATCCATTAACCATTTCTA
 AATTGTAAGAGAACTCCAGTGTTGCTATGCACAAGGAACTCTCCTGGGGGC
 CTTTTTTTGCATAGCAATTAAAGGTATGCTATTTGTGCTAGCCATTTTTTGC
 AGTGATTTAAAGACCAAAGTTGTTTTACAGCTGTGTTACCCTTAAAGGTTTT
 TTTTTTATGTATTAAATCAATTTATCACTGTTTGAAGCTTTGAATACCTGCAA
 TCTTTGCCAAGATACTTTTTTATTTAAAAAATAACTGTGTAAATATTACCCT
 GTAATATTATATACTTAATAAAACATTTTAAGCTA (SEQ ID NO: 3)

(continuación)

Isoforma 2 de aminoácidos CD47 de ratón (XP_006521874.1)

MWPLAAALLLGSCCCGSAQLLFSNV̄NSIEFTSCN̄ETVVICIVRNVEAQSTEE
MFVKWKLNKSYIFIYDGNKNSTTTDQNFTSAKISVSDLINGIASLKMDKRDA
MVGNYTCEVTELSREGKTVIELKNRTVSWFSPNEKILIVIFPILAILLFWGKFG
 ILTLKYKSSHTNKRILLVAGLVLTIVVVGAILLIPGEKPVKNASGLGLIVISTG
 ILILLQYNVFMTAFGMTSFTIAILITQVLGYVLALVGLCLCIMACEPVHGPLLISG
 LGHIALAELLGLVYMKFVASNQRTIQPPNR(SAQ ID NO: 4)

Isoforma 3 del ARNm de CD47 de ratón (XM_006521807.1)

GCCTACACCGGGAGAGCAGGGAGGAGGAGTTGGACTGAGGTTGGGCGGCTC
 CGAGGTCCAGGGCGAGCTTGGCCAGAGGGAGTAGAGAGCAGCGGGGCTGC
 GCAGGGACGCGTGCCGTGAGTTCCGGTGAGCGTGTGTGTCCATGCTCCCGT
 CTTTCAGGCCCGCCAGGACACGAAGCCGGAAGAGAGCTGGCTGGAGGGAC
 GGGGGCCGTGAGCAGAGAGTGCAACCCGCGCAGCCCCGGGGACAGGCTGA
 TTCTTGGCGCTCTCCGCCGAGCCTGCCAGGGCTGGGTGTGAGGCTGGCGT
 CACGTCAACGAGCAGAGGCGGCCAGGCGGGGCGGAGTGC GCGTGCGCGGG
 GCGGGCAGCACGCGCGCGCGCACCCCCGGGCAGCCTGGGCGGCCGCTCC
 TGCCTGTCACTGCTGCGGCGCTGCTGGTCCGTCGTTTCCCTTGAAGGCAGCA
 GCGGAGGCGGCGGCTGCTCCAGACACCTGCGGCGGCGACCCCCGGCGGCG
 CGGAGATGTGGCCCTTGGCGGCGGCGCTGTTGCTGGGCTCCTGCTGCT
 GCGGTTCACTCAACTACTGTTTAGTAACGTCAACTCCATAGAGTTTAC
 TTCATGCAATGAACTGTGGTCATCCCTTGCATCGTCCGTAATGTGGAG
 GCGCAAAGCACCGAAGAAATGTTTGTGAAGTGGAAGTTGAACAAATCG
 TATATTTTCATCTATGATGGAAATAAAAATAGCACTACTACAGATCAAA
 ACTTTACCAGTGCAAAAATCTCAGTCTCAGACTTAATCAATGGCATTGC
 CTCTTTGAAAATGGATAAGCGCGATGCCATGGTGGGAAACTACACTTGC
 GAAGTGACAGAGTTATCCAGAGAAGGCCAAAACAGTTATAGAGCTGAAA
 AACCGCACGGCCTTCAACACTGACCAAGGATCAGCCTGTTCTTACGAGG
 AGGAGAAAGGAGGTTGCAAATTAGTTTCGTGGTTTTCTCCAAATGAAAA
 GATCCTCATTGTTATTTTCCCAATTTTGGCTATACTCCTGTTCTGGGGAA
 AGTTTGGTATTTTAACACTCAAATATAAATCCAGCCATACGAATAAGAG
 AATCATTTCTGCTGCTCGTTGCCGGGCTGGTGCTCACAGTCATCGTGGTT
 GTTGGAGCCATCCTTCTCATCCCAGGAGAAAAGCCCGTGAAGAATGCTT
 CTGGACTTGGCCTCATTGTAATCTCTACGGGGATATTAATACTACTTCA
 GTACAATGTGTTTATGACAGCTTTTGGAATGACCTCTTTCACCATTTGCC
 ATATTGATCACTCAAGTGCTGGGCTACGTCCTTGCTTTGGTCGGGCTGT
 GTCTCTGCATCATGGCATGTGAGCCAGTGCACGGCCCCCTTTTGATTTC
 AGGTTTGGGGATCATAGCTCTAGCAGAACTACTTGGATTAGTTTATATG
 AAGTTTGTGCTTCCAACCAGAGGACTATCCAACCTCCTAGGAAAGCTG

(continuación)

TAGAGGAACCCCTTAACGAATAGGTGAAGGGAAGTGACGGACTGTAACCT
GGAAGTCAGAAATGGAAGAATACAGTTGTCTAAGCACCAGGTCTTCACGAC
TCACAGCTGGAAGGAACAGACAACAGTAACTGACTTCCATCCAGGAAAACA
TGTCACATAAATGATTACTAAGTTTATATTCAAAGCAGCTGTACTTTACATA
ATAAAAAAATATGATGTGCTGTGTAACCAATTGGAATCCCATTTTCTATT
GTTTCTACTCAACTAGGGGCAAACGTTTCAGGGGCAACTTCCAAGAATGATG
CTTGTTAGATCCTAGAGTCTCTGAACACTGAGTTTAAATTGATTCCGAGTGA
GACTCGCCAAGCACTAACCTGAGGGTTAGTTACCCAGAGATACCTATGAAA
AACAGTGGTATCCAGCAAGCCTTAGTAACTCAGGTTGCCAGCAGCTTTGCC
ACTTCCGCTGCTAGCTGAATAACAAGACTGCCACTTCTGGGTCATAGTGATA
GAGACTGAAGTAGAAAAACGAATGTGGTTGGGCAAATCCCGTGTGGCCCT
CTGTGTGCTATGATATTGATGGCACTGGTGTCTTCATTCTTGGGGGTTGCCAT
CATTCACACACACCCCTTTGACATACAGTGCACCCAGTTTTGAATACATTT
TTTTTGACCCCTGTCCCGTTCTGCTACTTTGATTGCGTTATGATATATATAT
ATATATATAATACCTTTTCTCCTCTTAAACATGGTCCTGTGACACAATAGTC
AGTTGCAGAAAGGAGCCAGACTTATTCGCAAAGCACTGTGCTCAAACCTCTTC
AGAAAAAAGGAAAAAAGCTATAGTTGTAACATATGTATTCCAG
ACCTCTGGTTTAAAGGCAAAAGAAAAAATCTACAGTGTTTCTTCTCATGT
TTTCTGATCGGAGGCATGACAAAGCAAGACTGAAATCTGAACTGTGTCTCCT
GCATGGCAACACGTGTCTCCGTCAGGCCCTCGCAAGGCCCGGGAGGGGGT
TCTACGCCTCTTGTCTCTTTGTTGCATGCTGAACACTCATCGCCTTCCTACTG
TATCCTGCCTCCTGCAGCCTCCCTCTTCTCCTCCTCTTCTCCTCTTCTCCT
CCTCCTCCTCCTCCTCTTCTCCTCCAAGTTTGAAAGGTCAAACAAAACCTACCAC
ATTCCCTACCCAGTTAGAAGAAAACCAACCGTCCTGACAGTTGTGATCGCATG
GAGTACTTTTAGATTATTAGCACCTGTTTTTACCTCGTTTGTGGGCGTGTGTTG
TATGTGCACATGTATGAAGTCGGCACATGCACCTTCTGTATGGGCAGAGGCG
TGGCATCTACAGAAGAGCAGATGCCAACTTTGTGCTTTTAGTGAATACATTA
AAAAAAAAAAACCAACGGTCCTTATTGAGTGGAATTCTATTTGATGCAAAAT
ATTTGAGCTCTTTAAGACTTTAAAACCTAGATAATGTGCCAAGCTTTTAGGAC
TGCTCACCAGTGCCCTCTGAAGAAACACCAGTACTTTTTCTGTGTTGTGTAAT
AAAGGCATATTTGTATTTGTGTTTGCATCACTAATGGTTATTTCTTCTTAGTC
CACTGAATGTTTCCATGTGCCTCTCGTATGCCAACTTTTGTGTCATCTTTCAT
GTGGGGACCAAATGGTTTGTCTGTGGCAAACCTAAACCTATGACCTGCTGAG
GCCTCTCAGAAAACCTGACCACAGTACCAAGATAGTACTTCGCAAAGAAAAG
TAGGTTCCCTCCCTGGTTTTGTAGCTGTCGCCAATATTAGCGTAATTCCAAG
GAGCTGAACGCCTTTATATAAATCTGATGGCACCTGATGCTTTTAGTTCTGA
AAATATTTACACTCGGATCATGTTGTTGATGACTTAAACAAAGTTTTGATGA
AGAGAGCAAAAAAAGCAGGTGGATTTGGAACAGTTTCAGGGTTTTTTTTT
GTTTTTTGTTTTTTGTTTTTTGTTTTTTTTTTTTTTTATTTTTGTTTTCTGTTCTCTG
TTAGAAAAGTCAGGTGTTCTCTGTCAGGCTATCTTTATAGTCAATTTTTTTTA
CGAACTAAAGTAGTACCTTTTAATATGTAGTCAACGCCCTCTGCTCGGGGT
TCAGTTTTGGGTCTTAACCAGCTGTCATGTTCTCTATGCTGCCTGCCACTTGA
GGCACTGAGTGCCCTAGACAGTCCCATCGGTGGTAGCCAGGGAAACGAAAG
ACGAACTCAACTCTTGCTCCTAATAATCAACTCTCTGTATGAAGGATGGCAG
CATTAAGAGTCCTCCTGCCTGGGCATTATTGGGCCAGTTCACCTCTTTAAA
TCAAACCCGCAGTGGCTCCCAGTTCTCGTCCCACATCAGATTTAAATTGCTAAC
AGTATGGGGGGCACCACGCATCTGTTTTGTCCCAATGCGCTTTTCTCTCC
CAAATCCCGATTTCTGCTGTCATAGCCTCTATTCAATTTTTATTATTGTCTG

(continuación)

[illegible]

Isoforma 3 de aminoácidos CD47 de ratón (XP_006521870.1)

MWPLAAALLLGSCCCGSAQLLFSNVNSIEFTSCNETVVIPCIVRNVEAQSTEE
MFVKWKLNKSYIFIYDGNKNSTTTDQNFTSAKISVSDLINGIASLKMDKRDA
MVGNYTCEVTELSREGKTVIELKNRTAFNTDQGSACSYEEEEKGGCKLVSW
FSPNEKILIVIFPILAILFWGKFGILTLKYKSSHTNKRILLVAGLVLTVIVVVG
AILLIPGEKPVKNASGLGLIVISTGILILLQYNVFMTAFGMTSFTIAILITQVLGYV
LALVGLCLCIMACEPVHGPLLISGLGIIALAEGLVYMKFVASNQRTIQPPRKAV
EEPLNE(SEQ ID NO: 6)

Isoforma 4 del ARNm de CD47 de ratón (XM_006521808.1)

GCCTACACCGGGAGAGCAGGGAGGAGGAGTTGGACTGAGGTTGGGCGGCTC
CGAGGTCCAGGGCGAGCTTGCCAGAGGGAGTAGAGAGCAGCGGGGCTGC
GCAGGGACGCGTGCCGTGAGTTCCGGTGAGCGTGTGTGTCCCATGCTCCCGT
CTTTCAGGCCGGCCCAGGACACGAAGCCGGAAGAGAGCTGGCTGGAGGGAC
GGGGGCCGTGAGCAGAGAGTGCAACCCGCGCAGCCCCGGGGACAGGCTGA

(continuación)

TTCCTTGGCGCTCTCCGCCGGAGCCTGCCACGAGGCTGGGTGTGAGGGCTGGCGT
CACGTCAACGAGCAGAGGGCGGCCAGGCGGGGCGGAGTGC GCGCTGCGCGGG
GCGGCGAGCACGCGCGCGCGCACCCCCGGGCAGCCTGGGCGGGCCGCTCC
TGCCTGTCACTGCTGCGGCGCTGCTGGTCGGTTCGTTTCCCTTGAAGGCAGCA
GCGGAGGCGGCGGCTGCTCCAGACACCTGCGGCGGCGACCCCCGGCGGCG
CGGAGATGTGGCCCTTGGCGGGCGGCGCTGTTGCTGGGCTCCTGCTGCT
GCGGTTTCACTCAACTACTGTTTAGTAACGTCAACTCCATAGAGTTTAC
TTCATGCAATGAACTGTGGTTCATCCCTTGCATCGTCCGTAATGTGGAG
GCGCAAAGCACCGAAGAAATGTTTGTGAAGTGGAAAGTTGAACAAATCG
TATATTTTTCATCTATGATGGAAATAAAAAATAGCACTACTACAGATCAAA
ACTTTACCAGTGCAAAAATCTCAGTCTCAGACTTAATCAATGGCATTGC
CTCTTTGAAAATGGATAAGCGCGATGCCATGGTGGGAAACTACACTTGC
GAAGTGACAGAGTTATCCAGAGAAGGCCAAAACAGTTATAGAGCTGAAA
AACCGCACGGTTTTCGTGGTTTTCTCCAAATGAAAAGATCCTCATTGTTA
TTTTCCCAATTTTGGCTATACTCCTGTTCTGGGGAAAGTTTGGTATTTTA
ACACTCAAATATAAATCCAGCCATACGAATAAGAGAATCATTCTGCTGC
TCGTTGCCGGGCTGGTGCTCACAGTCATCGTGGTTGTTGGAGCCATCCT
TCTCATCCCAGGAGAAAAGCCCCGTGAAGAATGCTTCTGGACTTGGCCTC
ATTGTAATCTCTACGGGGATATTAATACTACTTCAGTACAATGTGTTTAT
GACAGCTTTTGAATGACCTCTTTCACCATTGCCATATTGATCACTCAA
GTGCTGGGCTACGTCCCTTGCTTTGGTCGGGCTGTGTCTCTGCATCATGG
CATGTGAGCCAGTGCACGGCCCCCTTTTGATTTCAAGGTTTGGGGATCAT
AGCTCTAGCAGAACTACTTGGATTAGTTTATATGAAGTTTGTTCGCTTCC
AACCAGAGGACTATCCAACCTCCTAGGAAAAGCTGTAGAGGAACCCCTTA
ACGCATTTAAAAGAGTCAAAAAGGAATGATGAATGACGAATAGGTGAAGGG
AAGTGACGGACTGTAACCTTGGAAAGTCAGAAAATGGAAGAATACAGTTGTCTA
AGCACCAGGTCTTCACGACTCACAGCTGGAAGGAACAGACAACAGTAACTG
ACTTCCATCCAGGAAAACATGTCACATAAATGATTACTAAGTTTATATTCAA
AGCAGCTGTACTTTACATAATAAAAAAAAAATATGATGTGCTGTGTAACCAATT
GGAATCCCATTTTTCTATTGTTTCTACTCAACTAGGGGGCAAACGTTTCAGGG
GCAACTTCCAAGAATGATGCTTGTTAGATCCTAGAGTCTCTGAACACTGAGT
TTAAATTGATTCCGAGTGAGACTCGCCAAGCACTAACCTGAGGGGTTAGTTAC
CCAGAGATACCTATGAAAAACAGTGGTATCCAGCAAGCCTTAGTAAACTCA
GGTTGCCAGCAGCTTTGCCACTTCCGCTGCTAGCTGAATAACAAGACTGCCA
CTTCTGGGT CATAGTGATAGAGACTGAAGTAGAAAAACGAATGTGGTTGGG
CAAATCCCGTGTGGCCCCCTCTGTGTGCTATGATATTGATGGCACTGGTGTCT
TCATTCTTGGGGGTTGCCATCATTACACACACCCCCCTTTGACATACAGTGCA
CCCCAGTTTTGAATACATTTTTTTTTTGCACCCTGTCCCGTTCTGCTACTTTGATT
TGCGTTATGATATATATATATATATAATAACCTTTTCTCCTCTTTAAACATG
GTCCTGTGACACAATAGTCAGTTGCAGAAAGGAGGCCAGACTTATTCGCAAA
GCACCTGTGCTCAAACCTTTCAGAAAAAAGGAAAAAAGCTATATAG
TTGTAACATATGTATTCCAGACCTCTGGTTTAAAGGCAAAAGAAAAAAT
CTACAGTGTTTCTTCTCATGTTTTCTGATCGGAGGCATGACAAAGCAAGACT
GAAATCTGAACGTGTGTCTCCTGCATGGCAACACGTGTCTCCGTCAGGCCCTC
GCAAGGCCCGGGGAGGGGGTTCTACGCCTCTTGCTCTCTTTGTTGCATGCTGA
ACACTCATCGCCTTCTACTGTATCCTGCCTCCTGCAGCCTCCCTCTTCCCTCC
TCCTCTTCCCTCTTCCCTCCTCTTCCCTCCTCCTCCTCTTCCCTCCAAGTTTGAA
AGGTCAAACAAAACCTACCACATTCCCTACCCAGTTAGAAGAAAAACCACCGT

(continuación)

CCTGACAGTTGTGATCGCATGGAGTACTTTTAGATTATTAGCACCTGTTTTTA
 CCTCGTTTGTGGGCGTGTGTATGTGCACATGTATGAAGTCGGCACATGCA
 CCTTCTGTATGGGCAGAGGCGTGGCATCTACAGAAGAGCAGATGCCAACTT
 TGTGCTTTTAGTGAATACATTAACAAAAACCAACGGTCCTTATTGAGT
 GGAATTCTATTTGATGCAAAATATTTGAGCTCTTTAAGACTTTAACTAGAT
 AATGTGCCAAGCTTTTAGGACTGCTCACCAGTGCCCTCTGAAGAAACACCAG
 TACTTTTTCTGTGTGTGTAATAAAGGCATATTTGTATTTGTGTTGCATCAC
 TAATGGTTATTTCTTCTTAGTCCACTGAATGTTTCCATGTGCCTCTCGTATGC
 CAAACTTTTTGTATCTTTTCATGTGGGGACCAAATGGTTTGTCTGTGGCAA
 CCTAAACCTATGACCTGCTGAGGCTCTCAGAAAACTGACCACAGTACCAA
 GATAGTACTTCGCAAAGAAAAGTAGGTTCCCTCCCTGGTTTTGTAGCTGTG
 CCAATATTAGCGTAATTCCAAGGAGCTGAACGCCTTTATATAAATCTGATGG
 CACCTGATGCTTTTAGTTCTGAAAATATTTACACTCGGATCATGTTGTTGATG
 ACTTAAACAAAGTTTTGATGAAGAGAGCAAAAAAAGCAGGTGGATTTGG
 AACAGTTTTAGGTT
 ATTTTTGTTTTTCTGTTCTCTGTTAGAAAAGTCAGGTGTTCTCTGTCAGGCTA
 TCTTTATAGTCAATTTTTTTTACGAAGTAAAGTAGTACCTTTAATATGTAGT
 CAACGCCCTCTGCTCGGGGTTTCAAGTTTTGGGTCTTAACCAGCTGTCATGTT
 TCTATGCTGCCTGCCACTTGAGGCACTGAGTGCCCTAGACAGTCCCATCGGT
 GGTAGCCAGGGAAACGAAAGACGAACTCAACTCTTGCTCCTAATAATCAAC
 TCTCTGTATGAAGGATGGCAGCATTAAAGAGTCCTCCTGCCTGGGCATTATTG
 GGCCAGTTCACCTCTTTAAATCAAACCCGCAGTGGCTCCCAGTTCTCGTCC
 CATCAGATTTAAATTGCTAACAGTATGGGGGGCACCACGCATCTGTTTTGTC
 CCACAATGCGCTTTTCTCTCCCAAATCCCGATTTCTGCTGTCATAGCCTCTAT
 TCAATTTTTATTATTGCTGCCCTCCACTTATACAATCGTAGAGAGCAATGC
 CATTTGTCACTTTCTGCAACAGTTTTTTGAGCCTTTATGGCTGAATCCCATTT
 TTCTTCTCTTTCAAACGTGTTGCTCCATTGCTCCTCCCGCACGGCTGTCCGTA
 CAGTCATCCCATCCATCTGGGGGCTCTTTCATCTCTCACCCCTTCTGGTGCT
 TCGTGGATCTCTGCTTACCTCTGTGGGTTTTTTTTTTTTTTTTTTGACTTATTCT
 CTCACTGGACTTTAAGATTACTTCCACAGCGAAAGTGCTGCCTCCCTTTTCTG
 CCCGCACTGTTCTGCGTACTTTAGATACTACTCAGTGCTGACATTTGATGGC
 AAAAGTTGCCTGCACTTAAATTTCTCTTTTAAATAGGGTGAAGTAGAGTTGG
 AGTTTTTTTCTCTTTTTTCTCTTTTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT
 CTCTCTCTCTCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCTCTCTCTCT
 TTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTT
 TTTGACAAATCTCACAGGCTTTGAGAATTATAAAAGGTGACAGTTCACCTGA
 AAATCACAGGTCTGGTCTGTTTAAATTGTTGAGAAATATCCGATTAAAAGTC
 TTGTGGCTGTGTCCTAATAGGCTCTCTTTCAGGACGTTGTAGTCAATAGAGT
 GGCTGAACCATACTTGAGTTTATAAAGCTCAAAAACTGATGCACCCACTCTG
 CTATTATCGTGTTAGTAAGAGTTTCAGCTGTATATCATTGTCTAGGTTTATCTT
 GTCCTACAGTGGGTATTCAAATATGGCCACCAGAGGATATGTGTAATATA
 AGCACCTGTATTTGCCTGTTGTTGAGAACTGGAGGGAAAAACAAAAAATGTC
 TGGCAACCCTTTGCCTTTTTAACCGTAATTAATTGACAGTTTATTTAGAGATA
 AGAGTTTTCAAAAATCTCTTAAGTCCACAACCCACAGAGGGTCTTGTTTTG
 CCATCTTCAGTGGCTCACAGATATGATCCAAGTTAACTTGAAAGAGATGAGC
 AGTACCCAGGAAATTGTCCTGCCTTAACTCTGGCTGTCCTTAATTATGACT
 GTTTAATGCTGAATTTCCATCCGTCTAGTGTGTTGAGGGTAAAGAAAAGCCT
 TTTTAAATAAGTATTTCTGTAAAACGGCATCGGTGGGATCTTCTGTGTTGCT

(continuación)

ATCACGGGTGAAAGAGGGAAACATTTCTTATTTTTATTAAGCAGAGCATTAT
TTACAGAAAGCCATTGTTGAGAATTAGTCCCACATCATATAAATATCCATT
AACCATTCTAAATTGTAAGAGAACTCCAGTGTTGCTATGCACAAGGAACTCT
CCTGGGGGGCCTTTTTTTGTCATAGCAATTAAAGGTATGCTATTTGTCAGTAGC
CATTTTTTGCAGTGATTTAAAGACCAAAGTTGTTTTACAGCTGTGTTACCCCT
AAAGGTTTTTTTTTATGTATTAAATCAATTTATCACTGTTTGAAGCTTTGAA
TACCTGCAATCTTTGCCAAGATACTTTTTTATTTAAAAAAATAACTGTGTAA
ATATTACCCTGTAATATTATATATACTTAATAAAACATTTTAAGCTA (SEQ ID
NO: 7)

Isoforma 4 de aminoácidos CD47 de ratón (XP_006521871.1)

MWPLAAALLLGSCCCGSAQLLF[~]SNVNSIEFTSCN[~]ETVVIPCIVRNVEAQSTEE
MFVKWKLNKS[~]YIFIYDGNKNSTTTDQNF[~]TSAKISVSDLINGIASLKMDKRDA
MVGNYTCEVTELSREGKTVIELKNRTVSWFSPNEKILIVIFPILAILLFWGKFG
ILTLKYKSSHTNKRILLVAGLVLTIVIVVVGAILLIPGEKPVKNASGLGLIVISTG
ILILLQYNVFM[~]TAFGMTSFTIAILITQVLGYVLALVGLCLCIMACEPVHGP[~]LLISG
LGII[~]ALAELLGLVYMKFVASN[~]QRTIQPPRKA[~]VEEPLNAFKESK[~]GMMNDE (SEQ ID
NO: 8)

Isoforma 1 del ARNm de CD47 humano (XM_005247909.1)

AGTGGGAGCGCGCGTGC[~]CGCGCGGCCGTGCAGCCTGGGCAGTGGGTCCTGCC
TGTGACGCGCGGCGGCGGTCGGTCTGCCTGTAAACGGCGGCGGCGGCTGCT
GCTCCGGACACCTGCGGCGGCGGCGGCGGCGACCCCGCGGCGGGCGCGGAGAT
GTGGCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCTGGGCTCGGCGTGCTGCGGATC
AGCTCAGCTACTATTTAATAAAAACAAAATCTGTAGAATTCACGTTTTGTA
ATGACACTGTCGTCATTCCATGCTTTGTTACTAATATGGAGGCACAAAA
CACTACTGAAGTATACGTAAAGTGGAAATTTAAAGGAAGAGATATTTAC
ACCTTTGATGGAGCTCTAAACAAGTCCACTGTCCCCACTGACTTTAGTA
GTGCAAAAATTGAAGTCTCACAATTACTAAAAGGAGATGCCTCTTTGAA
GATGGATAAGAGTGATGCTGTCTCACACACAGGAAACTACACTTGTGAA
GTAACAGAATTAACCAGAGAAGGTGAAACGATCATCGAGCTAAAATATC
GTGTTGTTTCATGGTTTTCTCCAAATGAAAATATTCTTATTGTTATTTTC
CCAATTTTGTCTATACTCCTGTTCTGGGGACAGTTTGGTATTAAAAACAC
TTAAATATAGATCCGGTGGTATGGATGAGAAAAACAATTGCTTTACTTGT
TGCTGGACTAGTGATCACTGTCATTGTCATTGTTGGAGCCATTCTTTTC
GTCCCAGGTGAATATTCATTAAAGAATGCTACTGGCCTTGGTTTAATTG
TGACTTCTACAGGGATATTAATATTACTTCACTACTATGTGTTTAGTACA
GCGATTGGATTAAACCTCCTTCGTCATTGCCATATTGGTTATTCAGGTGA
TAGCCTATATCCTCGCTGTGGTTGGACTGAGTCTCTGTATTGCGGCGTG
TATACCAATGCATGGCCCTCTTCTGATTTTCAGGTTTGAGTATCTTAGCT
CTAGCACAACTACTTGGACTAGTTTATATGAAATTTGTGGAATAAAGTAA
GTGAAGTGATGGACTCCGATTTGGAGAGTAGTAAGACGTGAAAGGAATACA
CTTGTTGTTAAGCACCATGGCCTTGATGATTCAGTGTGGGGAGAAGAAACA
AGAAAAGTAACTGGTTGTCACCTATGAGACCCCTACGTGATTGTTAGTTAAG
TTTTATTCAAAGCAGCTGTAATTTAGTTAATAAAATAATTATGATCTATGTT
GTTTGCCCAATTGAGATCCAGTTTTTGTGTTATTTTTAATCAATTAGGGGC
AATAGTAGAATGGACAATTTCCAAGAATGATGCCTTTCAGGTCCTAGGGCCT
CTGGCCTCTAGGTAACCAGTTTAAATTGGTTCAGGGTGATAACTACTTAGCA

(continuación)

CTGCCCTGGTGATTACCCAGAGATATCTATGAAAACCAGTGGCTTCCATCAA
ACCTTTGCCAACTCAGGTTACACAGCAGCTTTGGGCAGTTATGGCAGTATGGC
ATTAGCTGAGAGGTGTCTGCCACTTCTGGGTCAATGGAATAATAAATTAAGT
ACAGGCAGGAATTTGGTTGGGAGCATCTTGTATGATCTCCGTATGATGTGAT
ATTGATGGAGATAGTGGTCCTCATCTTGGGGGTTGCCATTCCCACATTCCC
CCTTCAACAAACAGTGTAACAGGTCCTTCCCAGATTTAGGGTACTTTTATTG
ATGGATATGTTTTCTTTTATTCACATAACCCCTTGAAACCCTGTCTTGTCTT
CCTGTTACTTGCTTCTGCTGTACAAGATGTAGCACCTTTTCTCCTCTTTGAAC
ATGGTCTAGTGACACGGTAGCACCAAGTTGCAGGAAGGAGCCAGACTTGTTT
TCAGAGCACTGTGTTACACTTTTTCAGCAAAAATAGCTATGGTTGTAACATA
TGTATTCCTTCTCTGATTTGAAGGCAAAAATCTACAGTGTTTCTTCACTTC
TTTTCTGATCTGGGGCATGAAAAAAGCAAGATTGAAATTTGAACTATGAGTC
TCCTGCATGGCAACAAAATGTGTGTCACCATCAGGCCAACAGGCCAGCCCTT
GAATGGGGATTTATTACTGTTGTATCTATGTTGCATGATAAACATTTCATCAC
CTTCTCTGTAGTCCCTGCCTCGTACTCCCCTTCCCCTATGATTGAAAAGTAA
ACAAAACCCACATTTTCTATCCTGGTTAGAAGAAAATTAATGTTCTGACAGT
TGTGATCGCCTGGAGTACTTTTAGACTTTTAGCATTCTGTTTTTACCTGTTTG
TGGATGTGTGTTTGTATGTGCATACGTATGAGATAGGCACATGCATCTTCTG
TATGGACAAAGGTGGGGTACCTACAGGAGAGCAAAGGTTAATTTTGTGCTT
TTAGTAAAAACATTTAAATACAAAGTTCTTTATTGGGTGGAATTATATTGA
TGCAAAATTTGATCACTTAAAACCTTTTAAAACCTTCTAGGTAATTTGCCACG
CTTTTGTACTGCTCACCAATACCCTGTAAAAATACGTAATTCTTCTGTTTGT
GTAATAAGATATTCATATTTGTAGTTGCATTAATAATAGTTATTTCTTAGTCC
ATCAGATGTTCCCGTGTGCTCTTTTATGCCAAATTGATTGICATATTTTCATG
TTGGGACCAAGTAGTTTGCCCATGGCAAACCTAAATTTATGACCTGCTGAGG
CCTCTCAGAAAACTGAGCATACTAGCAAGACAGCTCTTCTTGAAAAA
ATATGTATACACAAATATATACGTATATCTATATATACGTATGTATATACAC
ACATGTATATTCTTCTTGTATTGTGTAGCTGTCCAAAATAATAACATATATA
GAGGGAGCTGTATTCCTTTATACAAATCTGATGGCTCCTGCAGCACTTTTTC
CTTCTGAAAAATATTTACATTTTGTCTAACCTAGTTTGTACTTTAAAAATCAGT
TTTGATGAAAGGAGGGGAAAAGCAGATGGACTTGAAAAAGATCCAAGCTCCT
ATTAGAAAAGGTATGAAAATCTTTATAGTAAAATTTTTTATAAACTAAAGTT
GTACCTTTTAATATGTAGTAAACTCTCATTTATTTGGGGTTCGCTCTTGGATC
TCATCCATCCATTGTGTTCTCTTTAATGCTGCCTGCCTTTTGAGGCATTCACT
GCCCTAGACAATGCCACCAGAGATAGTGGGGGAAATGCCAGATGAAACCAA
CTCTTGCTCTCACTAGTTGTCAGCTTCTCTGGATAAGTGACCACAGAAGCAG
GAGTCCTCCTGCTTGGGCATCATTGGGCCAGTTCCTTCTCTTTAAATCAGATT
TGTAATGGCTCCCAAATTCCATCACATCACATTTAAATTGCAGACAGTGT
TGCACATCATGTATCTGTTTTGTCCCATAAATATGCTTTTTACTCCCTGATCCC
AGTTTCTGCTGTTGACTCTTCCATTCAGTTTATTTATTGTGTGTTCTCACAGT
GACACCATTTGTCTTTTCTGCAACAACCTTTCCAGCTACTTTTGCCAAATTC
TATTTGTCTTCTCCTTCAAAACATTCTCCTTTGCAGTTCCTCTTCATCTGTGTA
GCTGCTCTTTTGTCTCTTAACCTTACCATTCTATAGTACTTTATGCATCTCTGC
TTAGTTCTATTAGTTTTTTGGCCTTGCTCTTCTCCTTGATTTTAAATTCCTTC
TATAGCTAGAGCTTTTCTTTCTTTCATTCTCTCTTCTCCTGCAGTGTTTGCATAC
ATCAGAAGCTAGGTACATAAGTTAAATGATTGAGAGTTGGCTGTATTTAGAT
TTATCACTTTTAAATAGGGTGAGCTTGAGAGTTTCTTTCTTCTGTTTTTTTT
TTTTGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGTACTAATTTACATGCTCT

(continuación)

AAAAACCTTCAAAGGTGATTATTTTTCTCCTGGAACTCCAGGTCCATTCTG
TTTAAATCCCTAAGAATGTCAGAATTTAAATAACAGGGCTATCCCGTAATTG
GAAATATTTCTTTTTTCAGGATGCTATAGTCAATTTAGTAAGTGACCACCAA
ATTGTTATTTGCACTAACAAAGCTCAAAACACGATAAGTTTACTCCTCCATC
TCAGTAATAAAAAATTAAGCTGTAATCAACCTTCTAGGTTTCTCTTGTCTTAA
AATGGGTATTCAAAAATGGGGATCTGTGGTGTATGTATGGAAACACATACT
CCTTAATTTACCTGTTGTTGGAACTGGAGAAATGATTGTCGGGCAACCGTT
TATTTTTTATTGTATTTTATTGGTTGAGGGATTTTTTATAAACAGTTTACT
TGTGTCATATTTTAAAATTACTAACTGCCATCACCTGCTGGGGTCCTTTGTTA
GGTCATTTTCAGTGACTAATAGGGATAATCCAGGTAACCTTTGAAGAGATGA
GCAGTGAGTGACCAGGCAGTTTTTCTGCCTTTAGCTTTGACAGTTCTTAATTA
AGATCATTTGAAGACCAGCTTTCTCATAAAATTTCTCTTTTGAAAAAAGAAA
GCATTTGTACTAAGCTCCTCTGTAAAGACAACATCTTAAATCTTAAAGTGTT
GTTATCATGACTGGTGAGAGAAGAAAACATTTTGTTTTTATTAAATGGAGCA
TTATTTACAAAAGCCATTGTTGAGAATTAGATCCACATCGTATAAATATC
TATTAACCATTCTAAATAAAGAGAACTCCAGTGTTGCTATGTGCAAGATCCT
CTCTGGAGCTTTTTTGCATAGCAATTAAAGGTGTGCTATTTGTCAGTAGCC
ATTTTTTGCAGTGATTGAAGACCAAAGTTGTTTTACAGCTGTGTTACCGTT
AAAGGTTTTTTTTTATATGTATTAAATCAATTTATCACTGTTTAAAGCTTT
GAATATCTGCAATCTTTGCCAAGGTACTTTTTATTTAAAAAAAACATAAC
TTTGTAATAATTACCCTGTAATATTATATATACTTAATAAAACATTTTAAAGCT
A(SEQ ID NO: 9)

Isoforma 1 de aminoácidos CD47 humano (XP_005247966.1)

MWPLVAALLLGSACCGSAQLLFNKTKSVEFTFCNDTVVIPCFVTNMEAQNT
TEVYVWKWKFKGRDIYTFDGA LNKSTVPTDFSSAKIEVSQLLKGDASLKMDK
SDAVSHTGNYTCEVTELTREGETHIELKYRVVSWFSPNENILIVIFPIFAILLFW
QQFGIKTLKYRSGGMDEKTIALLVAGLVITVIVIVGAILFVPGEYSLKNATGLGLI
VTSTGILILLHYVVFSTAIGLTSFVIAILVIQVIAYILAVVGLSLCIAACIPMHGPLLI
SGLSILALAQLLGLVYMKFVE
 (SEQ ID NO: 10)

Isoforma 2 del ARNm de CD47 humano (NM_198793.2)

GGGGAGCAGGCGGGGGAGCGGGCGGGAAGCAGTGGGAGCGCGCGTGCGCG
CGGCCGTGCAGCCTGGGCAGTGGGTCTGCCTGTGACGCGCGGCGGCGGTC
GGTCCTGCCTGTAAACGGCGGCGGCGGCTGCTGCTCCAGACACCTGCGGCGG
CGGCGGCGACCCCGCGGCGGGCGCGGAGATGTGGCCCCTGGTAGCGGCG
CTGTTGCTGGGCTCGGCGTGCTGCGGATCAGCTCAGCTACTATTTAATA
AAACAAAATCTGTAGAATTCACGTTTTGTAAATGACACTGTGCGTCATTC
ATGCTTTGTTACTAATATGGAGGCACAAAACACTACTGAAGTATACGTA
AAGTGGAATTTAAAGGAAGAGATATTTACACCTTTGATGGAGCTCTAA
ACAAGTCCACTGTCCCCACTGACTTTAGTAGTGCAAAAATTGAAGTCTC
ACAATTACTAAAAGGAGATGCCTCTTTGAAGATGGATAAGAGTGATGCT
GTCTCACACACAGGAACTACACTTGTGAAGTAACAGAATTAACCAGAG
AAGGTGAAACGATCATCGAGCTAAAATATCGTGTTGTTTCATGGTTTTC
TCCAAATGAAAATATTCTTATTGTTATTTTCCCAATTTTGTCTATACTCC
TGTTCTGGGGACAGTTTGGTATTTAAACACTTAAATATAGATCCGGTGG
TATGGATGAGAAAACAATTGCTTTACTTGTGCTGGACTAGTGATCACT

(continuación)

GTCATTGTCATTGTTGGAGCCATTCTTTTCGTCCCAGGTGAATATTCATT
AAAGAATGCTACTGGCCTTGGTTTAATTGTGACTTCTACAGGGATATTA
ATATTACTTCACTACTATGTGTTTAGTACAGCGATTGGATTAAACCTCCTT
CGTCATTGCCATATTGGTTATTCAGGTGATAGCCTATATCCTCGCTGTG
GTTGGACTGAGTCTCTGTATTGCGGCGTGTATACCAATGCATGGCCCTC
TTCTGATTTTCAGGTTTGAGTATCTTAGCTCTAGCACAATTACTTGGACTA
GTTTATATGAAATTTGTGGCTTCCAATCAGAAGACTATACAACCTCCTA
GGAATAACTGAAGTGAAGTGATGGACTCCGATTTGGAGAGTAGTAAGACG
TGAAAGGAATACACTTGTGTTTAAGCACCATGGCCTTGATGATTCACTGTTG
GGGAGAAGAAACAAGAAAAAGTAACTGGTTGTACCTATGAGACCCTTACGT
GATTGTTAGTTAAGTTTTTTATTCAAAGCAGCTGTAATTTAGTTAATAAAATA
ATTATGATCTATGTTGTTTGCCCAATTGAGATCCAGTTTTTTGTTGTTATTTTT
AATCAATTAGGGGCAATAGTAGAATGGACAATTTCCAAGAATGATGCCTTT
CAGGTCTAGGGCCTCTGGCCTCTAGGTAACCAAGTTTAAATTGGTTCAGGT
GATAACTACTTAGCACTGCCCTGGTGATTACCCAGAGATATCTATGAAAACC
AGTGGCTTCCATCAAACCTTTGCCAACTCAGGTTTACAGCAGCTTTGGGCAG
TTATGGCAGTATGGCATTAGCTGAGAGGTGTCTGCCACTTCTGGGTCAATGG
AATAATAAATTAAGTACAGGCAGGAATTTGGTTGGGAGCATCTTGTATGATC
TCCGTATGATGTGATATTGATGGAGATAGTGGTCCTCATTCTTGGGGGTTGC
CATTCCACATTCCCCCTTCAACAAACAGTGTAACAGGTCCTTCCCAGATTT
AGGGTACTTTTATTGATGGATATGTTTTCTTTTATTACATAACCCCTTGAA
ACCCTGTCTTGTCTCTCTGTTACTTGCTTCTGCTGTACAAGATGTAGCACCTT
TTCTCCTCTTTGAACATGGTCTAGTGACACGGTAGCACCAAGTTGCAGGAAGG
AGCCAGACTTGTCTCAGAGCACTGTGTTTACACTTTTTCAGCAAAAATAGCT
ATGGTTGTAACATATGTATTCCTTCTCTGATTTGAAGGCAAAAATCTACA
GTGTTTCTTCACTTCTTTTCTGATCTGGGGCATGAAAAAAGCAAGATTGAAA
TTTGAACATATGAGTCTCCTGCATGGCAACAAAATGTGTGTCACCATCAGGCC
AACAGGCCAGCCCTTGAATGGGGATTTATTACTGTTGTATCTATGTTGCATG
ATAAACATTTCATCACCTTCTCCTGTAGTCCTGCCTCGTACTCCCCTTCCCCT
ATGATTGAAAAGTAAACAAAACCCACATTTTCTATCCTGGTTAGAAGAAAA
TTAATGTTCTGACAGTTGTGATCGCCTGGAGTACTTTTAGACTTTTAGCATTC
GTTTTTTACCTGTTTGTGGATGTGTGTTTGTATGTGCATACGTATGAGATAGG
CACATGCATCTTCTGTATGGACAAAGGTGGGGTACCTACAGGAGAGCAAAAG
GTAAATTTTGTGCTTTTAGTAAAAACATTTAAATACAAAGTTCTTTATTGGGT
GGAATTATATTTGATGCAAAATATTTGATCACTTAAACTTTTAAACTTCTA
GGTAATTTGCCACGCTTTTGTACTGCTCACCAATACCCTGTAAAAATACGTA
ATTCTTCTGTTTGTGTAATAAGATATTCATATTTGTAGTTGCATTAATAATA
GTTATTTCTTAGTCCATCAGATGTTCCCGTGTGCCTCTTTTATGCCAAATTGA
TTGTCATATTTTCATGTTGGGACCAAGTAGTTTGGCCATGGCAAACCTAAATT
TATGACCTGCTGAGGCCTCTCAGAAAACCTGAGCATACTAGCAAGACAGCTC
TTCTTGAAAAAATAATATGTATACACAAATATATACGTATATCTATATATA
CGTATGTATATACACACATGTATATTCTTCTTGATTGTGTAGCTGTCCAAAA
TAATAACATATATAGAGGGAGCTGTATTCCTTTATACAAATCTGATGGCTCC
TGCAGCACTTTTCTCTTGAAAAATATTTACATTTTGCTAACCTAGTTTGTTA
CTTTAAAAATCAGTTTTTGATGAAAGGAGGGAAGCAGATGGACTTGAAAA
AGATCCAAGCTCCTATTAGAAAAGGTATGAAAATCTTTATAGTAAAATTTTT
TATAAACTAAAGTTGTACCTTTTAATATGTAGTAAACTCTCATTTATTTGGGG
TTGCTCTTGGATCTCATCCATCCATTGTGTTCTTTAATGCTGCCTGCCTTT

(continuación)

TGAGGCATTCACTGCCCTAGACAATGCCACCAGAGATAGTGGGGGAAATGC
 CAGATGAAACCAACTCTTGCTCTCACTAGTTGTCAGCTTCTCTGGATAAGTG
 ACCACAGAAGCAGGAGTCCTCCTGCTTGGGCATCATTGGGCCAGTTCCTTCT
 CTTTAAATCAGATTTGTAATGGCTCCCAAATTCATCACATCACATTTAAATT
 GCAGACAGTGTTTTGCACATCATGTATCTGTTTTGTCCCATAATATGCTTTTT
 ACTCCCTGATCCCAGTTTTCTGCTGTTGACTCTTCCATTCAAGTTTTATTATTGT
 GTGTTCTCACAGTGACACCATTTGTCTTTTCTGCAACAACCTTCCAGCTAC
 TTTTGCCAAATTCTATTTGTCTTCTCCTTCAAAACATTCTCCTTGCAGTTCCT
 CTTTATCTGTGTAGCTGCTCTTTTGTCTCTTAACTTACCATTCTATAGTACTT
 TATGCATCTCTGCTTAGTTCTATTAGTTTTTTGGCCTTGCTCTTCTCCTTGATT
 TAAAATTCCTTCTATAGCTAGAGCTTTTCTTTCTTTCATTCTCTCTTCTGCA
 GTGTTTTGCATACATCAGAAGCTAGGTACATAAGTTAAATGATTGAGAGTTG
 GCTGTATTAGATTTATCACTTTTTAATAGGGTGAGCTTGAGAGTTTTCTTTC
 TTTCTGTTTTTTTTTTTTGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGTACTA
 ATTTACATGCTCTAAAAACCTTCAAAGGTGATTATTTTTCTCCTGGAACTC
 CAGGTCCATTCTGTTTAAATCCCTAAGAATGTCAGAAATTAATAACAGGGC
 TATCCCCTAATTGGAAATATTTCTTTTTTCAGGATGCTATAGTCAATTTAGTA
 AGTGACCACCAAATTGTTATTTGCACTAACAAAGCTCAAAACACGATAAGTT
 TACTCCTCCATCTCAGTAATAAAAAATTAAGCTGTAATCAACCTTCTAGGTTT
 CTCTTGCTTAAATGGGTATTCAAAAATGGGGATCTGTGGTGTATGTATGG
 AAACACATACTCCTTAATTTACCTGTTGTTGGAACTGGAGAAATGATTGTC
 GGGCAACCGTTTATTTTTATTGTATTTTATTGTTGAGGGATTTTTTTATA
 AACAGTTTTACTTGTGTCATATTTTAAATTAATACTGCCATCACCTGCTGG
 GGTCTTTGTTAGGTCATTTTCACTGACTAATAGGGATAATCCAGGTAACCT
 TGAAGAGATGAGCAGTGAGTGACAGGCAGTTTTTCTGCCTTTAGCTTTGAC
 AGTTCTTAATTAAGATCATTGAAGACCAGCTTCTCATAAATTTCTCTTTTGG
 AAAAAAAGAAAGCATTGTACTAAGCTCCTCTGTAAGACAACATCTTAAAT
 CTAAAAAGTGTTGTTATCATGACTGGTGAGAGAAGAAAACATTTTGTTTTA
 TTAATGGAGCATTATTTACAAAAAGCCATTGTTGAGAATTAGATCCCACAT
 CGTATAAATATCTATTAACCATTCTAAATAAAGAGAACTCCAGTGTTGCTAT
 GTGCAAGATCCTCTCTTGGAGCTTTTTTGCATAGCAATTAAGGTGTGCTAT
 TTGTCAGTAGCCATTTTTTGCAGTGATTGAAGACCAAAGTTGTTTTACAGC
 TGTGTTACCGTTAAAGGTTTTTTTTTTTATATGTATTAAATCAATTTATCACT
 GTTTAAAGCTTTGAATATCTGCAATCTTTGCCAAGGTACTTTTTTATTTAAAA
 AAAAACATAACTTTGTAAATATTACCCTGTAATATTATATATACTTAATAAA
 ACATTTTAAGCTATTTTGTGTTGGGCTATTTCTATTGCTGCTACAGCAGACCACA
 AGCACATTTCTGAAAAATTTAATTTATTAATGTATTTTAAAGTTGCTTATATT
 CTAGGTAACAATGTAAAGAATGATTTAAATATTAATTATGAATTTTTTGGAG
 TATAATACCCAATAAGCTTTTAATTAGAGCAGAGTTTTTAATTAAGTTTTTA
 AATCAGTC
 (SEQ ID NO: 11)

Isoforma 2 de aminoácidos CD47 humano (NP_942088.1)

MWPLVAALLLGSACCGSAQLLFNKTKSVEFTFCNDTVVIPCFVTNMEAQNT
 TEVYVWKWKGRDIYTFDGLNKSVPPTDFSSAKIEVSQLLKGDASLKMDK
 SDAVSHTGNYTCEVTELTREGETHELKRYVSWFSPNENILIVIFPIFAILLFW
 GQFGIKTLKYRSGGMDEKTIALLVAGLVITVIVIVGAILFVPGEYSLKNATGLGLI
 VTSTGILILLHYVVFSTAIGLTSFVIALVIQVIAYILAVVGLSLCIAACIPMHGPLLI
 SGLSILALAQLLGLVYMKFVASNQKTIQPPRNN(SEQ ID NO: 12)

Isoforma 3 del ARNm de CD47 humano (XM_005247908.1)

(continuación)

AGTGGGAGCGCGCGTGCAGCCTGGGCAGTGGGTCCTGCC
 TGTGACGCGCGGCGGCGGTCGGTCTGCCTGTAAACGGCGGCGGCGGCTGCT
 GCTCCGGACACCTGCGGCGGCGGCGGCGACCCCGCGGCGGGCGCGGAGAT
GTGGCCCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCTGGGCTCGGCGTGCTGCGGATC
AGCTCAGCTACTATTTAATAAAAACAAAATCTGTAGAATTCACGTTTTGTA
ATGACACTGTCGTCATTCCATGCTTTGTTACTAATATGGAGGCACAAAA
CACTACTGAAGTATACGTAAAGTGGAATTTAAAGGAAGAGATATTTAC
ACCTTTGATGGAGCTCTAAACAAGTCCACTGTCCCCACTGACTTTAGTA
GTGCAAAAAATTGAAGTCTCACAATTACTAAAAGGAGATGCCTCTTTGAA
GATGGATAAGAGTGATGCTGTCTCACACACAGGAAACTACACTTGTGAA
GTAACAGAAATTAACCAGAGAAGGTGAAACGATCATCGAGCTAAAATATC
GTGTTGTTTTCATGGTTTTCTCCAAATGAAAATATTCTTATTGTTATTTT
CCAATTTTTGCTATACTCCTGTTCTGGGGACAGTTTGGTATTTAAACAC
TTAAATATAGATCCGGTGGTATGGATGAGAAAAACAATTGCTTTACTTGT
TGCTGGACTAGTGATCACTGTCATTGTCTATTGTTGGAGCCATTCTTTTC
GTCCCAGGTGAATATTCATTAAAGAATGCTACTGGCCTTGGTTTAATTG
TGACTTCTACAGGGATATTAATATTACTTCACTACTATGTGTTTAGTACA
GCGATTGGATTAAACCTCCTTCGTCATTGCCATATTGGTTATTCAGGTGA
TAGCCTATATCCTCGCTGTGGTTGGACTGAGTCTCTGTATTGCGGCGTG
TATACCAATGCATGGCCCTCTTCTGATTTTCAAGTTTGAAGTATCTTAGCT
CTAGCACAACTTGGACTAGTTTATATGAAATTTGTGGCTTCCAATC
AGAAGACTATACAACCTCCTAGGAAAGCTGTAGAGGAACCCCTTAATGA
ATAACTGAAGTGAAGTGATGGACTCCGATTTGGAGAGTAGTAAGACGTGAA
AGGAATACACTTGTGTTTAAGCACCATGGCCTTGATGATTCACTGTTGGGGA
GAAGAAACAAGAAAAGTAAGTGGTTGTACCTATGAGACCCTTACGTGATT
GTTAGTTAAGTTTTTATTCAAAGCAGCTGTAATTTAGTTAATAAAAATAATTAT
GATCTATGTTGTTTGCCCAATTGAGATCCAGTTTTTTGTTGTTATTTTTAATC
AATTAGGGGCAATAGTAGAATGGACAATTTCCAAGAATGATGCCTTTCAGG
TCCTAGGGCCTCTGGCCTCTAGGTAACCAGTTTAAATTGGTTCAGGGTGATA
ACTACTTAGCACTGCCCTGGTGATTACCCAGAGATATCTATGAAAACCAGTG
GCTTCCATCAAACCTTTGCCAACTCAGGTTTACAGCAGCTTGGGCAGTTAT
GGCAGTATGGCATTAGCTGAGAGGTGTCTGCCACTTCTGGGTCAATGGAATA
ATAAATTAAGTACAGGCAGGAATTTGGTTGGGAGCATCTTGTATGATCTCCG
TATGATGTGATATTGATGGAGATAGTGGTCCTCATTCTTGGGGGTTGCCATT
CCCACATTCCCCCTTCAACAAACAGTGTAACAGGTCCTTCCCAGATTTAGGG
TACTTTTATTGATGGATATGTTTTCTTTTATTCACATAACCCCTTGAAACCC
TGTCTTGTCTCCTGTTACTTGTCTCTGCTGTACAAGATGTAGCACCTTTTCT
CCTCTTTGAACATGGTCTAGTGACACGGTAGCACCAAGTTGCAGGAAGGAGC
CAGACTTGTCTCAGAGCACTGTGTTTACACTTTTTCAGCAAAAAATAGCTATG
GTTGTAACATATGTATTTCCCTCCTCTGATTTGAAGGCAAAAAATCTACAGTG
TTTCTTCACTTCTTTTCTGATCTGGGGCATGAAAAAAGCAAGATTGAAATTT
GAACATGAGTCTCCTGCATGGCAACAAAATGTGTGTCACCATCAGGCCAA
CAGGCCAGCCCTTGAATGGGGATTTTACTGTTGTATCTATGTTGCATGAT
AAACATTCATCACCTTCCTCCTGTAGTCCTGCCTCGTACTCCCCTTCCCCTAT
GATTGAAAAGTAAACAAAACCCACATTTCTATCCTGGTTAGAAGAAAATT

(continuación)

AATGTTCTGACAGTTGTGATCGCCTGGAGTACTTTTAGACTTTTAGCATTTCGT
TTTTACCTGTTTGTGGATGTGTGTTTGTATGTGCATACGTATGAGATAGGCA
CATGCATCTTCTGTATGGACAAAGGTGGGGTACCTACAGGAGAGCAAAGGT
TAATTTTGTGCTTTTAGTAAAAACATTTAAATACAAAGTTCCTTATTGGGTGG
AATTATATTTGATGCAAATATTTGATCACTTAAAACTTTTAAAACTTCTAGGT
AATTTGCCACGCTTTTGA CTGCTCACCAATACCCTGTAAAAATACGTAATT
CTCCTGTTTGTGTAATAAGATATTCATATTTGTAGTTGCATTAATAATAGTT
ATTTCTTAGTCCATCAGATGTTCCCGTGTGCCTCTTTTATGCCAAATTGATTG
TCATATTTTCATGTTGGGACCAAGTAGTTTGGCCATGGCAAACCTAAATTTAT
GACCTGCTGAGGCCTCTCAGAAAACTGAGCATACTAGCAAGACAGCTCTTCT
TGAAAAAATAATATGTATACACAAATATATACGTATATCTATATATACGTA
TGTATATACACACATGTATATTCTTCCTTGATTGTGTAGCTGTCCAAAATAAT
AACATATATAGAGGGAGCTGTATTCCTTTATACAAATCTGATGGCTCCTGCA
GCACTTTTCTTCTGAAAAATATTTACATTTTGCTAACCTAGTTTGTACTTT
AAAAATGCTTTTGTATGAAAGGAGGGAAAAAGCAGATGGACTTGAAAAAGA
TCCAAGCTCCTATTAGAAAAAGGTATGAAAATCTTTATAGTAAAAATTTTAT
AAACTAAAGTTGTACCTTTAATATGTAGTAAACTCTCATTTATTTGGGGTTC
GCTCTTGGATCTCATCCATCCATTGTGTTCTCTTTAATGCTGCCTGCCTTTTG
AGGCATTCACTGCCCTAGACAATGCCACCAGAGATAGTGGGGGAAATGCCA
GATGAAACCAACTCTTGCTCTCACTAGTTGTCAGCTTCTCTGGATAAGTGAC
CACAGAAGCAGGAGTCCTCCTGCTTGGGCATCATTGGGCCAGTTCCCTTCTCT
TTAAATCAGATTTGTAATGGCTCCCAAATTCATCACATCACATTTAAATG
CAGACAGTGTTTTGCACATCATGTATCTGTTTTGTCCCATAAATATGCTTTTTA
CTCCCTGATCCAGTTTCTGCTGTGACTCTTCCATTCACTTTTATTATTGTG
TGTTCTCACAGTGACACCATTGTCTCTTTCTGCAACAACCTTTCCAGCTACT
TTTGCCAAATTCTATTGTCTCTCTCTTCAAAACATTCTCCTTTGCAGTTCCTC
TTCATCTGTGTAGCTGCTCTTTTGTCTCTTAACTTACCATTCTATAGTACTTT
ATGCATCTCTGCTTAGTTCTATTAGTTTTTTTGGCCTTGCTCTTCTCCTTGATT
TAAAATTCCTTCTATAGCTAGAGCTTTTCTTTCTTTTCTCTCTCTCTCTGAG
TGTTTTGCATACATCAGAAGCTAGGTACATAAGTTAAATGATTGAGAGTTGG
CTGTATTTAGATTTATCACTTTTAAATAGGGTGAGCTTGAGAGTTTTCTTTCT
TTCTGTTTTTTTTTTTTTGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGA
TTTCACATGCTCTAAAAACCTTCAAAGGTGATTATTTTTCTCCTGGAAACTCC
AGGTCCATTCTGTTTAAATCCCTAAGAATGTCAGAATTAATAACAGGGCT
ATCCCGTAATTGGAAATATTTCTTTTTTTCAGGATGCTATAGTCAATTTAGTAA
GTGACCACCAAATTGTTATTTGCACTAACAAAGCTCAAAACACGATAAGTTT
ACTCCTCCATCTCAGTAATAAAAAATTAAGCTGTAATCAACCTTCTAGGTTTC
TCTTGTCTTAAATGGGTATTCAAAAAATGGGGATCTGTGGTGTATGTATGGA
AACACATACTCCTTAATTTACCTGTTGTTGGAAACTGGAGAAATGATTGTCG
GGCAACCGTTTTATTTTTTATTGTATTTTATTTGGTTGAGGGATTTTTTTATAA
ACAGTTTTACTTGTGTCATATTTTAAATTAATACTAACTGCCATCACCTGCTGGG
GTCCTTTGTTAGGTCAATTTTCAGTGACTAATAGGGATAATCCAGGTAACCTT
GAAGAGATGAGCAGTGAGTGACCAGGCAGTTTTTCTGCCTTTAGCTTTGACA
GTTCTTAATTAAGATCATTGAAGACCAGCTTTCTCATAAATTTCTCTTTTTGA
AAAAAAGAAAGCATTTGTACTAAGCTCCTCTGTAAGACAACATCTTAAATCT
TAAAAGTGTTGTTATCATGACTGGTGAGAGAAGAAAACATTTTGTTTTTATT
AAATGGAGCATTATTTACAAAAAGCCATTGTTGAGAATTAGATCCCACATCG
TATAAATATCTATTAACCATTTCTAAATAAAGAGAACTCCAGTGTTGCTATGT
GCAAGATCCTCTCTTGGAGCTTTTTTGCATAGCAATTAAAGGTGTGCTATTT
GTCAGTAGCCATTTTTTTGCAGTGATTTGAAGACCAAAGTTGTTTTACAGCT
GTGTTACCGTTAAAGGTTTTTTTTTTTATATGTATTAAATCAATTTATCACTG
TTTAAAGCTTTGAATATCTGCAATCTTTGCCAAGGTACTTTTTTATTTAAAAA
AAAACATAACTTTGTAAATATTACCCTGTAATATTATATATACTTAATAAAA
CATTTTAAGCTA(SEQ ID NO: 13)

(continuación)

Isoforma 3 de aminoácidos CD47 humano (XP_005247965.1)

MWPLVAALLLGSACCGSAQLLFNKT̄KSVEFTFCNDTVVIPCFVTNMEAQNT
 TEVYVKWKF~~KGRDIYTFD~~GALNKSTVPTDFSSAKIEVSQLLKGDASLKMDK
 SDAVSHGTGNYTCEVTELTREGETHIELKYRVVSWFSPNENILIVIFPIFAILFW
 GQFGIKTLKYRSGGMDEKTIALLVAGLVITVIVIVGAILFVPGEYSLKNATGLGLI
 VTSTGILILLHYVVFSTAIGLTSFVIAILVIQVIAYLAVVGLSLCIAACIPMHGPLLI
 SGLSILALAQLLGLVYMKFV~~ASNQKTIQPPRKAVEEPLNE~~(SEQ ID NO: 14)

Isoforma 4 del ARNm de CD47 humano (NM_001777.3)

GGGGAGCAGGCGGGGGAGCGGGCGGGAAGCAGTGGGAGCGCGCGTGCGCG
 CGGCCGTGCAGCCTGGGCAGTGGGTCTGCCTGTGACGCGCGGCGGGCGGT
 GGTCTCTGCCTGTAAACGGCGGCGGGCGGCTGCTGCTCCAGACACCTGCGGCGG
 CGGCGGCGACCCCGCGGCGGGCGCGGAGATGTGGCCCCTGGTAGCGGCG
CTGTTGCTGGGCTCGGCGTGCTGCGGATCAGCTCAGCTACTATTTAATA
AAACAAAATCTGTAGAATTCACGTTTTGTAATGACACTGTCTCGTCATTCC
ATGCTTTGTTACTAATATGGAGGCACAAAACACTACTGAAGTATACGTA
AAGTGGAATTTAAAGGAAGAGATATTTACACCTTTGATGGAGCTCTAA
ACAAGTCCACTGTCCCCACTGACTTTAGTAGTGCAAAAATTGAAGTCTC
ACAATTACTAAAAGGAGATGCCTCTTTGAAGATGGATAAGAGTGATGCT
GTCTCACACACAGGAACTACACTTGTGAAGTAACAGAATTAACCAGAG
AAGGTGAAACGATCATCGAGCTAAAATATCGTGTTGTTTCATGGTTTTTC
 TCCAAATGAAAATATTCTTATTGTTATTTTCCCAATTTTGTCTATACTCC
 TGTTCTGGGGACAGTTTGGTATTA~~AAAACACTTAAATATAGATCCGGTGG~~
TATGGATGAGAAAACAATTGCTTTACTTGTGCTGGACTAGTGATCACT
GTCATTGTCATTGTTGGAGCCATTCTTTTCGTCCCAGGTGAATATTCATT
 AAAGAATGCTACTGGCCTTGGTTTAATTGTGACTTCTACAGGGATATTA
 ATATTACTTCACTACTATGTGTTTAGTACAGCGATTGGATTAACCTCCTT
CGTCATTGCCATATTGGTTATTCAGGTGATAGCCTATATCCTCGCTGTG
GTTGGACTGAGTCTCTGTATTGCGGCGTGATACCAATGCATGGCCCTC
 TTCTGATTTTCAGGTTTGAGTATCTTAGCTCTAGCACAACTACTTGGACTA
 GTTTATATGAAATTTGTGGCTTCCAATCAGAAGACTATACAACCTCCTA
GGAAAGCTGTAGAGGAACCCCTTAATGCATTCAAAGAATCAAAGGAAT
GATGAATGATGAATAACTGAAGTGAAGTGATGGACTCCGATTGGAGAGT
 AGTAAGACGTGAAAGGAATACACTTGTGTTTAAGCACCATGGCCTTGATGA
 TTCACTGTTGGGGAGAAGAAACAAGAAAAGTAAGTGGTTGTCACCTATGAG
 ACCCTTACGTGATTGTTAGTTAAGTTTTTATTCAAAGCAGCTGTAATTTAGTT
 AATAAAATAATTATGATCTATGTTGTTTGCCCAATTGAGATCCAGTTTTTGT
 TGTTATTTTTAATCAATTAGGGGCAATAGTAGAATGGACAATTTCCAAGAAT
 GATGCCTTTCAGGTCCTAGGGCCTCTGGCCTCTAGGTAACCAGTTTAAATTG
 GTTCAGGGTGATACTACTTAGCACTGCCCTGGTGATTACCCAGAGATATCT
 ATGAAAACCAGTGGCTTCCATCAAACCTTTGCCAACTCAGGTTACAGCAGC

(continuación)

TTTGGGCAGTTATGGCAGTATGGCATTAGCTGAGAGGTGTCTGCCACTTCTG
 GGTCAATGGAATAATAAATTAAGTACAGGCAGGAATTTGGTTGGGAGCATC
 TTGTATGATCTCCGTATGATGTGATATTGATGGAGATAGTGGTCCTCATTCTT
 GGGGGTTGCCATTCCCACATTCCTTCAACAAACAGTGTAACAGGTCCCTT
 CCCAGATTTAGGGTACTTTTATTGATGGATATGTTTTCTTTTATTACATAA
 CCCCTTGAAACCTGTCTTGTCCCTCCTGTTACTTGCTTCTGCTGTACAAGATG
 TAGCACCTTTTCTCCTCTTTGAACATGGTCTAGTGACACGGTAGCACCAGTT
 GCAGGAAGGAGCCAGACTTGTTCTCAGAGCACTGTGTTACACTTTTCAGCA
 AAAATAGCTATGGTTGTAACATATGTATTCCCTTCCTCTGATTTGAAGGCAA
 AAATCTACAGTGTTTCTTCACTTCTTTTCTGATCTGGGGCATGAAAAAAGCA
 AGATTGAAATTTGAACTATGAGTCTCCTGCATGGCAACAAAATGTGTGTAC
 CATCAGGCCAACAGGCCAGCCCTTGAATGGGGATTTATTACTGTTGTATCTA
 TGGTTCATGATAAACATTCATCACCTTCCTCCTGTAGTCCTGCCTCGTACTCC
 CCTTCCCCTATGATTGAAAAGTAAACAAAACCCACATTTCTATCCTGGTTA
 GAGCAAAATTAATTGTTCTGACAGTTGTGATCGCCTGGAGTACTTTTAGACTT
 TTAGCATTCTGTTTTTACCTGTTTGTGGATGTGTGTTTGTATGTGCATACGTA
 TGAGATAGGCACATGCATCTTCTGTATGGACAAAGGTGGGGTACCTACAGG
 AGAGCAAAGGTAAATTTTGTGCTTTTAGTAAAAACATTTAAATACAAAGTTC
 TTTATTGGGTGGAATTATATTTGATGCAAATATTTGATCACTTAAAACTTTTA
 AAACCTTCTAGGTAAATTTGCCACGCTTTTGGACTGCTCACCAATACCCTGTAA
 AAATACGTAATTCTTCCTGTTTGTGTAATAAGATATTCATATTTGTAGTTGCA
 TTAATAATAGTTATTTCTTAGTCCATCAGATGTTCCCGTGTGCCTCTTTTATG
 CCAAATTGATTGTCATATTTTCATGTTGGGACCAAGTAGTTTGCCCATGGCAA
 ACCTAAATTTATGACCTGCTGAGGCCTCTCAGAAAACCTGAGCATACTAGCAA
 GACAGCTCTTCTTGAAAAAATAATATGTATACACAAATATATACGTATATC
 TATATATACGTATGTATATACACACATGTATATTCTTCCTTGATTGTGTAGCT
 GTCCAAAATAATAACATATATAGAGGGAGCTGTATTCTTTATACAAATCTG
 ATGGCTCCTGCAGCACTTTTTCTTCTGAAAATATTTACATTTTGCTAACCTA
 GTTTGTTACTTTAAAAATCAGTTTTTGATGAAAGGAGGGAAAAAGCAGATGGA
 CTTGAAAAAGATCCAAGCTCCTATTAGAAAAGGTATGAAAATCTTTATAGTA
 AAATTTTTTATAAACTAAAGTTGTACCTTTTAATATGTAGTAAACTCTCATTT
 ATTTGGGGTTCGCTCTTGGATCTCATCCATCCATTGTGTTCTCTTTAATGCTG
 CCTGCCTTTTGAGGCATTCACTGCCCTAGACAATGCCACCAGAGATAGTGGG
 GGAAATGCCAGATGAAACCAACTCTTGCTCTCACTAGTTGTCAGCTTCTCTG
 GATAAGTGACCACAGAAGCAGGAGTCCTCCTGCTTGGGCATCATTGGGCCA
 GTTCCTTCTCTTTAAATCAGATTTGTAATGGCTCCCAAATTCCATCACATCAC
 ATTTAAATTGCAGACAGTGTTTTGCACATCATGTATCTGTTTTGTCCCATAAT
 ATGCTTTTTACTCCCTGATCCCAGTTTCTGCTGTTGACTCTTCCATTCAAGTTT
 ATTTATTGTGTGTTCTCACAGTGACACCATTTGTCCTTTTCTGCAACAACCTT
 TCCAGCTACTTTTGCCAAATTCTATTTGTCTTCTCCTTCAAACATTCTCCTTT
 GCAGTTCCTCTTCATCTGTGTAGCTGCTCTTTTGTCTCTTAACTTACCATTCTT
 ATAGTACTTTATGCATCTCTGCTTAGTTCTATTAGTTTTTTGGCCTTGCTCTTC
 TCCTTGATTTTAAATTCCTTCTATAGCTAGAGCTTTTCTTTCTTTCATTCTCT
 CTTCTGCAAGTGTGTTTGCATACATCAGAAGCTAGGTACATAAGTTAAATGAT
 TGAGAGTTGGCTGTATTTAGATTTATCACTTTTTAATAGGGTGAGCTTGAGA
 GTTTTCTTTCTTCTGTTTTTTTTTTTTTGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT
 TTTTGACTAATTTACATGCTCTAAAAACCTTCAAAGGTGATTATTTTCTCC
 TGAAACTCCAGGTCCATTCTGTTTAAATCCCTAAGAATGTCAGAATTAATAA

(continuación)

TAACAGGGCTATCCCGTAATTGGAAATATTTCTTTTTTCAGGATGCTATAGT
CAATTTAGTAAGTGACCACCAAATTGTTATTTGCACTAACAAAGCTCAAAAC
ACGATAAGTTTACTCCTCCATCTCAGTAATAAAAAATTAAGCTGTAATCAACC
TTCTAGGTTTCTCTTGTCTTAAATGGGTATTCAAAAATGGGGATCTGTGGT
GTATGTATGGAAACACATACTCCTTAATTTACCTGTTGTTGGAAACTGGAGA
AATGATTGTCGGGCAACCGTTTATTTTTATTGTATTTTATTGTTGAGGGA
TTTTTTTATAAACAGTTTACTTGTGTCATATTTTAAAATTACTAACTGCCAT
CACCTGCTGGGGTCCTTTGTTAGGTCATTTTCAGTGACTAATAGGGATAATC
CAGGTAACTTTGAAGAGATGAGCAGTGAGTGACCAGGCAGTTTTTCTGCCTT
TAGCTTTGACAGTTCTTAATTAAGATCATTGAAGACCAGCTTTCTCATAAAT
TTCTCTTTTTGAAAAAAGAAAGCATTGTACTAAGCTCCTCTGTAAGACAA
CATCTTAAATCTTAAAGTGTTGTTATCATGACTGGTGAGAGAAGAAAACAT
TTTGTTTTTATTAAATGGAGCATTATTTACAAAAAGCCATTGTTGAGAATTA
GATCCACATCGTATAAATATCTATTAACCATCTAAATAAAGAGAACTCCA
GTGTTGCTATGTGCAAGATCCTCTCTTGGAGCTTTTTTGCATAGCAATTA
GGTGTGCTATTTGTCAGTAGCCATTTTTTGCAGTGATTTGAAGACCAAAGT
TGTTTTACAGCTGTGTTACCGTTAAAGGTTTTTTTTTTATATGTATTAAATC
AATTTATCACTGTTTAAAGCTTTGAATATCTGCAATCTTTGCCAAGGTA
TTTATTTAAAAAAAACATAACTTTGTAAATATTACCCTGTAATATTATATAT
ACTTAATAAAACATTTTAAAGCTATTTTGTGGGCTATTTCTATTGCTGCTACA
GCAGACCACAAGCACATTTCTGAAAAATTTAATTTATTAATGTATTTTAAAG
TTGCTTATATTCTAGGTAACAATGTAAAGAATGATTTAAAAATATTAATTATG
AATTTTTTGAGTATAATACCCAATAAGCTTTTAATTAGAGCAGAGTTTAAAT
AAAAGTTTTAAATCAGTC(SEQ ID NO: 15)

Isoforma 4 de aminoácidos CD47 humano (NP_001768.1)

MWPLVAALLLGSACCGSAQLLFNKTKSVEFTFCNDTVVIPCFVTNMEAQNT
TEVYVKWKFKGRDIYTFD~~GAL~~NKSTVPTDFSSAKIEVSQLLKGDASLKMDK
SDAVSHTGNYTCEVTELTREGETHIELKYRVVSWFSPNENILIVIFPIFAILFW
GQFGIKTLKYRSGGMDEKTIALLVAGLVITVIVIVGAILFVPGEYSLKNATGLGLI
VTSTGILILLHYVVFSTAIGLTSFVIALVIQVIAYILAVVGLSLCIAACIPMHGPLLI
SGLSILALAQLLGLVYMKFVASNQTIQPPRKAVEEPLNAFKESKGMNDE(SEQ
ID NO: 16)

Isoforma 1 de aminoácidos de CD47 humanizado

MWPLAAALLLGSACCGSAQLLFNKTKSVEFTFCNDTVVIPCFVTNMEAQNT
TEVYVKWKFKGRDIYTFD~~GAL~~NKSTVPTDFSSAKIEVSQLLKGDASLKMDK
SDAVSHTGNYTCEVTELTREGETHIELKYRVVSWFSPNENILIVIFPIFAILFW
WGQFGIKTLKYRSGGMDEKTIALLVAGLVITVIVIVGAILFVPGEYSLKNAT
GLGLIVTSTGILILLHYVVFSTAIGLTSFVIALVIQVIAYILAVVGLSLCIAACI
PMHGPLLISGLSILALAQLLGLVYMKFV(SEQ ID NO: 17)

Isoforma 2 de aminoácidos de CD47 humanizado

MWPLAAALLLGSACCGSAQLLFNKTKSVEFTFCNDTVVIPCFVTNMEAQNT
TEVYVKWKFKGRDIYTFD~~GAL~~NKSTVPTDFSSAKIEVSQLLKGDASLKMDK
SDAVSHTGNYTCEVTELTREGETHIELKYRVVSWFSPNENILIVIFPIFAILFW
WGQFGIKTLKYRSGGMDEKTIALLVAGLVITVIVIVGAILFVPGEYSLKNAT
GLGLIVTSTGILILLHYVVFSTAIGLTSFVIALVIQVIAYILAVVGLSLCIAACI

PMHGPLLISGLSILALAQLLGLVYMKFVASNQRTIQPPRNR(SEQ ID NO: 18)

(continuación)

Isoforma 3 de aminoácidos de CD47 humanizado

MWPLAAALLLGSCCCGSAQLLFNKTKSVEFTFCNDTVVIPCFVTNMEAQNT
 TEVYVKWKFKGRDIYTFDGALNKSTVPTDFSSAKIEVSQLLKGDASLKMDK
 SDAVSHTGNYTCEVTELTREGETHIELKYRVVSWFSPNENILIVIFPIFAILLF
 WGQFGIKTLKYRSGGMDEKTIALLVAGLVITVIVIVGAILFVPGEYSLKNAT
 GLGLIVTSTGILILLHYVVFSTAIGLTSFVIAILVIQVIAIYILAVVGLSLCIAACI
 PMHGPLLISGLSILALAQLLGLVYMKFVASNQRTIQPPRKAVEEPLNE (SEQ ID
 NO: 19)

Isoforma 4 de aminoácidos de CD47 humanizado

MWPLAAALLLGSCCCGSAQLLFNKTKSVEFTFCNDTVVIPCFVTNMEAQNT
 TEVYVKWKFKGRDIYTFDGALNKSTVPTDFSSAKIEVSQLLKGDASLKMDK
 SDAVSHTGNYTCEVTELTREGETHIELKYRVVSWFSPNENILIVIFPIFAILLF
 WGQFGIKTLKYRSGGMDEKTIALLVAGLVITVIVIVGAILFVPGEYSLKNAT
 GLGLIVTSTGILILLHYVVFSTAIGLTSFVIAILVIQVIAIYILAVVGLSLCIAACI
 PMHGPLLISGLSILALAQLLGLVYMKFVASNQRTIQPPRKAVEEPLNAFKESKG
 MMNDE (SEQ ID NO: 20)

Roedores con CD47 humanizado

- 5 En el presente documento se describen roedores que expresan proteínas CD47 humanizadas en la superficie de las células de los roedores como resultado de una modificación genética de un locus endógeno del roedor que codifica una proteína CD47. Los ejemplos adecuados descritos en el presente documento incluyen, en particular, ratones.

- 10 Un gen *CD47* humanizado comprende material genético de una especie heteróloga (seres humanos), en donde el gen *CD47* humanizado codifica una proteína CD47 que comprende la parte codificada del material genético de la especie heteróloga. Un gen *CD47* humanizado descrito en el presente documento comprende ADN genómico de una especie heteróloga que codifica a la parte extracelular de una proteína CD47 que se expresa en la membrana plasmática de una célula. Un gen *CD47* humanizado descrito en el presente documento comprende ADN genómico de un ser humano que codifica el dominio extracelular y los dominios transmembrana de una proteína CD47 que se expresa en la membrana plasmática de una célula. De acuerdo con la invención, un gen *CD47* humanizado codifica un polipéptido
 15 *CD47* humanizado que comprende una parte de un polipéptido *CD47* humano y una parte intracelular de un polipéptido *CD47* de roedor, en donde la parte del polipéptido *CD47* humano comprende el dominio extracelular y los dominios transmembrana del polipéptido *CD47* humano, y está codificada por los exones 2 a 7 de un gen *CD47* humano, y en donde la parte intracelular del polipéptido *CD47* de roedor está codificada por el exones cadena abajo del exón 7 de un gen *CD47* de roedor. También se proporcionan roedores, embriones, células y construcciones de direccionamiento
 20 para fabricar roedores, embriones de roedores y células que contienen dicho gen *CD47* humanizado.

- 25 Se puede eliminar un gen *CD47* endógeno. Se puede alterar un gen *CD47* endógeno, en donde una parte del gen *CD47* endógeno se reemplaza con una secuencia heteróloga (Todo o sustancialmente todo un gen *CD47* endógeno se puede reemplazar con un gen heterólogo). Una parte de un gen *CD47* humano se puede insertar en un gen *CD47* endógeno de roedor en un locus *CD47* endógeno para formar un gen *CD47* humanizado de acuerdo con la invención. La modificación o humanización puede realizarse en una de las dos copias del gen *CD47* endógeno, dando lugar a un roedor heterocigoto respecto al gen *CD47* humanizado. Se puede proporcionar un roedor que sea homocigoto para un gen *CD47* humanizado.

- 30 Un roedor descrito en el presente documento puede contener un gen *CD47* humanizado de acuerdo con la invención en un locus *CD47* endógeno de roedor. Por tanto, se puede describir que dichos roedores tienen un gen *CD47* heterólogo. El gen *CD47* reemplazado, insertado, modificado o alterado en el locus *CD47* endógeno se puede detectar mediante una variedad de métodos que incluyen, por ejemplo, PCR, transferencia de Western, transferencia de Southern, polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) o un ensayo de ganancia o pérdida de alelo.
 35 El roedor puede ser heterocigoto con respecto al gen *CD47* humanizado. El roedor puede ser homocigoto para el gen *CD47* humanizado.

- 40 Un gen *CD47* humanizado descrito en el presente documento incluye un gen *CD47* que tiene un segundo, tercer, cuarto, quinto, sexto y séptimo exón humano, cada uno de los cuales puede tener una secuencia al menos un 50 % (por ejemplo, un 50 %, un 55 %, un 60 %, un 65 %, un 70 %, un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o más) idéntica a un segundo, tercer, cuarto, quinto,

sexto y séptimo exón que aparecen en un gen *CD47* humano de la tabla 3.

Un gen *CD47* humanizado descrito en el presente documento incluye un gen *CD47* que tiene un primer exón y exón(es) cadena abajo del exón 7 (por ejemplo, exones octavo y noveno de la isoforma 2), cada uno de los cuales puede tener una secuencia al menos un 50 % (por ejemplo, un 50 %, un 55 %, un 60 %, un 65 %, un 70 %, un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o más) idéntica a un exón respectivo que aparece en un gen *CD47* de ratón de la tabla 3.

Un gen *CD47* humanizado descrito en el presente documento puede incluir un gen *CD47* que tiene una región no traducida en 5' y una región no traducida en 3', cada una de las cuales tiene una secuencia al menos un 50 % (por ejemplo, un 50 %, un 55 %, un 60 %, un 65 %, un 70 %, un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o más) idéntica a una región no traducida en 5' y una región no traducida en 3' que aparecen en un gen *CD47* de ratón de la tabla 3.

Un gen *CD47* humanizado descrito en el presente documento puede incluir un gen *CD47* que tiene una secuencia codificante de nucleótidos (por ejemplo, una secuencia de ADNc) al menos un 50 % (por ejemplo, un 50 %, un 55 %, un 60 %, un 65 %, un 70 %, un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o más) idéntica a una secuencia codificante de nucleótidos que aparece en una secuencia codificante de nucleótidos *CD47* humana de la tabla 3.

Una proteína *CD47* humanizada producida por un roedor de la presente invención puede tener una parte extracelular humana que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos un 50 % (por ejemplo, un 50 %, un 55 %, un 60 %, un 65 %, un 70 %, un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o más) idéntica a una parte extracelular de una proteína *CD47* humana que aparece en la tabla 3.

Una proteína *CD47* humanizada producida por un roedor de la presente invención puede tener una parte extracelular que tiene una secuencia de aminoácidos que es idéntica a los restos de aminoácidos 19 a 141 que aparecen en una proteína *CD47* humana de la tabla 3.

Una proteína *CD47* humanizada producida por un roedor de la presente invención puede tener un dominio V de inmunoglobulina aminoterminal que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos un 50 % (por ejemplo, un 50 %, un 55 %, un 60 %, un 65 %, un 70 %, un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o más) idéntica a un dominio V de inmunoglobulina aminoterminal de una proteína *CD47* humana que aparece en la tabla 3.

Una proteína *CD47* humanizada producida por un roedor de la presente invención puede tener un dominio V de inmunoglobulina aminoterminal que tiene una secuencia de aminoácidos que es idéntica a los restos de aminoácidos 19 a 127 que aparecen en una proteína *CD47* humana de la tabla 3.

Una proteína *CD47* humanizada producida por un roedor de la presente invención puede tener un dominio V de inmunoglobulina aminoterminal y cinco dominios transmembrana, cada uno de los cuales tiene una secuencia que es al menos un 50 % (por ejemplo, un 50 %, un 55 %, un 60 %, un 65 %, un 70 %, un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o más) idéntica a un dominio V de inmunoglobulina aminoterminal y cinco dominios transmembrana de una proteína *CD47* humana que aparece en la tabla 3.

Una proteína *CD47* humanizada producida por un roedor de la presente invención puede tener una cola intracitoplasmática que tiene una secuencia que es al menos un 50 % (por ejemplo, un 50 %, un 55 %, un 60 %, un 65 %, un 70 %, un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o más) idéntica a una cola intracitoplasmática de una proteína *CD47* de ratón que aparece en la tabla 3.

Una proteína *CD47* humanizada producida por un roedor de la presente invención puede tener una secuencia de aminoácidos que es al menos un 50 % (por ejemplo, un 50 %, un 55 %, un 60 %, un 65 %, un 70 %, un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o más) idéntica a los restos de aminoácidos 16 a 292 que aparecen en una proteína *CD47* humana de la tabla 3.

Una proteína *CD47* humanizada producida por un roedor de la presente invención puede tener una secuencia de aminoácidos que es al menos un 50 % (por ejemplo, un 50 %, un 55 %, un 60 %, un 65 %, un 70 %, un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o más) idéntica a los restos de aminoácidos 19 a 292 que aparecen en una proteína *CD47* humana de la tabla 3.

Una proteína *CD47* humanizada producida por un roedor de la presente invención puede tener una secuencia de aminoácidos que es idéntica a los restos de aminoácidos 19 a 292 (o 16 a 292) que aparecen en una proteína *CD47* humana de la tabla 3.

Una proteína CD47 humanizada producida por un roedor de la presente invención puede tener una secuencia de aminoácidos que es al menos un 50 % (por ejemplo, un 50 %, un 55 %, un 60 %, un 65 %, un 70 %, un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o más) idéntica a una secuencia de aminoácidos de una proteína CD47 humanizada que aparece en la tabla 3.

Una proteína CD47 humanizada producida por un roedor de la presente invención puede tener una secuencia de aminoácidos que es idéntica a una secuencia de aminoácidos de una proteína CD47 humanizada que aparece en la tabla 3.

Se describen composiciones y métodos para fabricar roedores que expresen una proteína CD47 humanizada, incluidas formas polimórficas específicas, variantes alélicas (por ejemplo, diferencias de aminoácidos individuales) o, de manera alternativa, isoformas empalmadas, incluidas composiciones y métodos para producir roedores que expresen dichas proteínas a partir de un promotor humano y una secuencia reguladora humana. También se describen composiciones y métodos para producir roedores que expresen dichas proteínas a partir de un promotor endógeno y una secuencia reguladora endógena. Los métodos incluyen insertar el material genético que codifica una parte de una proteína CD47 humana que comprende al menos el dominio extracelular y los dominios transmembrana de la proteína CD47 humana en una ubicación precisa en el genoma de un roedor que corresponde a un gen *CD47* endógeno, creando así un gen *CD47* humanizado que expresa una proteína CD47 humanizada que comprende al menos el dominio extracelular y los dominios transmembrana de la proteína CD47 humana, y una parte intracelular de un polipéptido CD47 de roedor. Los métodos incluyen insertar ADN genómico correspondiente a los exones 2 a 7 de un gen *CD47* humano en un gen *CD47* endógeno del roedor creando así un gen humanizado que codifica una proteína CD47 que contiene una parte humana que contiene aminoácidos codificados por los exones insertados y que comprende al menos el dominio extracelular y los dominios transmembrana de la proteína CD47 humana.

Cuando sea adecuado, la región codificante del material genético o secuencia(s) de polinucleótidos que codifican una parte de la proteína CD47 humana que comprende al menos el dominio extracelular y los dominios transmembrana de la proteína CD47 humana pueden modificarse para incluir codones que están optimizados para la expresión en el roedor (por ejemplo, véanse las patentes de Estados Unidos n.º 5.670.356 y 5.874.304). Las secuencias con codones optimizados son secuencias sintéticas y preferentemente codifican el polipéptido idéntico (o un fragmento biológicamente activo de un polipéptido de longitud completa que tiene sustancialmente la misma actividad que el polipéptido de longitud completa) codificado por el polinucleótido precursor sin codones optimizados. La región codificante del material genético que codifica una parte de una proteína CD47 humana que comprende al menos el dominio extracelular y los dominios transmembrana de la proteína CD47 humana puede incluir una secuencia alterada para optimizar el uso de codones para un tipo de célula particular (una célula de roedor). Por ejemplo, los codones del ADN genómico correspondientes a los exones 2 a 7 de un gen *CD47* humano a insertar en un gen *CD47* endógeno de un roedor pueden optimizarse para su expresión en una célula del roedor. Tal secuencia puede describirse como una secuencia con codones optimizados.

Un enfoque del gen *CD47* humanizado emplea una modificación relativamente mínima del gen endógeno y da como resultado una transducción de señales natural mediada por CD47 en el roedor, porque la secuencia genómica de las secuencias CD47 se modifica en un solo fragmento y, por lo tanto, conserva la funcionalidad normal al incluir las secuencias reguladoras necesarias. Por tanto, en dichos casos, la modificación del gen *CD47* no afecta a otros genes circundantes ni a otros genes endógenos que interactúan con CD47 (por ejemplo, trombospodina, SIRP, integrinas, etc.). Además, la modificación no afecta el ensamblaje de una proteína transmembrana CD47 funcional en la membrana plasmática y mantiene funciones efectoras normales mediante la unión y la posterior transducción de señales a través de la parte citoplasmática de la proteína que no se ve afectada por la modificación.

En la figura 1 se proporciona una ilustración esquemática (no a escala) de la organización genómica de un gen *CD47* murino endógeno y un gen *CD47* humano. En la figura 2 se proporciona un método ilustrativo para humanizar un gen *CD47* murino endógeno utilizando un fragmento genómico que contiene los exones 2 a 7 de un gen *CD47* humano. Como se ilustra, el ADN genómico que contiene los exones 2 a 7 de un gen *CD47* humano se inserta en un locus del gen *CD47* murino endógeno mediante una construcción de direccionamiento. Este ADN genómico incluye la parte del gen que codifica una parte extracelular y los dominios transmembrana (por ejemplo, los restos de aminoácidos 16 a 292) de una proteína CD47 humana responsable de la unión al ligando.

Un roedor (por ejemplo, un ratón) que tiene un gen *CD47* humanizado en el locus *CD47* endógeno se puede preparar mediante cualquier método conocido en la materia. Por ejemplo, se puede crear un vector de direccionamiento que introduzca una parte de un gen *CD47* humano con un casete de selección de fármacos. En la figura 2 se ilustra un locus *CD47* endógeno de un genoma de ratón que comprende una inserción de los exones 2 a 7 de un gen *CD47* humano. Como se ilustra, la construcción de direccionamiento contiene un brazo de homología en 5' que contiene la secuencia cadena arriba del exón 2 de un gen *CD47* murino endógeno (~39 Kb), seguido de un fragmento de ADN genómico que contiene los exones 2 a 7 de un gen *CD47* humano (-23,9 Kb), un casete de selección de fármacos (por ejemplo, un gen de resistencia a neomicina flanqueado en ambos lados por secuencias loxP; ~5 Kb) y un brazo de homología en 3' que contiene la secuencia cadena abajo del exón 7 de un gen *CD47* murino endógeno (~99 Kb). La construcción de direccionamiento contiene un casete de selección de fármacos que se autoelimina (por ejemplo, un

gen de resistencia a la neomicina flanqueado por las secuencias *loxP*; véanse las patentes de Estados Unidos n.º 8.697.851, 8.518.392 y 8.354.389). Tras la recombinación homóloga, los exones 2 a 7 de un gen *CD47* murino endógeno se reemplazan por la secuencia contenida en el vector de direccionamiento (es decir, los exones 2 a 7 de un gen *CD47* humano). Se crea un gen *CD47* humanizado que da como resultado una célula o animal no humano que expresa una proteína *CD47* humanizada que contiene aminoácidos codificados por los exones 2 a 7 de un gen *CD47* humano. El casete de selección de fármacos se retira en función del desarrollo, es decir, la progenie procedente de ratones cuyas células de la estirpe germinal contienen el gen *CD47* humanizado descrito anteriormente eliminarán el marcador seleccionable de las células diferenciadas durante el desarrollo.

Los roedores de la presente invención se pueden preparar como se describe anteriormente, o mediante métodos conocidos en la materia, para que comprendan genes humanos o humanizados adicionales, con frecuencia dependiendo del uso previsto del roedor. Se puede introducir material genético de dichos genes humanos o humanizados adicionales mediante la alteración adicional del genoma de las células (por ejemplo, células madre embrionarias) que tienen las modificaciones genéticas como se ha descrito anteriormente o mediante técnicas de reproducción conocidas en la materia con otras cepas modificadas genéticamente según se desee. Los roedores de la presente invención se preparan para comprender además uno o más genes humanos o humanizados seleccionados de SIRPα (CD172a), IL-3, M-CSF, GM-CSF y TPO. Los roedores de la presente invención se pueden preparar mediante la introducción de un vector de direccionamiento, como se describe en el presente documento, en una célula de una cepa modificada. Por poner solo un ejemplo, un vector de direccionamiento, tal como se ha descrito anteriormente, pueden introducirse en un ratón con deficiencia de Rag2 y de IL-2Ry e incluir cuatro citocinas humanas (Rag2^{-/-}IL2Ry^{-/-}; M-CSF^{Hu}; IL-3/GM-CSF^{Hu}; hSIRPα^{tg}; TPO^{Hu}). Los roedores de la presente invención pueden prepararse para que comprendan además un gen de la proteína alfa reguladora de señales (SIRPα) humana o humanizada. Los roedores de la presente invención comprenden un gen *CD47* humanizado, como se describe en el presente documento, y material genético de una especie heteróloga (seres humanos), en donde el material genético codifica una o más proteínas heterólogas seleccionadas de SIRPα (CD172a), IL-3, M-CSF, GM-CSF y TPO. Los roedores de la presente invención pueden comprender un gen *CD47* humanizado como se describe en el presente documento y material genético de una especie heteróloga (seres humanos), en donde el material genético puede codificar una proteína SIRPα (CD172a) heteróloga (humana). Los roedores de la presente invención pueden comprender además un gen *SIRPα* que comprende una parte endógena y una parte humana (por ejemplo, los exones 2 a 4 de un gen *SIRPα* humano), en donde la parte humana codifica el dominio extracelular de una proteína SIRPα (por ejemplo, los aminoácidos correspondientes a los restos 28 a 362 de una proteína SIRPα humana) y la parte endógena codifica el dominio intracelular de una proteína SIRPα endógena; la parte humana y la parte endógena pueden estar unidas operativamente a un promotor SIRPα endógeno.

Por ejemplo, como se describe en el presente documento, los roedores que comprenden un gen *CD47* humanizado pueden comprender además (por ejemplo, mediante cruzamiento o estrategias de selección de genes múltiples) una o más modificaciones como se describe en los documentos PCT/US2010/051339, presentado el 4 de octubre de 2010; PCT/US2013/058448, presentado el 6 de septiembre de 2013; PCT/US2013/045788, presentado el 14 de junio de 2013; PCT/US2014/056910, presentado el 23 de septiembre de 2014; PCT/US2014/060568, presentado el 15 de octubre de 2014; PCT/US2012/025040, presentado el 14 de febrero de 2014; PCT/US2012/062379, presentado el 29 de octubre de 2012; PCT/US2014/064806, presentado el 10 de noviembre de 2014; y PCT/US2014/064810, presentado el 10 de noviembre de 2014. Como se describe en el presente documento, un roedor que comprende un gen *CD47* humanizado (es decir, los exones 2 a 7 de un gen *CD47* humano unido operativamente al exón 1 y al exón 8 (y por tanto a cualquier exón cadena abajo) de un gen *CD47* de roedor endógeno de modo que el gen *CD47* humanizado codifica un polipéptido *CD47* que tiene el dominio extracelular y los dominios transmembrana de una proteína *CD47* humana y una parte intracelular de una proteína *CD47* de roedor) se puede cruzar con un roedor que comprende un gen *SIRPα* humanizado (por ejemplo, los exones 2 a 4 de un gen *SIRPα* humano unido operativamente a los exones 1 y 5 a 8 de un gen *SIRPα* endógeno de roedor de modo que el gen *SIRPα* humanizado codifica un polipéptido SIRPα que tiene una parte extracelular de una proteína SIRPα humana (por ejemplo, los aminoácidos correspondientes a los restos 28 a 362) y una parte intracelular de una proteína SIRPα de roedor; véase, por ejemplo, el documento PCT/US2014/056910, presentado el 23 de septiembre de 2014).

Aunque en el presente documento se analizan ampliamente realizaciones que emplean un gen *CD47* humanizado en un ratón (es decir, un ratón con un gen *CD47* que codifica una proteína *CD47* que incluye una parte humana y una parte de ratón), también se describen otros roedores que comprenden un gen *CD47* humanizado. Dichos roedores pueden comprender un gen *CD47* humanizado unido operativamente a un promotor *CD47* endógeno. Dichos roedores pueden expresar una proteína *CD47* humanizada a partir de un locus endógeno, en donde la proteína *CD47* humanizada comprende los restos de aminoácidos 16 a 292 (o 19 a 141 o 19 a 127) de una proteína *CD47* humana. Dichos roedores incluyen cualquiera de los que pueden modificarse genéticamente para expresar una proteína *CD47* como se divulga en el presente documento, que incluyen, por ejemplo, ratón, rata, etc. Por ejemplo, para aquellos roedores para los que no se dispone fácilmente de células ME genéticamente modificables adecuadas, se emplean otros métodos para producir un roedor que comprenda la modificación genética. Dichos métodos incluyen, por ejemplo, modificar un genoma de células no ME (por ejemplo, un fibroblasto o una célula pluripotente inducida) y emplear la transferencia nuclear de células somáticas (SCNT) para transferir el genoma modificado genéticamente a una célula adecuada, por ejemplo, un oocito enucleado, y gestar la célula modificada (por ejemplo, el oocito modificado) en un roedor en las condiciones adecuadas para formar un embrión.

Los métodos para modificar el genoma de un roedor incluyen, por ejemplo, emplear una nucleasa con dedos de zinc (ZFN) o una nucleasa efectora similar a un activador de la transcripción (TALEN) para modificar un genoma para incluir un gen *CD47* humanizado.

Un roedor de la presente invención se puede seleccionar de un ratón, una rata y un hámster. Un roedor de la presente invención se puede seleccionar de la superfamilia Muroidea. Un roedor genéticamente modificado de la presente invención puede ser de una familia seleccionada de Calomyscidae (por ejemplo, hámsteres similares a ratones), Cricetidae (por ejemplo, hámster, ratas y ratones del Nuevo Mundo, campañoles), Muridae (ratones y ratas verdaderos, jerbos, ratones espinosos, ratas con cresta), Nesomyidae (ratones trepadores, ratones de abazón de las rocas, ratas coliblanco, ratas y ratones de Madagascar), Platanthomyidae (por ejemplo, lirón espinoso) y Spalacidae (por ejemplo, ratas topo, ratas del bambú y zokores). Un roedor genéticamente modificado de la presente invención se puede seleccionar de un ratón o rata auténtico (familia Muridae), un jerbo, un ratón espinoso y una rata con cresta. Un ratón genéticamente modificado de la presente invención puede ser un miembro de la familia Muridae. En una realización, el roedor de la presente invención se selecciona de un ratón y una rata. En una realización, un roedor de la presente invención es un ratón.

Un roedor de la presente invención puede ser un ratón de una cepa C57BL seleccionado de C57BL/A, C57BL/An, C57BL/GrFa, C57BL/KaLwN, C57BL/6, C57BL/6J, C57BL/6ByJ, C57BL/6NJ, C57BL/10, C57BL/10ScSn, C57BL/10Cr y C57BL/Ola. Un ratón de la presente invención puede ser de una cepa 129 seleccionada del grupo que consiste en una cepa que es 129P1, 129P2, 129P3, 129X1, 129S1 (por ejemplo, 129S1/SV, 129S1/SvIm), 129S2, 129S4, 129S5, 129S9/SvEvH, 129/SvJae, 129S6 (129/SvEvTac), 129S7, 129S8, 129T1, 129T2 (véase, por ejemplo, Festing *et al.*, 1999, Mammalian Genome 10:836; Auerbach, W. *et al.*, 2000, Biotechniques 29(5): 1024-1028, 1030, 1032). Un ratón genéticamente modificado de la presente invención puede ser una mezcla de una cepa 129 antes mencionada y una cepa C57BL/6 antes mencionada. Un ratón de la presente invención puede ser una mezcla de las cepas 129 antes mencionadas, o una mezcla de las cepas BL/6 antes mencionadas. Una cepa 129 de la mezcla como se describe en el presente documento puede ser una cepa 129S6 (129/SvEvTac). Un ratón de la presente invención puede ser de una cepa BALB, por ejemplo, cepa BALB/c. Un ratón de la presente invención puede ser una mezcla de una cepa BALB y otra cepa antes mencionada.

En una realización, un roedor de la presente invención es una rata. Una rata de la presente invención puede seleccionarse de una rata Wistar, una cepa LEA, una cepa Sprague Dawley, una cepa Fischer, F344, F6 y Dark Agouti. Una cepa de rata como se describe en el presente documento puede ser una mezcla de dos o más cepas seleccionadas del grupo que consiste en Wistar, LEA, Sprague Dawley, Fischer, F344, F6 y Dark Agouti.

Métodos que emplean roedores que tienen genes *CD47* humanizados

Se han descrito células y animales no humanos transgénicos y mutantes *CD47* (por ejemplo, cerdos miniatura) (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. y 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). Dichos animales se han empleado en una variedad de ensayos para determinar, por ejemplo, los aspectos moleculares de la expresión, función y regulación de *CD47*. Se han descubierto diferencias considerables entre especies. De hecho, los ratones diabéticos no obesos/inmunodeficientes combinados graves (NOD/SCID) expresan una proteína SIRPα que es capaz de interactuar con *CD47* humana y, por lo tanto, se han utilizado ampliamente para el desarrollo de modelos de ratón con componentes del sistema inmunitario humano (por ejemplo, véase Takenaka, K. *et al.* (2007) Nat. Immunol. 8(12):1313-1323). El alelo SIRPα presente en estos ratones no es representativo del alelo SIRPα presente en otras cepas de ratones y, en general, hay poca reacción cruzada entre *CD47* y SIRPα entre especies. Además, se ha informado que *CD47* en células de ratón tiene una movilidad casi completa, mientras que *CD47* en células humanas demuestra sólo aproximadamente de un 30 a un 40 % (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). Por tanto, los ratones NOD/SCID no están exentos de limitaciones. Por ejemplo, aunque el desarrollo hematopoyético humano de múltiples linajes puede respaldarse en algunos orígenes genéticos (por ejemplo, BALB/c Rag2^{-/-}IL-2Rγc^{-/-}), la homeostasis de otros tipos de células sigue siendo ineficaz (por ejemplo, linfocitos T y células NK; véanse, por ejemplo, Gimeno, R. *et al.* (2004) Blood 104:3886-3893; Traggiai, E. *et al.* (2004) Science 304:104-107; Legrand, N. *et al.* (2006) Blood 108:238-245). Además, también se sabe que *CD47* interactúa con otras proteínas de la superficie celular y proporciona señalización bidireccional. Por tanto, los ratones existentes representan un sistema *in vivo* ineficaz para dilucidar funciones dependientes de *CD47* en diversos procesos biológicos, tales como, por ejemplo, injerto y fagocitosis. Además, los ratones existentes representan un sistema *in vivo* subóptimo para el desarrollo de terapias dirigidas a *CD47*.

Los roedores de la presente invención proporcionan un sistema *in vivo* mejorado y una fuente de materiales biológicos

(por ejemplo, células) que expresan CD47 humano que son útiles para una variedad de ensayos. Los roedores de la presente invención pueden utilizarse para desarrollar terapias que se dirijan a CD47 y/o modulen la señalización de CD47-SIRP α . Los roedores de la presente invención pueden utilizarse para seleccionar y desarrollar terapias candidatas (por ejemplo, anticuerpos) que se unen a CD47 humana. Los roedores de la presente invención pueden utilizarse para seleccionar y desarrollar terapias candidatas (por ejemplo, anticuerpos) que bloqueen la interacción de CD47 humano con SIRP α humano. Los roedores de la presente invención pueden utilizarse para determinar el perfil de unión de antagonistas y/o agonistas de un CD47 humanizado en la superficie de una célula de un roedor como se describe en el presente documento. Los roedores de la presente invención pueden utilizarse para determinar el epítipo o epítomos de uno o más anticuerpos terapéuticos candidatos que se unen a CD47 humano.

Los roedores de la presente invención pueden utilizarse para determinar los perfiles farmacocinéticos de los anticuerpos anti-CD47. Uno o más roedores de la presente invención y uno o más roedores de control o de referencia pueden exponerse cada uno a uno o más anticuerpos anti-CD47 terapéuticos candidatos a diversas dosis (por ejemplo, 0,1 mg/kg, 0,2 mg/kg, 0,3 mg/kg, 0,4 mg/kg, 0,5 mg/kg, 1 mg/kg, 2 mg/kg, 3 mg/kg, 4 mg/kg, 5 mg/kg, 7,5 mg/kg, 10 mg/kg, 15 mg/kg, 20 mg/kg, 25 mg/kg, 30 mg/kg, 40 mg/kg o 50 mg/kg o más). Los anticuerpos terapéuticos candidatos se pueden dosificar mediante cualquier vía de administración deseada (por ejemplo, por vía subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, etc.). La sangre puede aislarse de roedores (humanizados y de control) en varios momentos (por ejemplo, 0 h, 6 h, 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, 8 días, 9 días, 10 días, 11 días o hasta 30 o más días). Se pueden realizar diversos ensayos para determinar los perfiles farmacocinéticos de los anticuerpos terapéuticos candidatos administrados utilizando muestras obtenidas de roedores como se describe en el presente documento, que incluyen, pero sin limitaciones, IgG total, respuesta de anticuerpos antiterapéuticos, aglutinación, etc.

Los roedores de la presente invención pueden utilizarse para medir el efecto terapéutico de bloquear o modular la señalización de CD47 y el efecto sobre la expresión génica como resultado de cambios celulares. Un roedor de la presente invención o células aisladas del mismo pueden exponerse a un candidato terapéutico que se une a una proteína CD47 humanizada (o una parte humana de una proteína CD47) en la superficie de una célula del roedor y, después de un período de tiempo posterior, analizarse para determinar los efectos en los procesos dependientes de CD47, por ejemplo, la adhesión, la angiogénesis, la apoptosis, la inflamación, la migración, la fagocitosis, la proliferación y la eliminación de tumores (o células tumorales).

Se describen roedores de la presente invención que expresan la proteína CD47 humanizada. Por lo tanto, las células, estirpes celulares y cultivos celulares se pueden generar para que sirvan como fuente de CD47 humanizada para su uso en ensayos de unión y funcionales, por ejemplo, para analizar la unión o función de un antagonista o agonista de CD47, en particular cuando el antagonista o agonista es específico para una secuencia o epítipo de SIRP α humana. Los epítomos de CD47 unidos por anticuerpos terapéuticos candidatos se pueden determinar mediante células aisladas de roedores de la presente invención.

Las células de los roedores de la presente invención se pueden aislar y utilizar según las necesidades, o se pueden mantener en cultivo durante muchas generaciones. Las células de un roedor de la presente invención se pueden immortalizar y mantener en cultivo indefinidamente (por ejemplo, en cultivos en serie).

Las células y/o roedores de la presente invención se pueden utilizar en un ensayo de supervivencia y/o proliferación (por ejemplo, empleando linfocitos B o T) para seleccionar y desarrollar terapias candidatas que modulen la señalización de CD47 humana. La activación o pérdida de CD47 puede desempeñar un papel importante en la regulación de la proliferación celular, y la inducción de la apoptosis por CD47 puede resultar de la activación de epítomos específicos del dominio extracelular de CD47, por lo tanto, se pueden identificar moduladores candidatos de CD47 (por ejemplo, antagonistas o agonistas), caracterizados y desarrollados utilizando células de roedores de la presente invención. Las células y/o roedores de la presente invención se pueden utilizar en ensayos de supervivencia o muerte para determinar el efecto en la proliferación o apoptosis de una célula específica (por ejemplo, células cancerosas) en presencia y ausencia de CD47.

Las células y/o roedores de la presente invención se pueden utilizar en xenotrasplantes de células heterólogas (por ejemplo, humanas) para determinar las funciones mediadas por CD47 en la respuesta fisiológica (por ejemplo, inmunitaria) a las células humanas trasplantadas. Las terapias candidatas que se unen o bloquean una o más funciones de CD47 humano pueden caracterizarse en un roedor de la presente invención. Las mediciones adecuadas incluyen varios ensayos celulares, ensayos de proliferación, análisis de inmunoglobulinas séricas (por ejemplo, cantidad de anticuerpos), ensayos de citotoxicidad y caracterización de interacciones ligando-receptor (ensayos de inmunoprecipitación). Los roedores de la presente invención pueden utilizarse para caracterizar las funciones mediadas por CD47 que regulan una respuesta inmunitaria a un antígeno. El antígeno puede estar asociado con una neoplasia. El antígeno puede estar asociado con una enfermedad o afección autoinmunitaria. El antígeno puede ser una diana asociada con una enfermedad o afección que padece uno o más pacientes humanos que necesitan tratamiento.

Los roedores de la presente invención pueden utilizarse en experimentos de trasplante o transferencia adoptiva para determinar el potencial terapéutico de compuestos o agentes biológicos para modular la regulación dependiente de

CD47 de nuevos linfocitos y su función inmunitaria. A los roedores de la presente invención se les pueden trasplantar linfocitos B humanos.

5 Las células de los roedores de la presente invención pueden utilizarse en un ensayo de migración o propagación celular para detectar y desarrollar terapias candidatas que modulen la CD47 humana. Estos procesos son necesarios para muchos procesos celulares, incluidos la cicatrización de heridas, la diferenciación, la proliferación y la supervivencia.

10 Las células de los roedores de la presente invención pueden utilizarse en ensayos de fagocitosis para determinar el potencial terapéutico de compuestos o agentes biológicos para modular la regulación de la fagocitosis dependiente de CD47.

15 Las células de los roedores de la presente invención pueden utilizarse en ensayos de crecimiento (o proliferación) de células tumorales para determinar el potencial terapéutico de compuestos o agentes biológicos para modular la regulación y/o la apoptosis de células tumorales dependiente de CD47.

20 Se puede inducir una enfermedad o afección inflamatoria en uno o más roedores de la presente invención para proporcionar un sistema *in vivo* para determinar el potencial terapéutico de compuestos o agentes biológicos para modular la regulación dependiente de CD47 de una o más funciones de la enfermedad o afección inflamatoria. La enfermedad o afección inflamatoria puede estar asociada con una neoplasia.

25 Se puede inducir una condición antiangiogénica en uno o más roedores de la presente invención para proporcionar un sistema *in vivo* para determinar el potencial terapéutico de compuestos o agentes biológicos para modular la regulación dependiente de CD47 de una o más funciones de la condición antiangiogénica. Las funciones ilustrativas que se pueden evaluar para determinar la eficacia terapéutica incluyen la expresión de quimiocinas, las respuestas estimuladas por óxido nítrico (ON) y recuperación del flujo sanguíneo.

30 Los roedores de la presente invención pueden proporcionar un sistema *in vivo* para el análisis y prueba de un fármaco o vacuna. Se puede suministrar un fármaco o vacuna candidatos a uno o más roedores de la presente invención, seguido de un control de los roedores para determinar una o más de las respuestas inmunitarias al fármaco o vacuna, el perfil de seguridad del fármaco o vacuna, o el efecto en una enfermedad o afección. Los métodos ilustrativos usados para determinar el perfil de seguridad incluyen mediciones de toxicidad, concentración de dosis óptima, eficacia del fármaco o vacuna y posibles factores de riesgo. Dichos fármacos o vacunas pueden mejorarse y/o desarrollarse en dichos roedores.

35 Los roedores de la presente invención proporcionan un sistema *in vivo* para evaluar las propiedades farmacocinéticas de un fármaco dirigido a CD47. Un fármaco dirigido a CD47 humano puede entregarse o administrarse a uno o más roedores de la presente invención, seguido del control de, o realización de uno o más ensayos en, los roedores (o células aisladas de los mismos) para determinar el efecto del fármaco en el roedor. Las propiedades farmacocinéticas incluyen, pero sin limitación, cómo un animal procesa el fármaco en varios metabolitos (o detección de la presencia o ausencia de uno o más metabolitos del fármaco, incluidos metabolitos tóxicos), vida media del fármaco, niveles circulantes del fármaco después de la administración (por ejemplo, concentración en suero del fármaco), respuesta antifármaco (por ejemplo, anticuerpos antifármaco), absorción y distribución del fármaco, vía de administración, vías de excreción y/o eliminación del fármaco. Las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas de los fármacos (por ejemplo, moduladores de CD47) pueden controlarse en o mediante el uso de roedores de la presente invención.

50 Los roedores de la presente invención proporcionan un sistema *in vivo* para evaluar la toxicidad específica de un fármaco dirigido a CD47. Un fármaco dirigido a CD47 puede entregarse o administrarse a uno o más roedores de la presente invención, seguido del control o realización de uno o más ensayos en los roedores (o células aisladas de los mismos) para determinar el efecto tóxico específico del fármaco en el roedor. Normalmente, los fármacos están destinados a modular una o más funciones de sus dianas. Por poner solo un ejemplo, un modulador de CD47 está destinado a modular funciones mediadas por CD47 (por ejemplo, apoptosis inducida por CD47) mediante la interacción de alguna manera con la molécula de CD47 en la superficie de una o más células. Dicho modulador puede tener un efecto adverso que sea una exageración de la(s) acción(es) farmacológica(s) deseada(s) del modulador. Dichos efectos se denominan efectos específicos. Los efectos específicos ilustrativos incluyen una dosis demasiado elevada, activación/inactivación crónica y acción correcta en un tejido incorrecto. Los efectos específicos de un fármaco dirigido a CD47 identificado en, o mediante el uso de, roedores de la presente invención pueden utilizarse para determinar una(s) función(es) previamente desconocida(s) de CD47.

60 Los roedores de la presente invención pueden proporcionar un sistema *in vivo* para evaluar la toxicidad colateral de un fármaco dirigido a CD47. Un fármaco dirigido a CD47 puede entregarse o administrarse a uno o más roedores de la presente invención, seguido del control o realización de uno o más ensayos en los roedores (o células aisladas de los mismos) para determinar el efecto tóxico colateral del fármaco en el roedor. Pueden ocurrir efectos colaterales cuando un fármaco interactúa con una diana no deseada (por ejemplo, reactividad cruzada con un epítipo común). Dichas interacciones pueden ocurrir en un tejido intencionado o no intencionado. Por poner solo un ejemplo, los isómeros de imagen especular (enantiómeros) de un fármaco pueden provocar efectos tóxicos colaterales. Además,

un fármaco puede interactuar de manera inapropiada y activar involuntariamente diferentes subtipos de receptores. Los efectos colaterales ilustrativos incluyen activación/inhibición incorrecta de una diana incorrecta independientemente del tejido en el que se encuentre la diana incorrecta. Los efectos colaterales de un fármaco dirigido a CD47 se pueden determinar mediante la comparación de los efectos de la administración del fármaco a roedores de la presente invención con uno o más roedores de referencia.

La realización de un ensayo puede incluir determinar el efecto en el fenotipo (por ejemplo, cambio en el peso corporal) y/o genotipo del animal no humano al que se administra el fármaco. La realización de un ensayo puede incluir determinar la variabilidad entre lotes para un modulador de CD47 (por ejemplo, un antagonista o un agonista). Realizar un ensayo puede incluir determinar las diferencias entre los efectos de un fármaco dirigido a CD47 administrado a un roedor de la presente invención y a un roedor de referencia. Los roedores de referencia pueden tener una modificación como se describe en el presente documento, una modificación que es diferente a como se describe en el presente documento (por ejemplo, una que tiene una interrupción, eliminación o de otro modo un gen *CD47* no funcional) o ninguna modificación (es decir, un roedor de tipo silvestre).

Los parámetros ilustrativos que pueden medirse en roedores (o en y/o utilizando células aisladas de los mismos) para evaluar las propiedades farmacocinéticas, la toxicidad específica y/o la toxicidad colateral de un fármaco dirigido a CD47 incluyen, pero sin limitación, aglutinación, autofagia, división celular, muerte celular, hemólisis mediada por complemento, integridad del ADN, cantidad de anticuerpos específicos del fármaco, metabolismo de fármacos, matrices de expresión génica, niveles de hematocrito, hematuria, actividad metabólica, actividad mitocondrial, estrés oxidativo, fagocitosis, biosíntesis de proteínas, degradación de proteínas, secreción de proteínas, respuesta al estrés, concentración del fármaco en el tejido diana, concentración de fármaco en tejido no diana, actividad transcripcional y similares. Los roedores de la presente invención pueden utilizarse para determinar una dosis farmacéuticamente eficaz de un modulador de CD47.

Los roedores de la presente invención pueden proporcionar un sistema *in vivo* mejorado para el desarrollo y caracterización de terapias candidatas para su uso en el cáncer. A los roedores de la presente invención se les puede implantar un tumor, seguido de la administración de uno o más agentes terapéuticos candidatos. Los agentes terapéuticos candidatos pueden incluir un anticuerpo multiespecífico (por ejemplo, un anticuerpo biespecífico) o un cóctel de anticuerpos; los agentes terapéuticos candidatos pueden incluir terapia de combinación, tal como, por ejemplo, administración de anticuerpos monoespecíficos dosificados de manera secuencial o simultánea. Se le puede dejar al tumor tiempo suficiente para que se establezca en una o más ubicaciones dentro de los roedores. La proliferación, crecimiento, etc. de células tumorales pueden medirse tanto antes como después de la administración con el uno o más agentes terapéuticos candidatos. La citotoxicidad de los agentes terapéuticos candidatos también se puede medir en el roedor según se desee.

Los roedores de la presente invención pueden proporcionar un sistema *in vivo* mejorado que aclara los mecanismos de interacción entre células humanas a través de la transferencia adoptiva. A los roedores de la presente invención se les puede implantar un xenoinjerto tumoral, seguido de una segunda implantación de linfocitos infiltrantes de tumores que podrían implantarse en los roedores mediante transferencia adoptiva para determinar la eficacia en la erradicación de tumores sólidos u otras neoplasias malignas. Dichos experimentos se pueden realizar con células humanas debido a la presencia exclusiva de CD47 humana sin competencia con CD47 endógena del roedor. De manera alternativa, dichos experimentos pueden incluir el uso de células de ratón de un fondo NOD/SCID o BRG (BALB/c Rag2^{-/-}IL-2Rγ^{-/-}). Además, se pueden mejorar y/o desarrollar terapias y productos farmacéuticos para su uso en xenotrasplantes en dichos roedores.

Los roedores de la presente invención pueden proporcionar un sistema *in vivo* mejorado para mantener y desarrollar células madre hematopoyéticas humanas mediante injerto. Los roedores de la presente invención pueden proporcionar un desarrollo y mantenimiento mejorados de células madre humanas dentro del roedor. Se pueden observar poblaciones aumentadas de linfocitos B y T humanos diferenciados en la sangre, médula ósea, bazo y timo del roedor. Se puede observar una homeostasis óptima de los linfocitos T y las células NK en las células de la sangre, médula ósea, bazo y timo del roedor. Los roedores de la presente invención pueden demostrar un aumento en el nivel o la cantidad de glóbulos rojos (RBC, del inglés *red blood cells*) en comparación con uno o más roedores de referencia.

Se pueden emplear roedores de la presente invención para evaluar la eficacia de un fármaco terapéutico dirigido a células humanas. A un roedor de la presente invención se le pueden trasplantar células humanas y se le puede administrar a dicho roedor un fármaco candidato dirigido a dichas células humanas. A continuación, se determina la eficacia terapéutica del fármaco mediante el control de las células humanas en el roedor después de la administración del fármaco. Los fármacos que pueden probarse en los roedores incluyen tanto compuestos de moléculas pequeñas, es decir, compuestos de pesos moleculares inferiores a 1500 kD, 1200 kD, 1000 kD u 800 dalton como compuestos moleculares grandes (tales como proteínas, por ejemplo, anticuerpos), que tienen efectos terapéuticos previstos para el tratamiento de enfermedades y afecciones humanas al dirigirse a (por ejemplo, unirse a y/o actuar sobre) células humanas.

El fármaco puede ser un fármaco antineoplásico y las células humanas pueden ser células cancerosas, que pueden ser células de un cáncer primario o células de estirpes celulares establecidas a partir de un cáncer primario. En estos

casos, a un roedor de la presente invención se le pueden trasplantar células cancerosas humanas y se le puede administrar un fármaco antineoplásico. La eficacia del fármaco se puede determinar mediante la evaluación de si el crecimiento o la metástasis de las células cancerosas humanas en el roedor se inhibe como resultado de la administración del fármaco.

El fármaco antineoplásico puede ser una molécula de anticuerpo, que se une a un antígeno en las células cancerosas humanas. El fármaco antineoplásico puede ser un anticuerpo biespecífico que se une a un antígeno de células cancerosas humanas y a un antígeno de otras células humanas, por ejemplo, células del sistema inmunitario humano (o "células inmunitarias humanas") tales como los linfocitos B y los linfocitos T.

A un roedor de la presente invención se le pueden injertar células inmunitarias humanas o células que se diferencian en células inmunitarias humanas. A dicho roedor con células inmunitarias humanas injertadas se le trasplantan células cancerosas humanas y se le administra un fármaco antineoplásico, tal como un anticuerpo biespecífico que se une a un antígeno de células cancerosas humanas y a un antígeno de células inmunitarias humanas (por ejemplo, linfocitos T). La eficacia terapéutica del anticuerpo biespecífico se puede evaluar según su capacidad para inhibir el crecimiento o la metástasis de las células cancerosas humanas en el roedor. Al roedor descrito en el presente documento se le pueden injertar células progenitoras hematopoyéticas CD34⁺ humanas que dan lugar a células inmunitarias humanas (incluidos linfocitos T, linfocitos B, células NK, entre otras). Se trasplantan células de linfoma de linfocitos B humanos (por ejemplo, células Raji) a dicho roedor con células inmunitarias humanas injertadas, al que después se le administra un anticuerpo biespecífico que se une a un antígeno tumoral (por ejemplo, un antígeno de linfocitos B normales y de ciertos linfocitos B malignos tal como CD20) y a la subunidad CD3 del receptor de linfocitos T, para probar la capacidad del anticuerpo biespecífico para inhibir el crecimiento tumoral en el roedor.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se proporcionan para describir a los expertos en la materia cómo preparar y utilizar los métodos y composiciones de la invención sin pretender ser limitativos. A menos que se indique de otro modo, la temperatura se indica en grados Celsius y la presión es la atmosférica o casi atmosférica.

Ejemplo 1. Humanización de un gen del grupo de diferenciación 47 (CD47) endógeno.

Este ejemplo ilustra métodos ilustrativos de humanización de un gen endógeno que codifica el grupo de diferenciación 47 (CD47) en un roedor (por ejemplo, un ratón). Los métodos descritos en este ejemplo se pueden emplear para humanizar un gen *CD47* endógeno de un roedor utilizando cualquier secuencia humana, o combinación de secuencias (o fragmentos de secuencias) humanas según se desee. En este ejemplo, se emplea un gen *CD47* humano que aparece en el clon RP11-69A17 del cromosoma artificial bacteriano (BAC, del inglés *bacterial artificial chromosome*) para humanizar un gen *CD47* endógeno de un ratón.

Se construyó un vector de direccionamiento para la humanización del material genético que codifica un dominio IgV aminoterminal extracelular y cinco dominios transmembrana de un gen *CD47* endógeno utilizando tecnología VELOCIGENE® (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 6.586.251 y Valenzuela *et al.* (2003) High-throughput engineering of the mouse genome coupled with high-resolution expression analysis, *Nature Biotech.* 21(6):652-659).

En resumen, se modificó el clon RP23-230L20 del cromosoma artificial bacteriano (BAC) de ratón (Invitrogen) para eliminar la secuencia que contenía los exones 2 a 7 de un gen *CD47* endógeno e insertar los exones 2 a 7 de un gen *CD47* humano utilizando el clon RP11-69A17 del BAC humano (Invitrogen), que codifica los aminoácidos 16 a 292 de un polipéptido CD47 humano. Se retuvo el ADN endógeno que contenía ADN genómico correspondiente a los exones 1, 8 y 9 de la isoforma 2, así como las regiones no traducidas (UTR) en 5' y en 3'. El análisis de secuencia de la secuencia de CD47 humana contenida en el clon RP11-69A17 del BAC confirmó todos los exones de CD47 y las señales de empalme. El análisis de secuencia reveló que la secuencia coincidía con el genoma de referencia y las transcripciones de CD47 NM_001777.3 y NM_198793.2. El ADN genómico correspondiente a los exones 2 a 7 de un gen *CD47* endógeno (-30,8 kb) se reemplazó en el clon RP23-230L20 del BAC mediante recombinación homóloga en células bacterianas para insertar un fragmento de ADN que contenía -23,9 kb de ADN genómico humano correspondiente a los exones 2 a 7 de un gen *CD47* humano del clon RP11-69A17 del BAC y ~4995 pb correspondientes a un casete de neomicina que se autoelimina flanqueado por sitios de reconocimiento de recombinasa (loxP-hUb1-em7-Neo-pA-mPrm1-Crei-loxP; véanse las patentes de Estados Unidos n.º 8.697.851, 8.518.392 y 8.354.389). El casete de neomicina que se autoelimina se añadió al extremo del fragmento de ADN humano de -23,9 kb que contenía los exones 2 a 7 del gen *CD47* humano (Figura 2). El vector de direccionamiento contenido, de 5' a 3', un brazo de homología en 5' que contiene ~39 kb de ADN genómico de ratón del clon RP23-230L20 del BAC, -29,3 kb de ADN genómico humano del clon RP11-69A17 del BAC (que contenía los exones 2 a 7 de un gen *CD47* humano), un casete de neomicina que se autoelimina flanqueado por sitios loxP y ~98,8 kb de ADN genómico de ratón del clon RP23-230L20 del BAC. Después de la recombinación homóloga en células bacterianas con el vector de direccionamiento descrito anteriormente, se creó un clon RP23-230L20 del BAC modificado que dio como resultado un gen *CD47* humanizado que contenía una UTR en 5' de ratón, un exón 1 de ratón, los exones humanos 2 a 7, los exones 8 a 9 de ratón y una UTR en 3' de ratón. En la tabla 3 se proporcionan secuencias de

proteínas de cuatro isoformas empalmadas proyectadas de manera alternativa de CD47 humanizado que indican los aminoácidos resultantes de ratón y humanos codificados por el ADN de ratón y humano, respectivamente.

El clon del BAC modificado descrito anteriormente se utilizó para electroporar células madre embrionarias (ME) de ratón F1H4 (50 % 129/SvEv/Tac, 50 % C57BL/6NTac; Auerbach, W. *et al.* (2000) *Biotechniques* 29(5): 1024-8, 1030, 1032) para crear células ME modificadas que comprenden un gen *CD47* endógeno que se humaniza a partir de los exones 2 a 7. Se identificaron células ME dirigidas positivamente que contenían un gen *CD47* humanizado mediante un ensayo (Valenzuela *et al.* mencionado anteriormente) que detectó la presencia de secuencias de CD47 humanas (por ejemplo, los exones 2 a 7) y confirmó la pérdida y/o retención de secuencias de CD47 de ratón (por ejemplo, los exones 1, 8 y 9 y/o los exones 2 a 7). En la tabla 4 se muestran los cebadores y las sondas que se utilizaron para confirmar la humanización de un gen *CD47* endógeno como se describe anteriormente (Figuras 3). La secuencia de nucleótidos a través del punto de inserción cadena arriba incluyó lo siguiente, que indica una secuencia endógena de ratón cadena arriba del punto de inserción (contenida entre paréntesis a continuación con un sitio de restricción *Asi* en cursiva) unida de forma contigua a una secuencia de CD47 humana presente en el punto de inserción: (GCAGACATGA TTACTTCAGA GCTTTCAAAG CTAGATACTG TACCTTGCAT ATTCCAACAC) GCGATCGC ATTTTAAGAT TTTCCATCCT AGTGGAAGA TATGATTGTA TTCATCCTAT TTACTTTGTA TATTAAAGTA CAGTAGAACC TGCCACTTTT (SEQ ID NO: 33). La secuencia de nucleótidos a lo largo del punto de inserción cadena abajo en el extremo 5' del casete de neomicina que se autoelimina incluía lo siguiente, que indica la secuencia genómica CD47 humana contigua a la secuencia del casete cadena abajo del punto de inserción (contenida entre paréntesis a continuación con la secuencia *loxP* en cursiva): GGATCCATTT TAAGTAATAG AATAGGATTT TTAATTGTTT CAGTGTCTT GTGATAGAGC TGTCTGCAC AGACCTGTTT (CTCGAGATAA CTTCTGTATAA TGTATGCTAT ACGAAGTTAT ATGCATGGCC TCCGCGCCGG GTTTTGGCGC CTCCGCGGG) (SEQ ID NO: 34). La secuencia de nucleótidos a lo largo del punto de inserción cadena abajo en el extremo 3' del casete de neomicina incluía lo siguiente, que indica la secuencia del casete contigua a la secuencia genómica de ratón en 3' del exón 7 de un gen *CD47* endógeno (contenido entre paréntesis a continuación con la secuencia *loxP* en cursiva): CATGTCTGGA ATAACCTCGT ATAATGTATG CTATACGAAG TTATGCTAGT AACTATAACG GTCCTAAGGT AGCGACTAGC (ATTAGTATGG AAGGTCCGTC CACTGTCCAG GTTCTCTTG CGGAGCTCTT TGTCTCTCTG GACTCTGTAT AACTGCTTG) (SEQ ID NO: 35). La secuencia de nucleótidos a lo largo del punto de inserción cadena abajo después de la eliminación del casete de neomicina (76 pb restantes) incluía lo siguiente, que indica la secuencia genómica humana y de ratón yuxtapuesta a la secuencia *loxP* de la secuencia del casete restante (contenida entre paréntesis a continuación con la secuencia *loxP* en cursiva): GGATCCATTT TAAGTAATAG AATAGGATTT TTAATTGTTT CAGTGTCTT GTGATAGAGC TGTCTGCAC AGACCTGTTT (CTCGAGATAA CTTCTGTATAA TGTATGCTAT ACGAAGTTAT GCTAGTAACT ATAACGGTCC TAAGGTAGCG ACTAGC)ATT AGTATGGAAG GTCCGTCCAC TGTCCAGGTT CCTCTTGCGG AGCTCTTGT CTCTCTGGAC TCTGTATACA CTGCTTGCAT (SEQ ID NO: 36).

Después se utilizaron clones de células ME positivas para implantar ratones hembra con el método VELOCIMOUSE® (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 7.294.754 y 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) para generar una camada de crías que contenían una inserción de los exones 2 a 7 de un gen *CD47* humano en un gen *CD47* endógeno de un ratón. Se pudieron confirmar e identificar nuevamente ratones que llevaban la humanización de los exones 2 a 7 de un gen *CD47* endógeno mediante la genotipificación del ADN aislado de los cortes de la cola utilizando una modificación del ensayo de alelos (Valenzuela *et al.*, antes mencionado) que detectaba la presencia de las secuencias del gen *CD47* humano. Las crías se genotipifican y se seleccionan las cohortes de animales heterocigotos para el gen *CD47* humanizado para la caracterización.

TABLA 4

Nombre	Cebador	Secuencia (5'-3')
7190mTU	Directo	TGCAGAAGTCACTAGGAGGAAT (SEQ ID NO: 21)
	Sonda	TCAGTCAACTTCTTCTGGGTTGTTT (SEQ ID NO: 22)
7190mTD		CC
	Inverso	GTGCCAGACTCACTTTCTATCCA (SEQ ID NO: 23)
	Directo	TGCTGCCAATATACGGCTTCTG (SEQ ID NO: 24)
7190hTU		CAGCTCTCATAGCCAACTATGGTG (SEQ ID NO: 25)
		CC
	Inverso	TCAAGCAGAGCCTGGTTATCTG (SEQ ID NO: 26)
7190hTD	Directo	GTCGTCAATCCATGCTTTGTTAC (SEQ ID NO: 27)
	Sonda	TGGAGGCACAAAACACTACTGAAG (SEQ ID NO: 28)
7190hTD		TATACG
	Inverso	GGACAGTGGACTTGTGTTAGAGC (SEQ ID NO: 29)
	Directo	GGCTTGGTGGCTGATTGTTCT (SEQ ID NO: 30)
	Sonda	AGCACCCAACTGATATGCCTGTA (SEQ ID NO: 31)
		TTTG
	Inverso	TGGGAAGTGGTGTTCAGTCTA (SEQ ID NO: 32)

Ejemplo 2. Expresión del polipéptido CD47 humanizado mediante glóbulos rojos de ratón.

Este ejemplo demuestra que se pueden utilizar roedores modificados para contener un gen *CD47* humanizado de acuerdo con el ejemplo 1 para detectar moduladores de CD47 (por ejemplo, anticuerpos anti-CD47) y determinar diversas características, tales como, por ejemplo, farmacocinética y perfiles de seguridad. En este ejemplo, se analizan varios anticuerpos anti-CD47 en glóbulos rojos (RBC) de ratón aislados de roedores preparados de acuerdo con el ejemplo 1, cuyos roedores expresan un polipéptido CD47 humanizado como se describe en el presente documento.

En resumen, se transfirieron 2 ml de sangre completa de ratones CD47 humanizados ($n = 2$) a un tubo de 15 ml y se centrifugaron a 200g durante 10 minutos a 4 °C. Se aspiraron el plasma y la capa leucocitaria y después se añadieron 15 ml de PBS y las células se mezclaron suavemente. La mezcla se centrifugó nuevamente a 200g durante cinco minutos a 4 °C. Se aspiró el sobrenadante y las células se lavaron dos veces más. Los glóbulos rojos granulados se resuspendieron hasta un volumen final en 10 ml de PBS. Los glóbulos rojos resuspendidos se centrifugaron por última vez a 200g durante 10 minutos a 4 °C. El volumen de glóbulos rojos envasados se estimó en 0,5 ml y se diluyó hasta una concentración del 0,5 % con PBS (0,5 ml de glóbulos rojos envasados/100 ml de PBS). La concentración real de glóbulos rojos se determinó con un Cellometer Auto T4 ($1,5 \times 10^7$ /ml; Nexcelom Bioscience).

Se añadieron ochenta (80) µl de glóbulos rojos de ratón al 0,5 % a cada pocillo de una placa con fondo en V de 96 pocillos. Se añadieron anticuerpos anti-CD47 a cada pocillo (20 µl a 33 nM). La placa se golpeó suavemente para mezclar y se incubó en hielo durante 30 minutos. Después se lavó la placa dos veces con tampón de tinción (PBS con FBS al 2 %). Se añadió anticuerpo secundario Fab-488 (anti-IgG humana de ratón AffiniPure conjugado con Alexa Fluor 488, fragmento F(ab')₂ específico, Jackson Immuno Research) a cada pocillo a una concentración de 10 µg/ml. La placa se incubó nuevamente en hielo durante 30 minutos, seguido de lavado una vez con tampón de tinción. Las células de cada pocillo se resuspendieron en 200 µl de tampón de tinción y se filtraron a través de una placa de filtro de 96 pocillos. Las células de la placa se analizaron utilizando el sistema BD ACCURI™ C6 (BD Biosciences). Los resultados ilustrativos se muestran en la figura 4. La intensidad de fluorescencia media (IFM) por encima del control de isotipo para cada anticuerpo analizado se muestra en la tabla 5.

TABLA 5

Anticuerpo	IFM	Veces por encima del control de isotipo
Ac A, hlgG4s	28898	258
Ac B, hlgG4s	27545	246
Ac C, hlgG4s	24620	220
Ac D, hlgG1	29882	267
Ac E, hlgG4	33423	298
Control, hlgG4s	112	-
Control, hlgG4	112	-
<i>hlgG4s: IgG4 humana con región Fc modificada que tiene una función efectora reducida</i>		

Como se muestra en la figura 4, todos los anticuerpos anti-CD47 se unieron a los glóbulos rojos de ratones CD47 humanizados. Considerado en conjunto, este ejemplo demuestra que (1) los roedores genomanipulados para contener un gen *CD47* humanizado como se describe en el presente documento expresan un polipéptido CD47 humanizado en la superficie de las células (por ejemplo, glóbulos rojos) del roedor, y (2) dichas células son útiles para detectar moduladores de CD47 (por ejemplo, anticuerpos CD47) y determinar los perfiles farmacocinéticos de dichos moduladores.

Ejemplo 3. Hemaglutinación de glóbulos rojos de ratón que expresan el polipéptido CD47 humanizado.

Este ejemplo demuestra además que los roedores modificados para contener un gen *CD47* humanizado de acuerdo con el ejemplo 1 se pueden utilizar en diversos ensayos (por ejemplo, ensayo de hemaglutinación) para detectar moduladores de CD47 (por ejemplo, anticuerpos anti-CD47) y determinar diversas características, tales como, por ejemplo, farmacocinética y perfiles de seguridad. En este ejemplo, se analizan varios anticuerpos anti-CD47 en glóbulos rojos (RBC) de ratón que expresan un polipéptido CD47 humanizado como se describe en el presente documento para determinar la concentración de anticuerpos que promueve la hemaglutinación.

En resumen, se prepararon glóbulos rojos de ratones CD47 humanizados y de tipo silvestre ($n = 2$) como se describe en el ejemplo 2. Se añadieron veinte (20) µl de anticuerpo anti-CD47 (en una dilución en serie de 5 veces) a los pocillos 1 a 12 en una placa de fondo en V de 96 pocillos, seguido de la adición de 80 µl de glóbulos rojos de ratón al 0,5 % a todos los pocillos de la placa. Las placas se golpearon suavemente para mezclarlas y se incubaron a temperatura ambiente (24 a 27 °C) durante 30 minutos. El criterio de valoración de la aglutinación se observó visualmente (es decir,

los glóbulos rojos se depositan en el fondo en las muestras negativas, mientras que los glóbulos rojos se aglutinan en las muestras positivas). Los resultados ilustrativos se muestran en la figura 5, con cuadros para delinear los pocillos que muestran hemaglutinación.

- 5 Como se muestra en la figura 5, sólo la lectina provocó aglutinación en ratones de tipo silvestre. Sin embargo, dos anticuerpos anti-CD47 (Ac E y Ac C) además de la lectina indujeron aglutinación en glóbulos rojos de dos roedores CD47 humanizados elaborados de acuerdo con el ejemplo 1. La concentración a la que estos dos anticuerpos indujeron la aglutinación comenzó en 11 nM. Considerado en conjunto, este ejemplo demuestra que los roedores genomanipulados para contener un gen *CD47* humanizado como se describe en el presente documento se pueden utilizar para evaluar una o más propiedades (por ejemplo, hemaglutinación) de moduladores de CD47 (por ejemplo, anticuerpos contra CD47).

Ejemplo 4. Eliminación farmacocinética de moduladores de CD47 en roedores CD47 humanizados.

- 15 Este ejemplo ilustra un método para evaluar la eliminación farmacocinética de moduladores de CD47 (por ejemplo, anticuerpos anti-CD47) en roedores modificados para contener un gen de *CD47* humanizado de acuerdo con el ejemplo 1. En este ejemplo, a roedores (por ejemplo, ratones) CD47 de tipo silvestre y humanizados se les administraron anticuerpos anti-CD47 y se determinaron los niveles en suero de anticuerpos mediante un ensayo ELISA.

20 En resumen, a los ratones de tipo silvestre ($n = 5$) o homocigotos para CD47 humanizado ($n = 5$; como se describió anteriormente) se les administraron cuatro anticuerpos anti-CD47 (Ac F, Ac G, Ac H y Ac I) y un anticuerpo de control de isotipo IgG4s (IgG4s). Los antecedentes genéticos de los ratones fueron 75 % CD57BL/6 y 25 % 129Sv. Cada anticuerpo se probó en cinco roedores CD47 humanizados. Todos los anticuerpos se administraron por vía subcutánea a una dosis de 50 mg/kg. Se recogió un presangrado un día antes de la administración del anticuerpo (día 0). Los sangrados postinyección se recogieron a las 6 horas, 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 7 días, 10 días y 14 días. Las fracciones de suero de los sangrados se separaron y se sometieron a análisis de anticuerpos humanos totales utilizando un inmunoensayo ELISA.

30 En resumen, se recubrieron placas de 96 pocillos con un anticuerpo policlonal de cabra anti-IgG humana (Jackson ImmunoResearch) para capturar los anticuerpos humanos analizados en los sueros, y después se detectaron los anticuerpos unidos a la placa mediante un anticuerpo policlonal de cabra anti-IgG humana conjugado con peroxidasa de rábano picante (Jackson ImmunoResearch) y sustrato TMB (BD Pharmingen). Las muestras de suero estaban en diluciones seriadas de seis dosis y los patrones de referencia de los respectivos anticuerpos en diluciones seriadas de 12 dosis. Las concentraciones de anticuerpo antifármaco en los sueros se calcularon basándose en la curva patrón de referencia generada utilizando el programa informático GraphPad Prism. Los resultados se muestran en la figura 6 y la tabla 6.

40 Los datos demostraron que los anticuerpos administrados a ratones humanizados y de tipo silvestre como se describe en el presente documento fueron bien tolerados. Considerado en conjunto, este ejemplo demuestra que los roedores descritos en el presente documento se pueden utilizar para evaluar una o más propiedades farmacocinéticas de un fármaco dirigido a CD47 (por ejemplo, un anticuerpo anti-CD47) tal como, por ejemplo, niveles circulantes del fármaco. Por otra parte, los roedores descritos en el presente documento se pueden utilizar para evaluar la toxicidad de un fármaco dirigido a CD47 mediante la determinación de los efectos adversos después de la administración.

45

TABLA 6

Anticuerpo	Concentraciones de anticuerpos en suero ($\mu\text{g/ml} \pm \text{EEM}$)						
	6 horas	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 7	Día 10
Ac F	$116,7 \pm 14,0$	$196,4 \pm 10,6$	$96,0 \pm 13,3$	$24,7 \pm 7,0$	$3,7 \pm 0,42$	$<0,35$	$<0,35$
Ac G	$115,0 \pm 22,1$	$198,8 \pm 23,4$	$118,4 \pm 20,9$	$48,3 \pm 16,0$	$2,9 \pm 1,97$	$<0,35$	$<0,35$
Ac H	$64,5 \pm 3,85$	$108,0 \pm 5,13$	$32,0 \pm 6,08$	$1,0 \pm 0,2$	$0,4 \pm 0,03$	$0,06 \pm 0,03$	$0,05 \pm 0,02$
Ac I IgG4s	$51,1 \pm 16,6$	$115,2 \pm 14,8$	$63,8 \pm 8,3$	$11,1 \pm 4,2$	$0,5 \pm 0,1$	$0,1 \pm 0,02$	$<0,35$
Control de isotipo	$458,2 \pm 34,4$	$702,5 \pm 32,3$	$616,6 \pm 27,0$	$567,1 \pm 39,5$	$488,9 \pm 45,0$	$357,0 \pm 51,1$	$307,6 \pm 61,1$

Ejemplo 5. Perfiles farmacocinéticos de moduladores de CD47 en roedores CD47/SIRP α humanizados.

- 50 Este ejemplo ilustra un método para evaluar la eliminación farmacocinética de moduladores de CD47 (por ejemplo, anticuerpos anti-CD47) en roedores modificados para contener genes *CD47* humanizados (de acuerdo con el ejemplo 1) y *SIRP α* . En particular, los roedores CD47 humanizados descritos en el presente documento se modificaron para

contener además un gen *SIRPα* humanizado que contenía una parte endógena y una parte humana, cuya parte humana codifica el dominio extracelular de una proteína *SIRPα* humana (por ejemplo, los aminoácidos 28 a 362 de una proteína *SIRPα* humana) y cuya parte endógena codifica un dominio intracelular de una proteína *SIRPα* endógena (por ejemplo, aminoácidos que codifican las partes transmembrana e intracelular de una proteína *SIRPα* murina) como se describe en el documento PCT/US14/56910, presentado el 23 de septiembre de 2014. Se crearon ratones CD47/*SIRPα* doble humanizados mediante el cruce de ratones *SIRPα* humanizados con ratones CD47 humanizados. En este ejemplo, a los roedores (por ejemplo, ratones) doblemente humanizados CD47/*SIRPα* se les administraron diversos anticuerpos anti-CD47 y se determinaron sus perfiles farmacocinéticos correspondientes.

En resumen, los grupos de tipo silvestre ($n = 5$) y los ratones homocigotos para genes *CD47* y *SIRPα* humanizados ($CD47^{hu/hu}SIRPα^{hu/hu}$; $n = 5$ por grupo) se les administraron anticuerpos anti-CD47 seleccionados y un anticuerpo de control de isotipo IgG4 (hlgG4s). Los antecedentes genéticos de los ratones fueron 75 % CD57BL/6 y 25 % 129Sv. Todos los anticuerpos se administraron en una dosis subcutánea única de 50 mg/kg. Se recogió un presangrado un día antes de la administración del anticuerpo (día 0). Los sangrados postinyección se recogieron a las 6 horas, 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 7 días y 10 días. Las fracciones de suero de los sangrados se separaron y se sometieron a análisis de anticuerpos humanos totales mediante un inmunoensayo ELISA (descrito anteriormente). Adicionalmente, los niveles de hematocrito se midieron a las 6 horas, 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 7 días y 10 días y se realizó una prueba de orina según fue necesario (a las 6 horas y cuando el color de la orina se desvió del color amarillo) para determinar los recuentos de glóbulos rojos. Los resultados ilustrativos se muestran en las figuras 7 a 9.

Como se muestra en las figuras 7 y 8, todos los anticuerpos anti-CD47 demostraron eliminación mediada por diana en ratones $CD47^{hu/hu}SIRPα^{hu/hu}$ y, en particular, muchos demostraron perfiles farmacocinéticos similares. Además, una versión monovalente de un anticuerpo anti-CD47 (Ac F) demostró una mayor biodisponibilidad que su equivalente bivalente (Figura 8). Los inventores observaron perfiles farmacocinéticos similares para los anticuerpos entre múltiples experimentos con CD47 humanizado y animales doblemente humanizados (es decir, ratones $CD47^{hu/hu}SIRPα^{hu/hu}$).

El Ac J tuvo menos efecto en los niveles de hematocrito que otros anticuerpos anti-CD47 probados (Ac F, Ac G, Ac I, etc.) y cambios comparables en los niveles de hematocrito para controlar (hlgG4s) en ratones $CD47^{hu/hu}SIRPα^{hu/hu}$. Las mediciones del hematocrito en los días 2 a 4 mostraron la mayor caída con respecto al intervalo normal (-38,5-45,1 %), que incluyó los grupos administrados Ac F, G e I. En particular, una forma monovalente del Ac F demostró un efecto reductor retardado en el hematocrito en comparación con otros anticuerpos probados. Los inventores razonaron que las diferencias en los niveles de hematocrito entre los distintos grupos de tratamiento podrían atribuirse a una diferencia en el epítipo reconocido por los distintos anticuerpos. Además, los ratones a los que se les administraron anticuerpos anti-CD47 seleccionados demostraron pruebas positivas con tira reactiva en orina para hemo a las 6 horas. Por ejemplo, los grupos de tratamiento con Ac J y Ac F tuvieron cada uno un ratón positivo para hemo el día 1, mientras que todos los demás momentos fueron negativos. No se observó una pérdida de peso significativa (>20 %) en ningún grupo de tratamiento.

Considerado en conjunto, este ejemplo demuestra que los roedores de la presente invención proporcionan un sistema *in vivo* para evaluar las propiedades farmacocinéticas y/o perfiles de uno o más fármacos dirigidos a CD47 (por ejemplo, uno o más anticuerpos anti-CD47), tales como, por ejemplo, niveles circulantes del fármaco. Por otra parte, los roedores como se describe en el presente documento genomanipulados para contener además otros genes humanizados (por ejemplo, *SIRPα* humanizado) se pueden utilizar para evaluar la eliminación mediada por la diana de uno o más fármacos dirigidos a CD47.

EQUIVALENTES

Habiendo descrito así varios aspectos de al menos una realización de la presente invención, los expertos en la materia apreciarán que diversas alteraciones, modificaciones y mejoras se les ocurrirán fácilmente a los expertos en la materia. Dichas alteraciones, modificaciones y mejoras están destinadas a ser parte de la presente divulgación y están destinadas a estar dentro del alcance de la invención. En consecuencia, la descripción y los dibujos anteriores son sólo a modo de ejemplo y la invención se define mediante las reivindicaciones que siguen.

El uso de términos ordinales tales como "primero/a", "segundo/a", "tercero/a", etc., en las reivindicaciones para modificar un elemento de una reivindicación no denota por sí mismo ninguna prioridad, precedencia u orden de un elemento de una reivindicación respecto de otro, o el orden temporal para llevar a cabo los actos de un método, sino que se usan simplemente como marcadores para distinguir un elemento de una reivindicación que tiene un determinado nombre de otro elemento que tiene el mismo nombre (salvo por el uso del término ordinal) para distinguir los elementos de la reivindicación.

Los artículos "un" y "uno/a", como se usan en el presente documento en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones, a menos que se indique claramente lo contrario, deben entenderse que incluyen los referentes en plural. Las reivindicaciones o descripciones que incluyen "o" entre uno o más miembros de un grupo se consideran satisfechas si uno, más de uno, o todos los miembros del grupo están presentes en, se emplean en, o son de otro modo relevantes para un producto o un proceso dado a menos que se indique lo contrario o sea evidente de otro modo a partir del contexto. La divulgación incluye aspectos en los que exactamente un miembro del grupo está presente en,

se emplean en, o son de otro modo relevantes, para un producto o proceso dado. La divulgación incluye también aspectos en los que más de uno, o todos los miembros del grupo están presentes en, se emplean en, o son de otro modo relevantes, para un producto o proceso dado. Además, debe entenderse que la divulgación abarca todas las variaciones, combinaciones y permutaciones en las que una o más limitaciones, elementos, cláusulas, términos descriptivos, etc., de una o más de las reivindicaciones enumeradas se introduce en otra reivindicación dependiente de la misma reivindicación base (o, o según corresponda, cualquier otra reivindicación) a menos que se indique lo contrario o a menos que sea evidente para un experto en la materia que surja una contradicción o incoherencia. Cuando los elementos se presentan como listados, (por ejemplo, en el grupo Markush o en un formato similar) debe entenderse que también se divulga cada subgrupo de los elementos, y que pueden eliminarse cualquier elemento o elementos del grupo. Debe entenderse que, en general, cuando la invención, o aspectos de la divulgación, se refiere, o refieren, a comprender elementos particulares, características, etc., determinadas realizaciones de la invención o aspectos de la divulgación consisten, o consisten esencialmente en, dichos elementos, características, etc. Por motivos de simplicidad, estas realizaciones no se han expuesto específicamente en todos los casos en el presente documento con tantas palabras. También debe entenderse que cualquier aspecto de la divulgación puede excluirse explícitamente de las reivindicaciones, independientemente de si la exclusión específica se menciona en la memoria descriptiva.

Los expertos en la materia apreciarán los estándares típicos de desviación o error atribuibles a los valores obtenidos en ensayos u otros procesos descritos en el presente documento.

REIVINDICACIONES

1. Un vector de ácido nucleico de direccionamiento, que comprende

un brazo de homología en 5' que comprende una secuencia genómica cadena arriba del exón 2 de un gen *CD47* de ratón,
un fragmento de ADN genómico que comprende los exones 2 a 7 de un gen *CD47* humano,
un casete de selección de fármacos y
un brazo de homología en 3' que comprende una secuencia genómica cadena abajo del exón 7 de un gen *CD47* de ratón,

en donde los brazos de homología en 5' y en 3' median la integración del fragmento genómico que comprende los exones 2 a 7 de un gen *CD47* humano en un locus *CD47* de ratón.

2. El vector de ácido nucleico de direccionamiento de la reivindicación 1, en donde el fragmento genómico que comprende los exones 2 a 7 de un gen *CD47* humano codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 98 % de identidad con la secuencia de aminoácidos expuesta en los aminoácidos 16 a 292 de la SEQ ID NO: 10.

3. El vector de ácido nucleico de direccionamiento de la reivindicación 1 o 2, en donde el casete de selección de fármacos es un casete de selección de fármacos que se autoelimina.

4. Un roedor cuyo genoma comprende un gen *CD47* humanizado,

en donde el gen *CD47* humanizado codifica un polipéptido *CD47* humanizado que comprende una parte de un polipéptido *CD47* humano y una parte intracelular de un polipéptido *CD47* de roedor;
en donde la parte del polipéptido *CD47* humano comprende el dominio extracelular y los dominios transmembrana del polipéptido *CD47* humano, y está codificada por los exones 2 a 7 de un gen *CD47* humano;
en donde la parte intracelular del polipéptido *CD47* de roedor está codificada por los exones cadena abajo del exón 7 de un gen *CD47* de roedor;
en donde el gen *CD47* humanizado está operativamente unido a un promotor *CD47* de roedor; y
en donde el genoma de roedor comprende además uno o más genes humanos o humanizados seleccionados de SIRP α , IL-3, M-CSF, GM-CSF y TPO.

5. El roedor de la reivindicación 4, en donde el gen *CD47* humanizado se forma a partir de una sustitución de un fragmento genómico que comprende los exones 2 a 7 de un gen *CD47* endógeno de roedor en un locus *CD47* endógeno de roedor, con un fragmento genómico que comprende los exones 2 a 7 del gen *CD47* humano.

6. El roedor de la reivindicación 4 o 5, en donde el fragmento genómico que comprende los exones 2 a 7 de un gen *CD47* humano codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 98 % de identidad con la secuencia de aminoácidos expuesta en los aminoácidos 16 a 292 de la SEQ ID NO: 10.

7. El roedor de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, en donde el roedor es un ratón o una rata.

8. Una célula o tejido aislado del roedor de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7, en donde la célula o tejido aislado comprende el gen *CD47* humanizado y uno o más genes humanos o humanizados en el genoma.

9. Una célula madre embrionaria (ME) de roedor aislada, cuyo genoma comprende un gen *CD47* humanizado,

en donde el gen *CD47* humanizado codifica un polipéptido *CD47* humanizado que comprende una parte de un polipéptido *CD47* humano y una parte intracelular de un polipéptido *CD47* de roedor;
en donde la parte del polipéptido *CD47* humano comprende el dominio extracelular y los dominios transmembrana del polipéptido *CD47* humano, y está codificada por los exones 2 a 7 de un gen *CD47* humano;
en donde la parte intracelular del polipéptido *CD47* de roedor está codificada por los exones cadena abajo del exón 7 de un gen *CD47* de roedor;
en donde el gen *CD47* humanizado está operativamente unido a un promotor *CD47* de roedor; y
en donde el genoma de la célula ME de roedor comprende además uno o más genes humanos o humanizados seleccionados de SIRP α , IL-3, M-CSF, GM-CSF y TPO.

10. La célula ME de roedor de la reivindicación 9, que es una célula ME de ratón o una célula ME de rata.

11. Un embrión de roedor que comprende la célula ME de roedor de acuerdo con la reivindicación 9 o 10.

12. Un método para evaluar las propiedades farmacocinéticas de un fármaco dirigido al *CD47* humano, comprendiendo el método:

(i) administrar un fármaco candidato dirigido al CD47 humano a un roedor cuyo genoma comprende un gen *CD47* humanizado,

5 en donde el gen *CD47* humanizado codifica un polipéptido CD47 humanizado que comprende una parte de un polipéptido CD47 humano y una parte intracelular de un polipéptido CD47 de roedor;

en donde la parte del polipéptido CD47 humano comprende el dominio extracelular y los dominios transmembrana del polipéptido CD47 humano, y está codificada por los exones 2 a 7 de un gen *CD47* humano; en donde la parte intracelular del polipéptido CD47 de roedor está codificada por los exones cadena abajo del exón 7 de un gen *CD47* de roedor; y

10 en donde el gen *CD47* humanizado está operativamente unido a un promotor CD47 de roedor; y

(ii) realizar uno o más ensayos para evaluar las propiedades farmacocinéticas del fármaco candidato.

13. El método de la reivindicación 12, en donde:

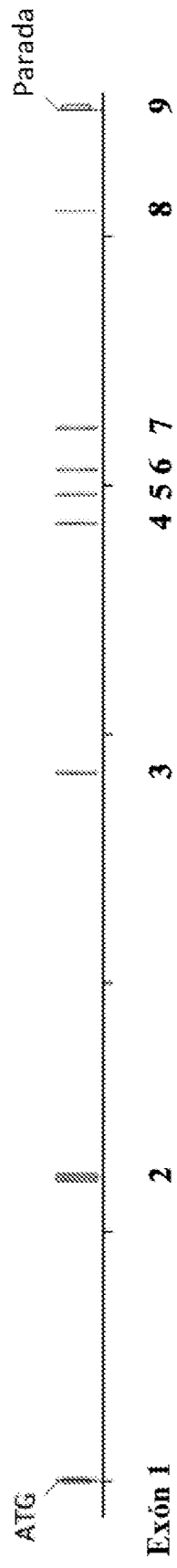
15 (a) el fragmento genómico que comprende los exones 2 a 7 de un gen *CD47* humano codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 98 % de identidad con la secuencia de aminoácidos expuesta en los aminoácidos 16 a 292 de la SEQ ID NO: 10; y/o

20 (b) el genoma de roedor comprende además uno o más genes humanos o humanizados seleccionados de SIRPα, IL-3, M-CSF, GM-CSF y TPO.

14. El método de la reivindicación 12 o 13, en donde el fármaco candidato es un anticuerpo dirigido al CD47 humano.

15. El método de la reivindicación 12 o 13, en donde el roedor es una rata o un ratón.

CD47 de ratón



CD47 humano

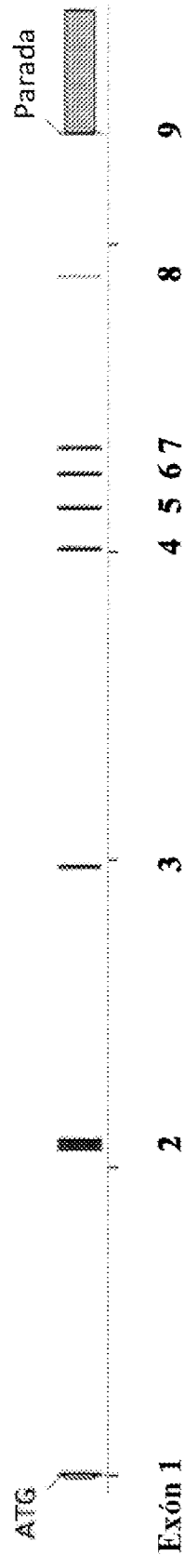


Figura 1

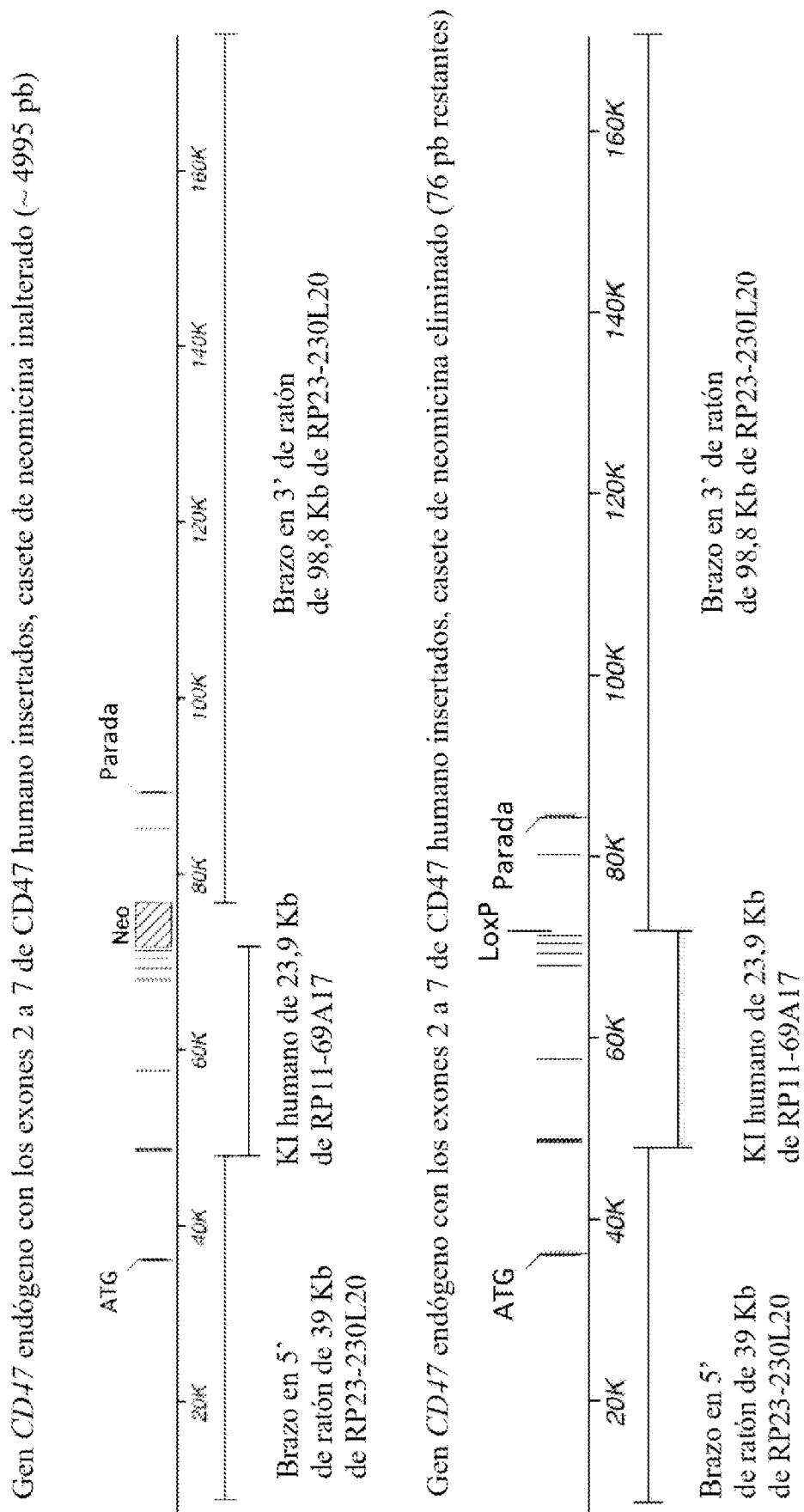
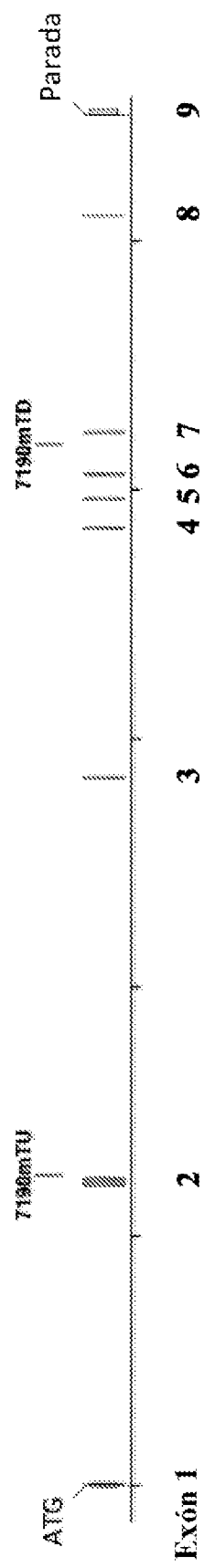


Figura 2

CD47 de ratón



CD47 humano

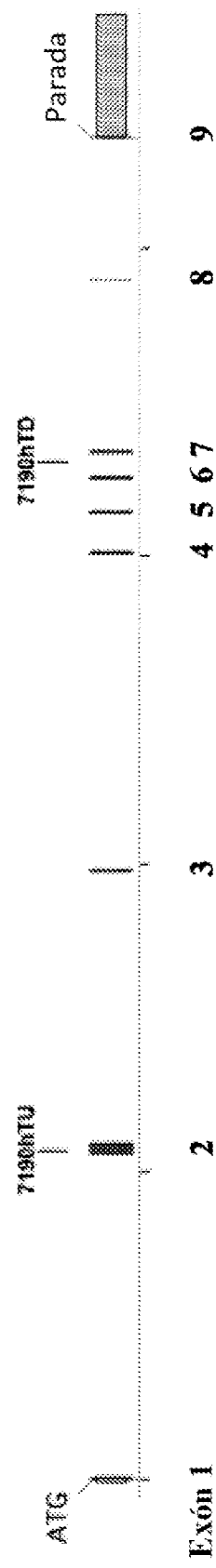


Figura 3

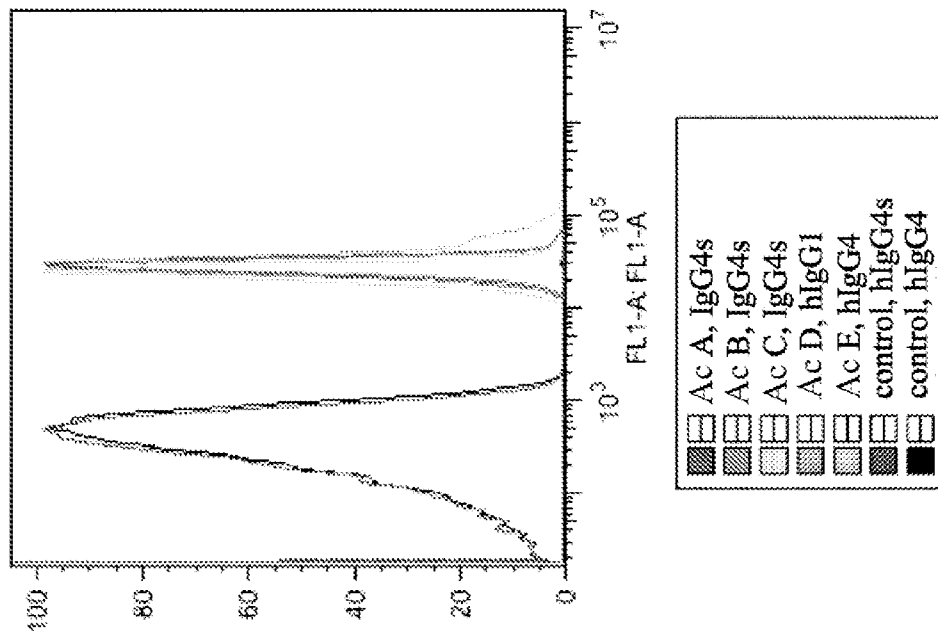


Figura 4

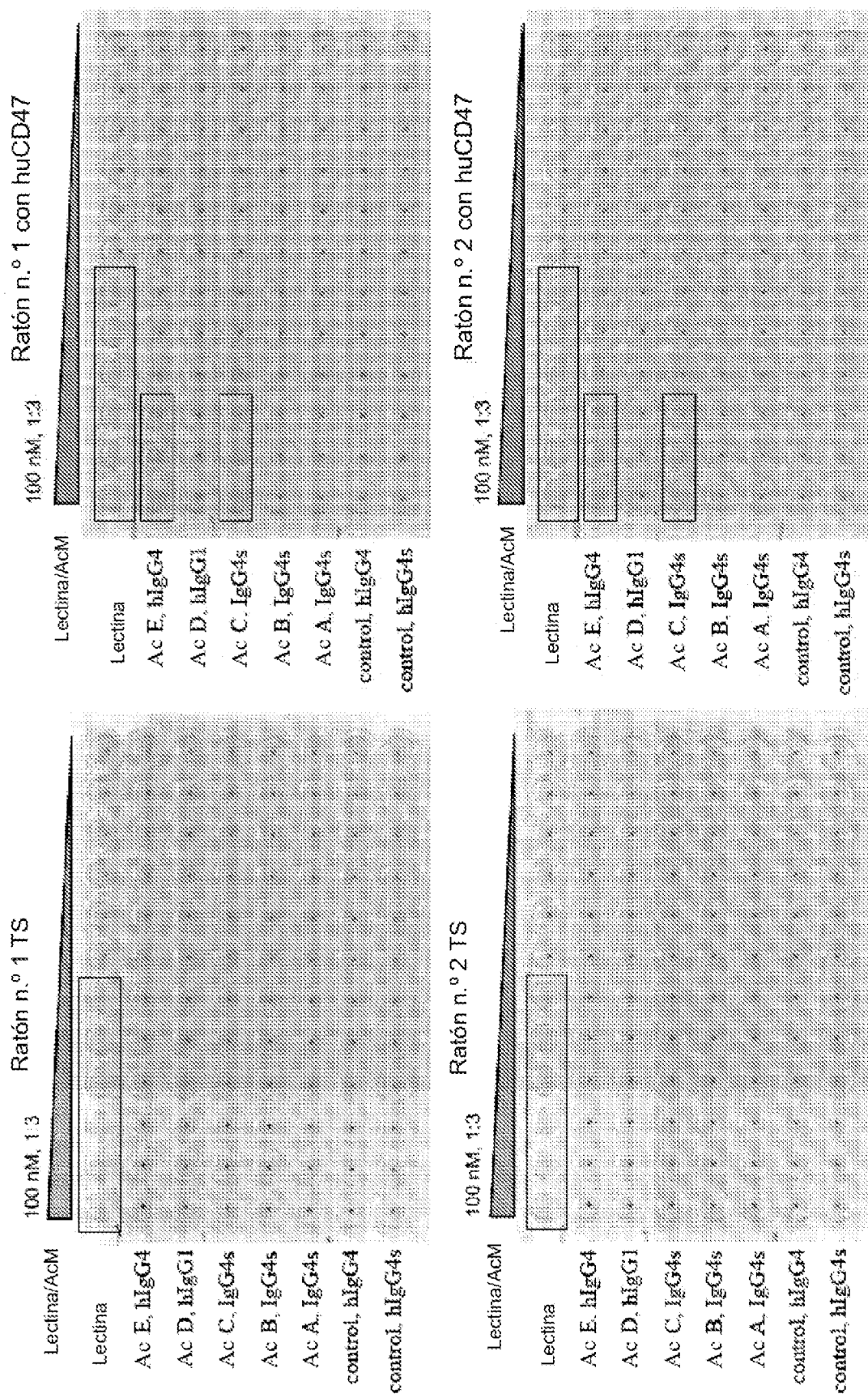


Figura 5

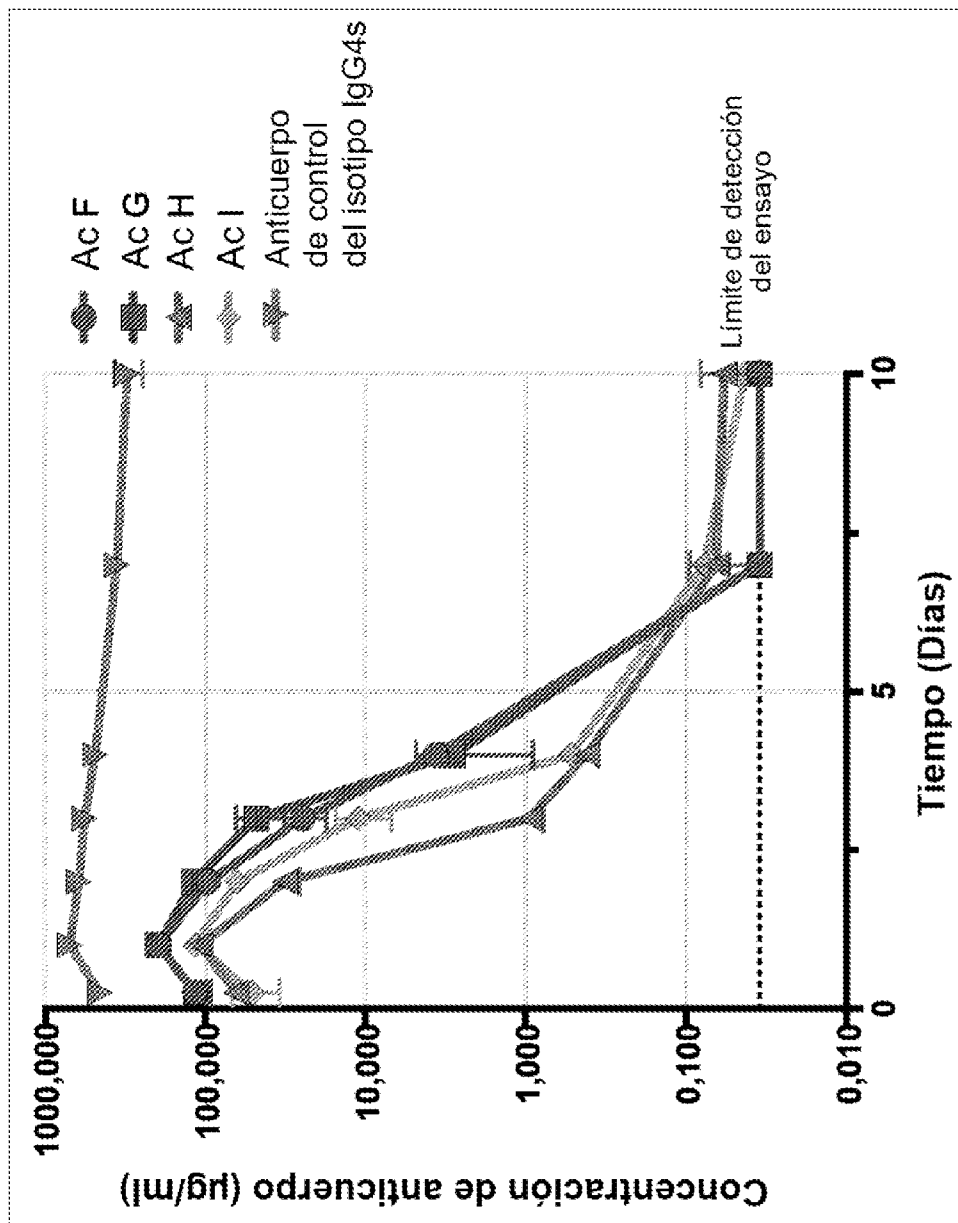


Figura 6

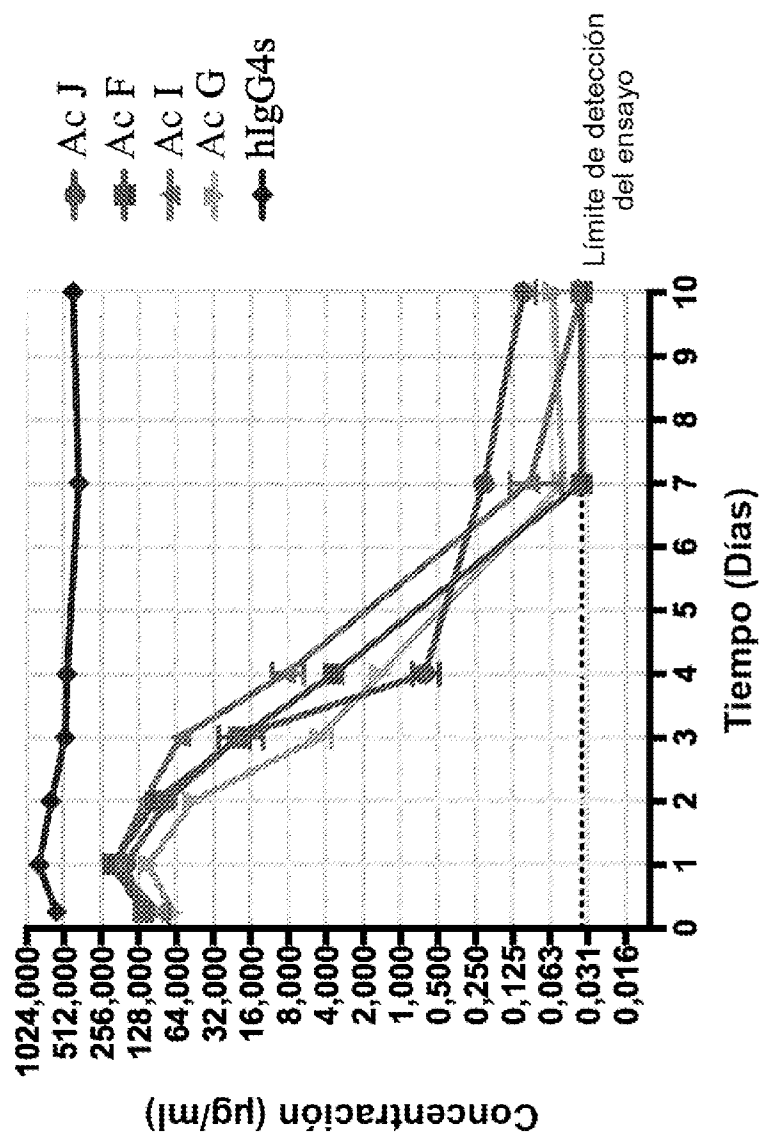


Figura 7

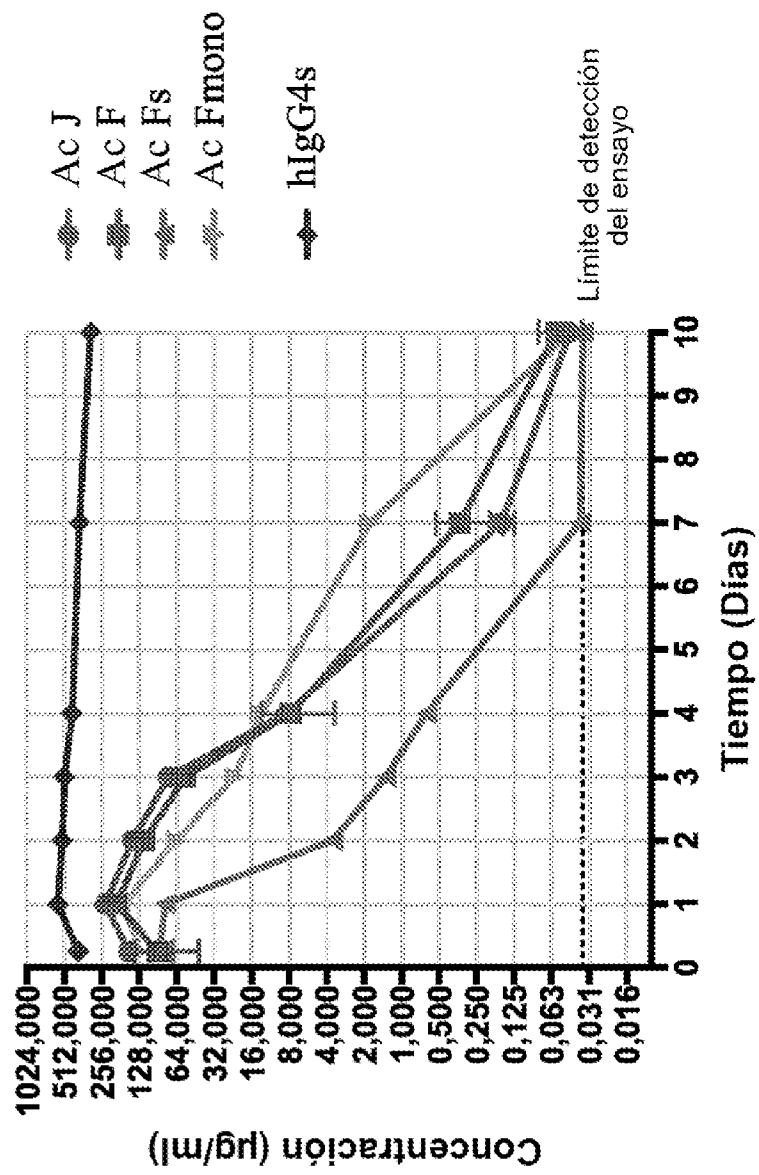


Figura 8

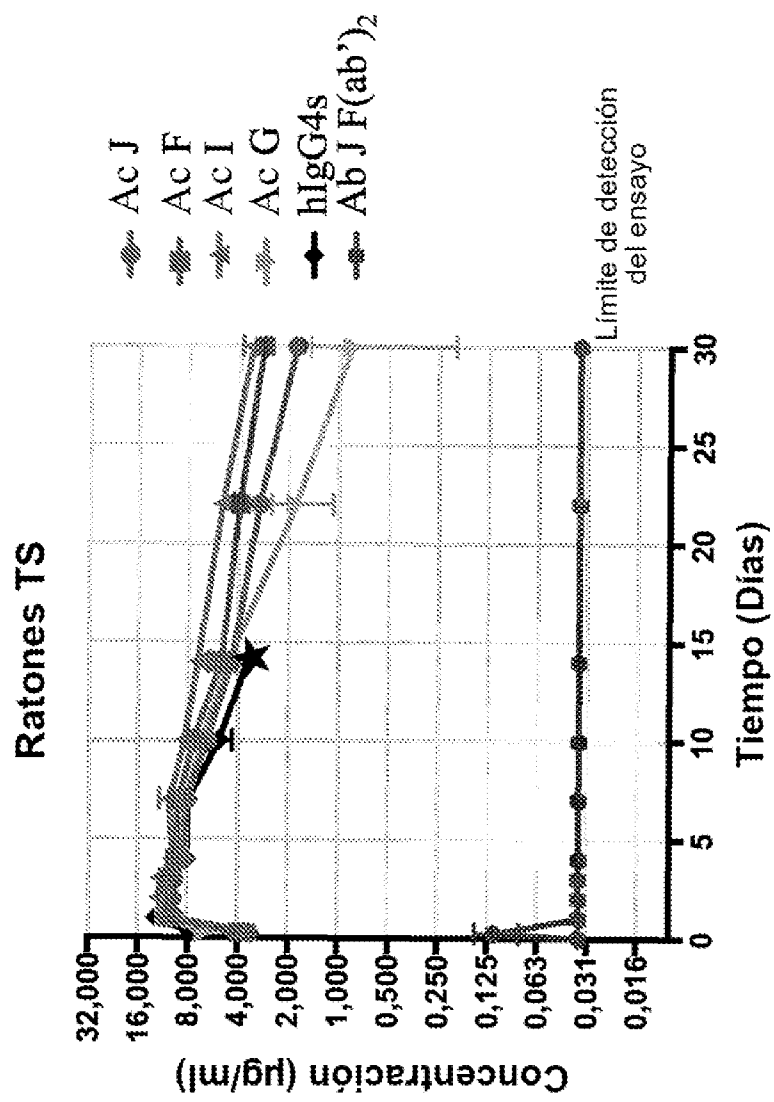


Figura 9