



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0021135  
(43) 공개일자 2018년02월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
*C12N 15/85* (2006.01) *A01K 67/027* (2006.01)  
*A61K 48/00* (2006.01)

(52) CPC특허분류  
*C12N 15/85* (2013.01)  
*A01K 67/027* (2013.01)

(21) 출원번호 10-2018-7002387

(22) 출원일자(국제) 2016년06월30일  
심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2018년01월25일

(86) 국제출원번호 PCT/US2016/040431

(87) 국제공개번호 WO 2017/004388  
국제공개일자 2017년01월05일

(30) 우선권주장  
62/187,040 2015년06월30일 미국(US)

(71) 출원인  
리젠크 오브 더 유니버시티 오브 미네소타  
미국 55455 미네소타주 미니애폴리스 스위트 600  
오크 스트리트 에스터 200 맥나마라 알럽니 센터

(72) 발명자  
케리, 다니엘 제이.  
미국 55122 미네소타주 이건 리버튼 포인트 1660  
케리, 마리 지.  
미국 55122 미네소타주 이건 리버튼 포인트 1660  
고야노-나카가와, 나오코  
미국 55126 미네소타주 쇼어뷰 털러 레인 980

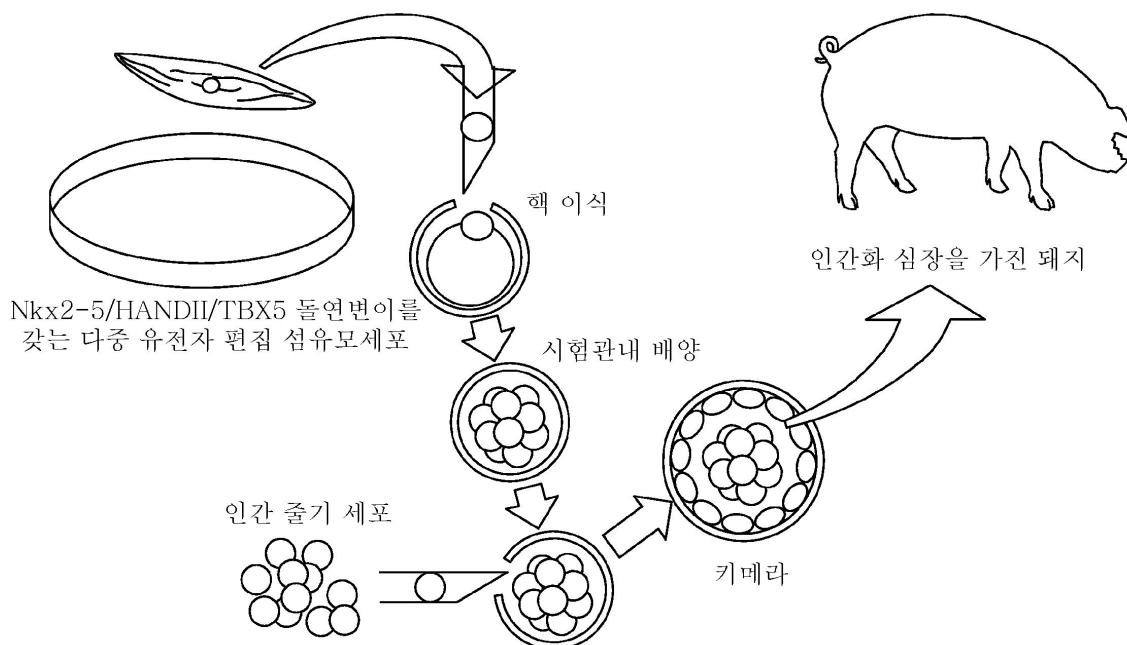
(74) 대리인  
양예준 김영

전체 청구항 수 : 총 14 항

#### (54) 발명의 명칭 인간화 심장 근육

### (57) 요약

대 표 도



TBX5 또는 그의 조합 널 비-인간 동물 세포로부터의 핵을 제핵 비-인간 난모세포 내로 융합시키는 것 및 상기 난모세포를 활성화시켜 NKX2-5, HANDII, TBX5 또는 그의 조합 널 비-인간 배반포를 형성하도록 분열시키는 것을 포함하는 체세포 핵 이식에 의해 NKX2-5, HANDII, TBX5 또는 그의 조합 널 비-인간 배반포를 창출하는 단계; c) 인간 줄기 세포를 b)의 NKX2-5, HANDII, TBX5 또는 조합 널 비-인간 배반포 내로 도입시키는 단계; 및 d) c)로부터의 상기 배반포를 가임신 대리로 비-인간 동물 내로 이식시켜 인간 NKX2-5, HANDII, TBX5 또는 그의 조합을 발현하는 키메라 비-인간 동물을 생성하는 단계를 포함하는, 인간 NKX2-5, HANDII, TBX5 유전자 또는 그의 조합 유전자를 발현하는 키메라 비-인간 동물을 생산하는 방법을 기술한다.

(52) CPC특허분류

*A01K 67/0271* (2013.01)

*A01K 67/0276* (2013.01)

*A61K 48/00* (2013.01)

*A01K 2217/00* (2013.01)

*A01K 2217/15* (2013.01)

*A01K 2227/108* (2013.01)

*A01K 2267/025* (2013.01)

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

계놈이 NKX2-5 유전자, HANDII 유전자, TBX5 유전자 또는 그의 조합의 양쪽 대립유전자에 돌연변이를 보유하여 비-인간 동물 세포 또는 배반포에는 기능적 NKX2-5 단백질, HANDII 단백질, TBX5 단백질 또는 그의 조합이 결여된 것인 비-인간 동물 세포, 상실배 또는 배반포.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, 돌연변이가 NKX2-5 유전자, HANDII 유전자, TBX5 유전자 또는 그의 조합의 결실인 비-인간 동물 세포, 상실배 또는 배반포.

#### 청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 비-인간 동물 세포 또는 배반포가 돼지, 소, 말 또는 염소인 비-인간 동물 세포, 상실배 또는 배반포.

#### 청구항 4

인간 NKX2-5, HANDII, TBX5 또는 그의 조합을 발현하며 비-인간 동물 NKX2-5, HANDII, TBX5 또는 그의 조합의 발현이 결여된 키메라 비-인간 동물, 상실배 또는 배반포.

#### 청구항 5

제4항에 있어서, 비-인간 동물이 인간화 심장 세포 및/또는 조직을 생산하는 것인 키메라 비-인간 동물.

#### 청구항 6

외인성 돼지 NKX2-5, HANDII, TBX5 또는 그의 조합을 발현하며 내인성 돼지 NKX2-5, HANDII, TBX5 또는 그의 조합의 발현이 결여된 키메라 돼지 (돼지-돼지 키메라).

#### 청구항 7

제4항 또는 제5항에 있어서, 비-인간 동물이 돼지, 소, 말 또는 염소인 키메라 비-인간 동물.

#### 청구항 8

a) NKX2-5, HANDII, TBX5 또는 그의 조합 널(null) 비-인간 동물 세포를 생성하는 단계로서, 여기서 비-인간 NKX2-5 유전자, HANDII 유전자, TBX5 유전자 또는 그의 조합 유전자의 양쪽 카피는 기능적 NKX2-5 단백질, HANDII 단백질, TBX5 단백질 또는 그의 조합의 생산을 방지하는 돌연변이를 보유하는 것인 단계;

b) a)의 상기 NKX2-5, HANDII, TBX5 또는 그의 조합 널 비-인간 세포로부터의 핵을 제핵 비-인간 난모세포 내로 융합시키는 것 및 상기 난모세포를 활성화시켜 NKX2-5, HANDII, TBX5 또는 그의 조합 널 비-인간 상실배 또는 배반포를 형성하도록 분열시키는 것을 포함하는 체세포 핵 이식에 의해 NKX2-5, HANDII, TBX5 또는 그의 조합 널 비-인간 상실배 또는 배반포를 창출하는 단계;

c) 인간 줄기 세포를 b)의 비-인간 NKX2-5, HANDII, TBX5 또는 그의 조합 널 상실배 또는 배반포 내로 도입시키는 단계; 및

d) c)로부터의 상기 상실배 또는 배반포를 가임신 대리모 비-인간 동물 내로 이식시켜 인간 NKX2-5, HANDII, TBX5 또는 그의 조합을 발현하는 키메라 비-인간 동물을 생성하는 단계

를 포함하는, 인간 NKX2-5 유전자, HANDII 유전자, TBX5 유전자 또는 그의 조합을 발현하는 키메라 비-인간 동물을 생산하는 방법.

#### 청구항 9

a) NKX2-5, HANDII, TBX5 또는 그의 조합 널 돼지 세포를 생성하는 단계로서, 여기서 내인성 돼지 MYF5 유전자, MYOD 유전자, MRF4 유전자 또는 그의 조합 유전자의 양쪽 카피는 기능적 내인성 돼지 MYF5 단백질, MYOD 단백질, MRF4 단백질 또는 그의 조합의 생산을 방지하는 돌연변이를 보유하는 것인 단계;

b) a)의 상기 NKX2-5, HANDII, TBX5 또는 그의 조합 널 돼지 세포로부터의 핵을 제핵 돼지 난모세포 내로 융합시키는 것 및 상기 난모세포를 활성화시켜 NKX2-5, HANDII, TBX5 또는 그의 조합 널 돼지 상실배 또는 배반포를 형성하도록 분열시키는 것을 포함하는 체세포 핵 이식에 의해 NKX2-5, HANDII, TBX5 또는 그의 조합 널 돼지 상실배 또는 배반포를 창출하는 단계;

c) 돼지 줄기 세포를 b)의 돼지 NKX2-5, HANDII, TBX5 또는 그의 조합 널 상실배 또는 배반포 내로 도입시키는 단계; 및

d) c)로부터의 상기 상실배 또는 배반포를 가임신 대리모 돼지 내로 이식시켜 외인성 돼지 NKX2-5, HANDII, TBX5 또는 그의 조합을 발현하는 키메라 돼지를 생성하는 단계

를 포함하는, 외인성 NKX2-5 유전자, HANDII 유전자, TBX5 유전자 또는 그의 조합을 발현하는 키메라 돼지를 생산하는 방법.

## 청구항 10

a) NKX2-5, HANDII, TBX5 또는 그의 조합 널 비-인간 세포를 생성하는 단계로서, 여기서 비-인간 NKX2-5 유전자, HANDII 유전자, TBX5 유전자 또는 그의 조합의 양쪽 대립유전자는 기능적 비-인간 NKX2-5 단백질, HANDII 단백질, TBX5 단백질 또는 그의 조합의 생산을 방지하는 돌연변이를 보유하는 것인 단계;

b) a)의 상기 MYF5, MYOD, MRF4 또는 그의 조합 널 비-인간 세포로부터의 핵을 제핵 비-인간 동물 난모세포 내로 융합시키는 것 및 상기 난모세포를 활성화시켜 NKX2-5, HANDII, TBX5 또는 그의 조합 널 비-인간 동물 배반포를 형성하도록 분열시키는 것을 포함하는 체세포 핵 이식에 의해 NKX2-5, HANDII, TBX5 또는 그의 조합 널 비-인간 상실배 또는 배반포를 창출하는 단계;

c) 인간 줄기 세포를 b)의 NKX2-5, HANDII, TBX5 또는 그의 조합 널 비-인간 동물 배반포 또는 상실배 내로 도입시키는 단계; 및

d) 인간 또는 인간화 심장 세포를 발현하는 비-인간 동물을 생성하도록 c)로부터의 상기 배반포 또는 상실배를 가임신 대리모 비-인간 동물 내로 이식시키는 단계

를 포함하는, 비-인간 동물에서 인간 또는 인간화 심장 세포를 생산하는 방법.

## 청구항 11

제8항 또는 제10항에 있어서, 비-인간 동물이 돼지, 소, 말 또는 염소인 방법.

## 청구항 12

제8항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 인간 줄기 세포가 조직 특이적 줄기 세포, 만능성 줄기 세포, 다능성 성체 줄기 세포, 유도된 만능성 줄기 세포 또는 제대혈 줄기 세포 (UCBSC)인 방법.

## 청구항 13

제8항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 유도된 만능성 세포가 섬유모세포 세포로부터 형성된 것인 방법.

## 청구항 14

제8항 내지 제13항 중 어느 한 항의 방법에 의해 생산된 비-인간 동물.

## 발명의 설명

### 기술 분야

[0001] 우선권 주장

[0002] 본 출원은 2015년 6월 30일 출원된 미국 특허 출원 번호 62/187,040의 우선권의 이익을 주장하고, 본원에서는

그의 우선권의 이익이 주장되며, 상기 출원은 그 전문이 본원에서 참조로 포함된다.

## 배경기술

[0003] 전체 신생아 중 대략 1%가 선천성 심장 질환 (CHD)을 앓고 있으며, 상기 질환은 상당한 질병률과 사망률을 가지고 있다 (1-5). 심혈관 질환이 전 세계 사망 원인의 1위를 차지하고 있으며, 이는 미국에서는 1900년 이래로 매년 가장 흔한 사망 원인이 되고 있다. 오늘날, 성인 3명당 1명이 심혈관 질환을 앓는 채로 살고 있다. 마지막으로, 선천성 심장 결함은 일반 인구에서 가장 흔한 형태의 선천적 결함이며, 소아 및 성인 인구에서의 진행성 또는 말기 심장 부전의 원인이 된다. 선천성 심장 질환 및 다른 심혈관 질환은 심장 부전으로 진행될 수 있다. 말기 심장 부전에 대한 유일한 치유법은 심장 이식이지만, 이식을 위한 기관 부족으로 인해 비교적 적은 환자가 상기 구명 요법을 받고 있다. 심장 이식을 받은 환자는 심장 거부를 방지하기 위해 약물 요법을 필요로 하며, 이러한 약물 요법은 대개, 생존을 제한하기도 하는 장기간의 부작용을 일으킨다.

## 발명의 내용

[0004] 본원에서는 임상 적용을 위한 개인맞춤형 인간/인간화 심근 조직/심근 세포 생산을 위한 숙주로서의 NKX2-5/HANDII/TBX5 네아웃 돼지 또는 다른 동물, 예컨대 암소 또는 염소의 개발을 기술한다.

[0005] 유전자 편집 기술 사용으로 NKX2-5/HANDII/TBX5 널(nu11) 돼지 배아가 생성되어 왔고, 본 발명자들은 인간 줄기 세포를 사용하여 인간-동물 키메라를 생산하여 왔다. NKX2-5/HANDII/TBX5에 대한 다중 유전자 편집을 수행함으로써 만능성 능력이 있는 인간 세포를 사용하여 심장 재증식을 위한 허용 니치를 제공할 수 있으며, 이로써, 인간화 심장 세포 및/또는 조직 (기관, 예컨대 심장 포함)을 수득할 수 있다.

[0006] 한 실시양태는, 계놈이 NKX2-5 유전자, HANDII 유전자, TBX5 유전자 또는 그의 조합의 양쪽 대립유전자에 돌연변이를 보유하여 비-인간 동물 세포, 상실배 또는 배반포에는 기능적 NKX2-5 단백질, HANDII 단백질, TBX5 단백질 또는 그의 조합이 결여된 것인 비-인간 동물 세포, 상실배 또는 배반포를 제공한다. 한 실시양태에서, 돌연변이는 NKX2-5 유전자, HANDII 유전자, TBX5 유전자 또는 그의 조합의 결실이다. 또 다른 실시양태에서, 비-인간 동물 세포, 상실배 또는 배반포는 돼지, 소, 말 또는 염소이다.

[0007] 한 실시양태는 인간 NKX2-5, HANDII, TBX5 또는 그의 조합을 발현하며 비-인간 동물 NKX2-5, HANDII, TBX5 또는 그의 조합의 발현이 결여된 키메라 비-인간 동물 상실배 또는 배반포를 제공한다. 한 실시양태에서, 비-인간 동물은 인간화 심장 세포 및/또는 조직을 생산한다.

[0008] 한 실시양태는 외인성 돼지 NKX2-5, HANDII, TBX5 또는 그의 조합을 발현하며 내인성 돼지 NKX2-5, HANDII, TBX5 또는 그의 조합의 발현이 결여된 키메라 돼지 (돼지-돼지 키메라)를 제공한다. 한 실시양태에서, 비-인간 동물은 돼지, 소, 말 또는 염소이다.

[0009] 한 실시양태는 a) NKX2-5, HANDII, TBX5 또는 그의 조합 널 비-인간 동물 세포를 생성하는 단계로서, 여기서 비-인간 NKX2-5 유전자, HANDII 유전자, TBX5 유전자 또는 그의 조합 유전자의 양쪽 카피는 기능적 NKX2-5 단백질, HANDII 단백질, TBX5 단백질 또는 그의 조합의 생산을 방지하는 돌연변이를 보유하는 것인 단계; b) a)의 상기 NKX2-5, HANDII, TBX5 또는 그의 조합 널 비-인간 세포로부터의 핵을 제핵 비-인간 난모세포 내로 융합시키는 것 및 상기 난모세포를 활성화시켜 NKX2-5, HANDII, TBX5 또는 그의 조합 널 비-인간 상실배 또는 배반포를 형성하도록 분열시키는 것을 포함하는 체세포 핵 이식에 의해 NKX2-5, HANDII, TBX5 또는 그의 조합 널 비-인간 상실배 또는 배반포를 창출하는 단계; c) 인간 줄기 세포를 b)의 비-인간 NKX2-5, HANDII, TBX5 또는 그의 조합 널 상기 상실배 또는 배반포 내로 도입시키는 단계; 및 d) c)로부터의 상기 상실배 또는 배반포를 가임신 대리모 비-인간 동물 내로 이식시켜 인간 NKX2-5, HANDII, TBX5 또는 그의 조합을 발현하는 키메라 비-인간 동물을 생성하는 단계를 포함하는, 인간 NKX2-5 유전자, HANDII 유전자, TBX5 유전자 또는 그의 조합을 발현하는 키메라 비-인간 동물을 생산하는 방법을 제공한다.

[0010] 또 다른 실시양태는 a) NKX2-5, HANDII, TBX5 또는 그의 조합 널 돼지 세포를 생성하는 단계로서, 여기서 내인성 돼지 MYF5 유전자, MYOD 유전자, MRF4 유전자 또는 그의 조합 유전자의 양쪽 카피는 기능적 내인성 돼지 MYF5 단백질, MYOD 단백질, MRF4 단백질 또는 그의 조합의 생산을 방지하는 돌연변이를 보유하는 것인 단계; b) a)의 상기 NKX2-5, HANDII, TBX5 또는 그의 조합 널 돼지 세포로부터의 핵을 제핵 돼지 난모세포 내로 융합시키는 것 및 상기 난모세포를 활성화시켜 NKX2-5, HANDII, TBX5 또는 그의 조합 널 돼지 상실배 또는 배반포를 형성하도록 분열시키는 것을 포함하는 체세포 핵 이식에 의해 NKX2-5, HANDII, TBX5 또는 그의 조합 널 돼지 상실배 또는 배반포를 창출하는 단계; c) 돼지 줄기 세포를 b)의 돼지 NKX2-5, HANDII, TBX5 또는 그의 조합 널 상

실배 또는 배반포 내로 도입시키는 단계; 및 d) c)로부터의 상기 상실배 또는 배반포를 가임신 대리모 돼지 내로 이식시켜 외인성 돼지 NKX2-5, HANDII, TBX5 또는 그의 조합을 발현하는 키메라 돼지를 생성하는 단계를 포함하는, 외인성 NKX2-5 유전자, HANDII 유전자, TBX5 유전자 또는 그의 조합을 발현하는 키메라 돼지를 생산하는 방법을 제공한다.

[0011] 또 다른 실시양태는 a) NKX2-5, HANDII, TBX5 또는 그의 조합 널 비-인간 세포를 생성하는 단계로서, 여기서 비-인간 NKX2-5 유전자, HANDII 유전자, TBX5 유전자 또는 그의 조합의 양쪽 대립유전자는 기능적 비-인간 NKX2-5 단백질, HANDII 단백질, TBX5 단백질 또는 그의 조합의 생산을 방지하는 돌연변이를 보유하는 것인 단계; b) a)의 상기 MYF5, MYOD, MRF4 또는 그의 조합 널 비-인간 세포로부터의 핵을 제핵 비-인간 동물 난모세포 내로 융합시키는 것 및 상기 난모세포를 활성화시켜 NKX2-5, HANDII, TBX5 또는 그의 조합 널 비-인간 동물 상실배 또는 배반포를 형성하도록 분열시키는 것을 포함하는 체세포 핵 이식에 의해 NKX2-5, HANDII, TBX5 또는 그의 조합 널 비-인간 상실배 또는 배반포를 창출하는 단계; c) 인간 줄기 세포를 b)의 NKX2-5, HANDII, TBX5 또는 그의 조합 널 비-인간 동물 배반포 또는 상실배 내로 도입시키는 단계; 및 d) 인간 또는 인간화 심장 세포를 발현하는 비-인간 동물을 생성하도록 c)로부터의 상기 배반포 또는 상실배를 가임신 대리모 돼지 내로 이식시키는 단계를 포함하는, 비-인간 동물에서 인간 또는 인간화 심장 세포를 생산하는 방법을 제공한다.

[0012] 한 실시양태에서, 비-인간 동물은 돼지, 소, 말 또는 염소이다. 또 다른 실시양태에서, 인간 줄기 세포는 조직 특이적 줄기 세포, 만능성 줄기 세포, 다능성 성체 줄기 세포, 유도된 만능성 줄기 세포 또는 제대혈 줄기 세포 (UCBSC)이다. 또 다른 실시양태에서, 유도된 만능성 세포는 섬유모세포 세포로부터 형성된다.

[0013] 한 실시양태는, 계놈이 NKX2-5 유전자, HANDII 유전자, TBX5 유전자 또는 그의 조합의 양쪽 대립유전자에 돌연변이를 보유하여 돼지 세포 또는 배반포에는 기능적 NKX2-5 단백질, HANDII 단백질, TBX5 단백질 또는 그의 조합이 결여된 것인 돼지 세포, 상실배 또는 배반포를 제공한다. 한 실시양태에서, 돌연변이는 NKX2-5 유전자, HANDII 유전자, TBX5 유전자 또는 그의 조합의 결실이다.

[0014] 한 실시양태는 인간 NKX2-5, HANDII, TBX5 또는 그의 조합을 발현하며 돼지 NKX2-5, HANDII, TBX5 또는 그의 조합의 발현이 결여된 키메라 돼지를 제공한다. 한 실시양태에서, 키메라 돼지는 인간화 심장 세포 및/또는 조직을 생산한다.

[0015] 한 실시양태는 a) NKX2-5, HANDII, TBX5 또는 그의 조합 널 돼지 세포를 생성하는 단계로서, 여기서 돼지 NKX2-5 유전자, HANDII 유전자, TBX5 유전자 또는 그의 조합 유전자의 양쪽 카피는 기능적 돼지 NKX2-5 단백질, HANDII 단백질, TBX5 단백질 또는 그의 조합의 생산을 방지하는 돌연변이를 보유하는 것인 단계; b) a)의 상기 NKX2-5, HANDII, TBX5 또는 그의 조합 널 돼지 세포로부터의 핵을 제핵 돼지 난모세포 내로 융합시키는 것 및 상기 난모세포를 활성화시켜 NKX2-5, HANDII, TBX5 또는 그의 조합 널 돼지 상실배 또는 배반포를 형성하도록 분열시키는 것을 포함하는 체세포 핵 이식에 의해 NKX2-5, HANDII, TBX5 또는 그의 조합 널 돼지 상실배 또는 배반포를 창출하는 단계; c) 인간 줄기 세포를 b)의 돼지 NKX2-5, HANDII, TBX5 또는 그의 조합 널 상실배 또는 배반포 내로 도입시키는 단계; 및 d) c)로부터의 상기 상실배 또는 배반포를 가임신 대리모 돼지 내로 이식시켜 인간 NKX2-5, HANDII, TBX5 또는 그의 조합을 발현하는 키메라 돼지를 생성하는 단계를 포함하는, 인간 NKX2-5 유전자, HANDII 유전자, TBX5 유전자 또는 그의 조합을 발현하는 키메라 돼지를 생산하는 방법을 제공한다.

[0016] 또 다른 실시양태는 a) NKX2-5, HANDII, TBX5 또는 그의 조합 널 돼지 세포를 생성하는 단계로서, 여기서 돼지 NKX2-5 유전자, HANDII 유전자, TBX5 유전자 또는 그의 조합의 양쪽 대립유전자는 기능적 돼지 NKX2-5 단백질, HANDII 단백질, TBX5 단백질 또는 그의 조합의 생산을 방지하는 돌연변이를 보유하는 것인 단계; b) a)의 상기 MYF5, MYOD, MRF4 또는 그의 조합 널 돼지 세포로부터의 핵을 제핵 돼지 난모세포 내로 융합시키는 것 및 상기 난모세포를 활성화시켜 NKX2-5, HANDII, TBX5 또는 그의 조합 널 돼지 상실배 또는 배반포를 형성하도록 분열시키는 것을 포함하는 체세포 핵 이식에 의해 NKX2-5, HANDII, TBX5 또는 그의 조합 널 돼지 상실배 또는 배반포를 창출하는 단계; c) 인간 줄기 세포를 b)의 돼지 NKX2-5, HANDII, TBX5 또는 그의 조합 널 배반포 내로 도입시키는 단계; 및 d) 인간화 심장 세포를 발현하는 돼지를 생성하도록 c)로부터의 상기 배반포를 가임신 대리모 돼지 내로 이식시키는 단계를 포함하는, 돼지에서 인간화 심장 세포를 생산하는 방법을 제공한다. 한 실시양태에서, 인간 줄기 세포는 인간 유도된 만능성 줄기 세포, 인간 만능성 줄기 세포 또는 인간 제대혈 줄기 세포이다. 또 다른 실시양태에서, 인간 유도된 만능성 세포는 섬유모세포 세포로부터 형성된다.

[0017] 인간 또는 인간화 조직 및 기관을 각 수혜자의 면역 복합체에 맞게 개인맞춤화하는 것이 유용할 것이다. 본원에서 논의되는 바와 같이, 숙주로서 큰 동물을 사용하고, 표적 기관의 성장 및/또는 분화를 담당하는 유전자를 넉 아웃시키거나, 또는 약화시키도록 상기 동물의 계놈을 편집하고, 배반포기 또는 접합기에 상기 동물에 공여

자 줄기 세포를 접종하여 기관의 성장 및 발생을 위한 유전적 정보로서 소실된 것을 상보함으로써 상기와 같은 개인맞춤화를 수행할 수 있다. 본 결과는 상보된 조직 (인간/인간화 기관)이 공여자의 유전자형 및 표현형과 매칭되는 것인 키메라 동물이다. 상기 기관은 단일 세대에서 제조될 수 있고, 줄기 세포는 환자 그 자신의 신체로부터 채취될 수 있거나, 또는 생성될 수 있다. 본원에서 논의되는 바와 같이, 이는 한 세포에서 다중 유전자를 동시에 편집함으로써 수행될 수 있다 (예를 들어, WO 2015/168125 (본원에서 참조로 포함됨) 참조). 다중 유전자는 척추동물 세포 또는 배아에서 표적화된 뉴클레아제 및 상동성 지정 수복 (HDR) 주형을 사용하는 편집을 위해 표적화될 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

[0018]

도 1은 마우스에서의 심장 형태 발생의 개략도를 도시한 것이다. (좌측에서 우측으로) 심장 반월 (E7.5), 선형 심장 관 (E8.5), 루프된 심장 (E9.5) 및 4개 챔버로 된 심장 (E10.5)의 형성.

도 2는 Nkx2-5 및 (dHand로도 또한 공지된) HandII 이중 네아웃에는 양쪽 심실 (rv 및 lv)이 결여되고, 이는 단일의 작은 원시 심방 (dc)을 갖는다는 것을 입증하는 것이다 (Yamagishi 2001).

도 3a-c는 돼지 섬유모세포에서의 NKX2-5, HANDII 및 TBX5의 삼중 네아웃을 도시한 것이다. a) 각 유전자에 대한 코딩 서열의 개략도를 제시한 것으로; 색 교차부는 엑손 경계부를 나타내고, (하) 청색 영역은 각 전사 인자의 DNA 결합 도메인을 나타내고, 삼각형 표시는 TALEN 결합 부위 위치를 나타낸다. b) TBX5 및 NKX2-5의 이중대립유전자성 KO에 대한 섬유모세포 콜로니의 RFLP 분석. 별표 표시는 이중의 이중대립유전자성 KO 콜로니를 표시하는 것이다. c) 콜로니 스크리닝의 결과 (n=480). 오직 TBX5 및 NKX2-5 이중 양성 클론에서만 서열분석하여 HANDII 돌연변이율을 분석하였다.

도 4는 Nkx2-5/HANDII/TBX5 삼중 네아웃 돼지 배아가 무심장증을 갖는다는 것을 도시한 것이다. 삼중 네아웃 돼지 배아에는 심장이 결여되고, 본질적으로 E18.0에서 (심장을 표시하는) Gata4 면역조직화학적으로 양성인 세포는 없다 (h, 심장 및 fg, 전장).

도 5a-f는 Nkx2-5가 CPC에서 네트워크를 지배하고, 심장 발생을 위한 인자라는 것을 입증하는 것이다. (a) Nkx2-5 유전자의 심장 인핸서 영역을 형광성 리포터 (EYFP)에 융합시키고, 이를 사용하여 트랜스제닉 마우스를 생성하였다. (b) Nkx2-5 인핸서는 트랜스제닉 마우스 배아에서 심장 선조 세포 집단으로의 EYFP 발현을 지시한다. (c) RNA를 분류된 CPC로부터 단리시키고, 증폭시키고, 아피메트릭스 (Affymetrix) 어레이 분석을 사용하여 유전자 발현을 평가하였다. 단일 배아로부터의 각 음성 세포 집단 (E7.75-E9.5) 대비 Nkx2-5-EYFP CPC의 아피메트릭스 어레이 분석 결과 심장 발생과 연관된 유전자 발현이 증가되었고, HandII 및 Tbx5가 심장 반월에서 인자인 것으로 확인되었다. Nkx2-5 널 심장 선조 세포 (CPC)에서 상향조절된 유전자 확인. (d) EYFP는 E8.0 및 E9.5의 6kbNkx2-5-EYFP: WT 및 6kbNkx2-5-EYFP: Nkx2-5 널 한배세끼에서 CPC로 유포된다. (e) E8.0 및 E9.5 단계에서 단리된 WT (+/+) CPC 대비 EYFP 양성 Nkx2-5 널 (-/-)에서 유의적으로 상향조절된 유전자에 대한 어레이 분석의 벤 다이어그램. (f) 혈액 형성 억제, (Etv2를 통한) 내피 계통의 촉진 및 (Bnp, Anf, M1c-2v 및 크립토의 조절에 의한) 심장 계통의 촉진에서의 Nkx2-5의 역할을 입증하는 본 연구의 결과를 요약한 개략도.

도 6은 돼지 모델에서 인간화 심장을 생산하기 위한 전반적인 전략법을 도시한 것이다. 인간화 심장을 포함하는 돼지를 조작하기 위해 NKX2-5/HANDII/TBX5 돌연변이체 돼지 섬유모세포를 생산하는데 뿐만 아니라, SCNT 및 인간 줄기 세포 전달을 위해서도 다중 유전자 편집이 사용될 것이다.

도 7a-b는 ETV2의 TALEN 매개 네아웃을 도시한 것이다. (a) 유전자 편집을 검출하기 위해 사용된 3 단계로 된 PCR 검정법. 프라이머 a-d로부터의 증폭은 대립유전자 결실이 존재하였다는 것을 나타내었다. 이형접합성 클론과 동형접합성 클론을 구별하기 위해, 프라이머 a-b 및 c-d를 사용하여 야생형 대립유전자를 증폭시켰다. a-d 생성물이 존재하고, a-b, c-d 생성물 둘 다가 부재할 때에만 클론은 대립유전자 결실에 대해 동형접합성인 것으로 간주된다. (b) 상기 기준에 부합하는 클론은 녹색 박스로 인클로징되어 있다.

도 8a-h는 돼지 ETV2 손실이 마우스 Etv2 돌연변이체 표현형을 재현하였다는 것을 입증하는 것이다. 24 체절 단계에서의 야생형 E18.0 돼지 배아 (a) 및 ETV2 네아웃 배아 (b). 삽도는 요막의 확대도를 보여주는 것이다. 돌연변이체에서의 혈관 얼기 형성의 결여를 갖는 비정상적인 전체 형태에 주목한다 (삽도). (c-h) 각각 a 및 b에 제시된 배아의 요막 (c, d), 심장 수준 (e, f) 및 동맥 수준 (g, h)을 관통하는 섹션을 내피 마커인 Tie2; 심장 계통 마커인 Gata4; 및 핵 대조염색인 DAPI에 대해 염색하였다. 야생형 요막은 Tie2 양성 내피 내층 (c, 화살표 표시)과 함께 고도로 혈관화된 반면 (c), 돌연변이체에는 상기 세포 집단이 결여되었다 (d). 심내막, 주정맥 (CV), 및 등대동맥 (DA)은 야생형 배아에서 뚜렷이 관찰가능하다 (e, g). 그에 반해, Gata4 (녹색)으로

표시된 심장 선조 및 창자가 존재하기는 하지만, ETV2 널 배아에는 상기 구조가 완전히 결여되었다 (각각 f 및 h). 스케일 막대: 1,000  $\mu\text{m}$  (a, b), 200  $\mu\text{m}$  (a, b 중 삽도), 100  $\mu\text{m}$  (c-h).

도 9a-b는 (a) ICM에 DiI 표지된 hiPSC를 포함하는 배반포를 도시한 것이다. 화살표는 DiI 및 HNA에 대해 양성인 세포를 나타낸다. (b) ICM에 EdU 표지된 hiPSC를 포함하는 배반포. hiPSC를 24시간 동안 40  $\mu\text{M}$  EdU로 표지하고, 주사하였다. 배반포를 분열 세포를 표지하기 위해 1시간 동안 10  $\mu\text{M}$  BrdU로 펄싱하였다. 이중 양성 세포는 화살표 표시로 제시되어 있다. BrdU+/EdU- 세포는 분열 숙주 세포이다. 배반포는 부화하기 시작하고 (괄호 표시), 이는 발생 진행을 의미한다는 것에 주목한다. HNA: 인간 핵 항원; OL: 중첩.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0019]

심혈관 질환은 미국에서 및 전 세계에서 사망 원인의 1위를 차지하고 있다. 현재 성인 3명 중 1명이 심혈관 질환을 앓는 채로 살고 있다. 선천성 심장 결함은 흔하며, 이는 말기 심장 부전으로 진행될 수 있다. 심장 이식이 말기 심장 부전에 대한 유일한 치유법이지만, 공여자 기관의 이용가능성이 제한되어 있기 때문에 비교적 적은 환자가 상기 요법을 받고 있다. 요컨대, 상기 치료 요법을 필요로 하는 환자를 치료하기 위한 심장 공급은 부족한 상태이다. 추가로, 선천성 또는 심장 부전 질환을 위한 새로운 장치, 약리학적 또는 외과적 요법을 시험하기 위한 관련된 인간 모델은 존재하지 않는다. 세 번째로, 심장을 이식할 필요가 없도록 하는 심장 재생을 촉진시키는 인자를 확인, 또는 연구하기 위한 관련된 인간 모델은 존재하지 않는다. 마지막으로, 본원에서는 환자 본인의 줄기 세포를 사용하여 재생될 수 있는 개인맞춤형 인간 조직의 공급원을 제공한다 (이로써, 예컨대 기관 기증 또는 인간 배아 줄기 세포의 사용과 같은 윤리적 문제가 해소된다). 따라서, 본원에서는 큰 동물 모델에서 인간화 심장을 조작함으로써 관련 기술분야에 대혁신을 일으키는 신흥 기술의 이용을 제공한다.

[0020]

본원에서는 이식을 위한 심장/조직의 무한 공급원으로서의 역할을 하고, 인간 심장의 재생 및/또는 인간 심장의 실험 약물에 대한 반응을 연구하기 위한 큰 동물 모델을 제공하는 돼지에서 인간 기관 (심장)/인간화 조직을 생성하기 위한 조성물 및 방법을 제공한다.

[0021]

특히, 본원에서는 상기 요법으로부터 이익을 얻게 되는 수백만 명의 사람들에게 개인맞춤형 심장 조직 또는 심장을 제공하기 위한 조성물 및 방법을 제공한다. 상기 전략법은 심혈관 의약에 대혁신을 일으킬 것이며, 이러한 치명적인 질환에 대한 치유법을 제공하게 될 것이다. 개인맞춤형 심장 판막, 심장 조직, 관상 동맥 및 전체 심장이 환자를 위해 이용가능할 수 있고, 이는 면역억제제의 사용을 제거할 것이다. 추가로, 본원에서는 다른 조직, 예컨대 개인맞춤형 혈액, 맥관 구조, 근육, 뼈 및 폐 생성을 위한 플랫폼을 제공한다.

[0022]

앞서, 심장 발생을 위해 필요하고, 그에 충분한 네트워크를 정의하기 위해 트랜스제닉 및 유전자 파괴 마우스 모델을 조작하였다. 심장 발생의 전사 활성인자로서, 혈액 형성의 억제인자로서, 및 마스터 내피/심장내 인자인 Etv2의 활성인자로서의 Nkx2-5의 역할 (5-21)이 입증되었다. 상기 데이터 및 다른 공개 문헌에 기초하여, Nkx2-5/Hand2/Tbx5에 대한 돌연변이체 동물에는 심장이 완전히 결여되어 있는 것으로 간주되었다 (22-26). 최신의 유전자 편집 기술을 사용하여, 초기 발생 동안 치명적이며, 교란된 심혈관 계통을 가지거나, 또는 심혈관 계통이 없는 돌연변이체 돼지 배아를 생성하였다. 심혈관 질환 치료를 위한 인간 조직의 신규한 공급원으로서의 역할을 하는 것 이외에도, 인간화 돼지는 인간 계통의 재생 또는 약리학적 작용제에 대한 반응(들)을 연구하여 선천성 및 심장 부전 질환을 포함하는 심혈관 질환에 대한 요법을 개선시키는 큰 동물 모델로서의 역할도 할 수 있다. 본 접근법은 혁신적이고, 최신의 첨단 기술을 조합하여 돼지 숙주에서 심혈관 계통을 지배하고, 인간 특이적 조직을 생산하는 네트워크 및 줄기 세포 집단을 해독한다.

[0023]

### 정의

[0024]

하기 정의는 본 명세서 및 특허청구범위에 관한 명확하고 일관된 이해를 제공하기 위해 포함된다. 본원에서 사용되는 바, 언급된 용어는 하기 의미를 갖는다. 본 명세서에서 사용되는 모든 다른 용어 및 어구는 관련 기술 분야의 통상의 기술자가 이해하는 것과 같은 그의 일반적인 의미를 갖는다. 그러한 일반적인 의미는 기술 용어 사전, 예컨대 문헌 [Hawley's Condensed Chemical Dictionary 14th Edition, by R.J. Lewis, John Wiley & Sons, New York, N.Y., 2001]을 참조함으로써 얻을 수 있다.

[0025]

본 명세서에서 "하나의 실시양태", "한 실시양태" 등에 대한 언급은 기술된 실시양태가 특정 측면, 특성, 구조, 모이어티, 또는 특징을 포함할 수 있지만, 모든 실시양태가 반드시 그러한 측면, 특성, 구조, 모이어티, 또는 특징을 포함할 필요는 없다는 것을 나타낸다. 추가로, 상기 어구는 반드시 그러할 필요는 없지만, 본 명세서의 다른 부분에서 언급된 동일한 실시양태를 지칭할 수 있다. 추가로, 특정 측면, 특성, 구조, 모이어티, 또는 특징이 실시양태와 관련하여 기술된 경우, 명백하게 기술되었는지 여부와 상관 없이, 상기 측면, 특성, 구조, 모

이어티, 또는 특징은 다른 실시양태에 영향을 줄 수 있거나, 또는 그와 관련시키는 것은 관련 기술분야의 통상의 기술자의 지식 범위 내에 포함되어 있다.

[0026] 본원에서 사용되는 바, 단수 형태는 하나의, 또는 하나 초과의, 즉, 적어도 하나의 대상을 지칭한다. 예로서, "한 요소"란, 하나의 요소 또는 하나 초과의 요소를 의미한다.

[0027] "및/또는"이라는 용어는 상기 용어와 연합된 항목들 중 어느 하나, 항목들의 임의 조합, 또는 항목들을 모두 의미한다. "하나 이상의"라는 어구는 특히 그의 어법과 관련하여 판독될 때에 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 쉽게 이해될 것이다. 예를 들어, 폐닐 고리 상의 하나 이상의 치환기란, 1 내지 5개, 또는 폐닐 고리가 이치환된 경우라면, 1 내지 4개를 지칭한다.

[0028] 본원에서 사용되는 바, "또는"은 상기 정의된 바와 같은 "및/또는"이라는 것과 동일한 의미를 갖는 것으로 이해하여야 한다. 예를 들어, "및/또는" 또는 "또는"이 항목의 목록을 분리한 경우, 이는 다 포함하는 것으로, 예컨대 다수의 항목들 중 적어도 하나를 포함하는 것 뿐만 아니라, 그들 중 하나 초과의 것, 및 임의적으로 열거되지 않은 추가 항목을 포함하는 것으로 해석되어야 한다. 예컨대, "중 단 하나" 또는 "중 정확하게 하나" 또는 특허청구범위에서 사용될 때, "로 이루어진"이라는 용어와 같이, 그에 반하는 것을 명백하게 명시하는 용어만이 다수의 요소들 또는 요소들의 목록에서 정확하게 1개의 요소만을 포함한다는 것을 지칭할 것이다. 일반적으로, 본원에서 사용되는 바, "또는"이라는 용어는 예컨대, "둘 중 어느 하나", "중 하나", "중 단 하나", 또는 "중 정확하게 하나"와 같은 배타적 용어가 앞에 있는 경우, 오직 배타적 대안을 명시하는 것으로만 (즉, "둘 다가 아닌, 하나 또는 다른 하나"인 것으로) 해석되어야 한다.

[0029] 본원에서 사용되는 바, "수반하는" "수반한다", "가지는", "갖는다", "갖는" 또는 그의 파생어는 "포함하는"이라는 용어와 유사하게 다 포함하는 것으로 의도된다.

[0030] "약"이라는 용어는 명시된 값의  $\pm 5\%$ ,  $\pm 10\%$ ,  $\pm 20\%$ , 또는  $\pm 25\%$  변차를 지칭할 수 있다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, "약 50" 퍼센트라는 것은 45 내지 55 퍼센트의 변차를 내포할 수 있다. 정수 범위의 경우, "약"이라는 용어는 범위의 각 끝점에 있는 언급된 정수보다 크고/거나, 작은 1 또는 2개의 정수를 포함할 수 있다. 본원에서 달리 명시되지 않는 한, "약"이라는 용어는 개별 성분, 조성물 또는 실시양태의 기능적 면에서 등가인, 언급된 범위에 근접한 값, 예컨대 중량 백분율을 포함하는 것으로 의도된다. 약이라는 용어는 언급된 범위의 종점을 변경시킬 수 있다.

[0031] 관련 기술분야의 통상의 기술자가 이해하는 바와 같이, 성분의 정량, 특성, 예컨대 분자량, 반응 조건 등을 표현하는 수치를 포함하는, 모든 수치는 근사치이며, 이는 임의적으로 모든 경우에서 "약"이라는 용어로 수식될 수 있는 것으로 이해된다. 상기 값은 본원의 기술내용의 교시를 사용하는 관련 기술분야의 통상의 기술자가 얻고자 하는 원하는 특성에 의존하여 달라질 수 있다. 상기 값은 내재적으로는 필히 그의 각 시험 측정값에서 발견되는 표준 편차로부터 생성되는 변동성을 함유한다는 것 또한 이해하여야 한다.

[0032] 관련 기술분야의 통상의 기술자가 이해하는 바와 같이, 임의의 모든 목적을 위해, 특히 작성된 기술내용을 제공한다는 점에서 본원에서 언급된 모든 범위는 또한 하위 범위 및 그의 하위 범위의 조합 뿐만 아니라, 상기 범위를 구성하는 개별 값, 특히, 정수 값도 포함한다. 언급된 범위 (예컨대, 중량 백분율 또는 탄소군)는 각각 상기 범위 내의 특정 값, 정수, 소수, 또는 아이덴티티를 포함한다. 임의의 열거된 범위는 충분히 동일 범위를 기술하고, 이는 적어도 동일한  $1/2$ ,  $1/3$ ,  $1/4$ ,  $1/5$ , 또는  $1/10$ 로 분해될 수 있는 것으로 쉽게 인식될 수 있다. 비제한적인 예로서, 본원에서 논의된 각 범위는 하위  $1/3$ , 중간  $1/3$  및 상위  $1/3$  등으로 쉽게 분해될 수 있다. 관련 기술분야의 통상의 기술자가 이해하는 바와 같이, 예컨대 "최대", "적어도", "보다 큰", "미만", "초과", "또는 그 초과" 등과 같은 모든 표현은 언급된 수치를 포함하고, 상기 용어는 상기 논의된 바와 같이 후속하여 하위 범위로 분해될 수 있는 범위를 지칭한다. 동일한 방식으로, 본원에서 언급된 모든 비 또한 더 넓은 범위의 비 내에 포함되는 모든 하위 비를 포함한다. 따라서, 라디칼, 치환기, 및 범위에 대해 언급된 특정 값은 단지 예시를 위한 것이며; 이는 라디칼 및 치환기에 대한 다른 정의된 값 또는 정의된 범위 내의 다른 값들을 배제시키지 않는다.

[0033] 관련 기술분야의 통상의 기술자는 또한 구성원이 함께 일반적인 방식으로, 예컨대 마쿠쉬(Markush) 군으로 함께 분류되어 있는 경우, 본 발명은 열거된 전체 군을 전체로서 뿐만 아니라, 군의 각 구성원을 개별적으로 및 주요 군의 모든 가능한 하위 군을 포함한다는 것도 쉽게 인식하게 될 것이다.

[0034] 추가로, 모든 목적을 위해, 본 발명은 주요 군 뿐만 아니라, 군 구성원 중 하나 이상의 것이 없는 주요 군도 포함한다. 그러므로, 본 발명은 언급된 군의 구성원 중 임의의 하나 이상의 것의 명백한 배제를 구상한다. 따라

서, 개시된 카테고리 또는 실시양태 중 임의의 것에 단서가 적용될 수 있으며, 이로써, 예를 들어, 명백한 부정적 한정에서의 사용을 위해 언급된 요소, 종, 또는 실시양태 중 어느 하나 이상의 것이 상기 카테고리 또는 실시양태로부터 배제될 수 있다.

[0035] "단리된"이라는 용어는 생체내에서 인자(들), 세포 또는 세포들과 회합되어 있는 하나 이상의 인자, 세포 또는 하나 이상의 세포 성분과 회합되어 있지 않은 인자(들), 세포 또는 세포들을 지칭한다.

[0036] "접촉시키는"이라는 용어는 예컨대, 용액 중, 반응 혼합물 중, 시험관내에서, 또는 생체내에서 세포 또는 분자 수준에서 터치하거나, 접촉하도록 하거나, 바로 옆에 또는 근접하게 위치시켜 생리학적 반응, 화학적 반응, 또는 물리적 변화를 일으키는 행위를 지칭한다.

[0037] 본원에서 사용되는 바, "세포", "세포주", 및 "세포 배양물"이라는 용어는 상호교환적으로 사용될 수 있다. 상기 용어들은 모두 임의의 모든 후속 세대인, 그의 자손도 포함한다. 모든 자손은 고의적 또는 비고의적 돌연변이에 기인하여 동일하지 않을 수 있다는 것을 이해하여야 한다.

[0038] "세포"는 척추동물, 예컨대 인간을 포함하는 포유동물로부터의 세포를 포함하거나, 또는 "대상체"는 척추동물, 예컨대 인간을 포함하는 포유동물이다. 포유동물은 인간, 가축, 스포츠용 동물 및 반려 동물을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. "동물"이라는 용어에는 개, 고양이, 어류, 게르빌루스쥐, 기니아 퍼그, 햄스터, 말, 토끼, 돼지, 마우스, 원숭이 (예컨대, 유인원, 고릴라, 침팬지, 또는 오랑우탄), 래트, 양, 염소, 암소 및 조류가 포함된다.

[0039] 한 실시양태에서, 줄기, 선조 또는 전구체 세포는 배아 줄기 세포, 성체 줄기 세포, 유도된 만능성 줄기 세포, 및/또는 다능성 줄기 세포 (예컨대, 다능성 중배엽 전구체)이다. 한 실시양태에서, 줄기, 선조 또는 전구체 세포는 포유동물 세포이다. 한 실시양태에서, 줄기 세포로는 유도된 만능성 줄기 세포, 제대혈 줄기 세포, 중간엽 줄기 세포, 만능성 줄기 세포를 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 한 실시양태에서, 줄기 세포는 인간 기원의 것이다. 또 다른 실시양태에서, 줄기 세포는 돼지 기원의 것이다.

[0040] 분화전능성 (일명 전능성) 줄기 세포는 배아 및 배아외 세포 유형으로 분화될 수 있다. 상기 세포가 완전한 생존가능한 유기체를 구축할 수 있다. 상기 세포는 난자 및 정자 세포의 융합으로부터 생산된다. 수정란의 처음 몇회에 걸친 분열에 의해 생산된 세포 또한 분화전능성이다. 만능성 줄기 세포는 분화전능성 세포의 후손이고, 이는 거의 모든 세포로, 즉, 3개의 배엽층 중 임의의 것으로부터 유래된 세포로 분화될 수 있다. 다능성 줄기 세포는 다수의 세포 유형 뿐만 아니라, 세포의 밀접한 관련이 있는 패밀리의 것으로 분화될 수 있다. 소능성 줄기 세포는 단지 몇 세포 유형으로만, 예컨대 림프양 또는 골프양 줄기 세포로 분화될 수 있다. 단능성 세포는 단 하나의 세포 유형인 그 자신을 생산할 수 있지만 [4], 자기 재생 특성을 가지고 있으며, 이를 통해 상기 세포는 비-줄기 세포 (예컨대, 선조 세포, 근육 줄기 세포)와 구별된다.

[0041] "확장"이란 분화 없이 이루어지는 세포 증식을 지칭한다.

[0042] "선조 세포"는 그의 최종적으로 분화된 자손의 특징들 모두는 아니지만, 그의 일부를 가지는, 줄기 세포의 분화 동안에 생산된 세포이다. 정의된 선조 세포는 특정 또는 최종적으로 분화된 세포 유형으로가 아닌, 계통으로 수임된다. "내피 세포"라는 어구는 최종적으로 분화된 세포 유형 뿐만 아니라, 최종적으로 분화된 것이 아닌, 내피 계통으로 수임된 세포도 포함한다.

[0043] "분화 인자"란, 세포 인자, 바람직하게, 계통 수임을 유도하는 성장 인자 또는 혈관신생 인자를 지칭한다.

[0044] "피그(pig)" 및 "스와인(swine)" 및 "포사인(porcine)"이라는 용어는 돼지로서 교환가능하게 사용되고, 성별, 크기 또는 품종에 관계 없이 동일한 유형의 동물을 언급하는 총칭이다. "피그", "스와인" 및 "포사인", 예컨대 인간 또는 돼지 유전자로 상보된 널 "피그", "스와인" 및 "포사인", 상기 "피그", "스와인" 및 "포사인"은 배아, 신생 돼지 또는 성체 (갓 태어난 돼지 및 어린 돼지 포함)일 수 있다는 것에도 또한 주목한다.

[0045] "Hand2" 및 "HandII"라는 용어는 상호교환적으로 사용된다.

[0046] 본원에서 사용되는 바, "인간화 골격근", "인간화 심근", 또는 "인간화 근육"이란 하나 이상의 인간 유전자 및/ 또는 단백질을 발현하는 돼지 또는 다른 비-인간 동물 중의 세포 또는 조직을 지칭한다. 한 실시양태에서, 하나 이상의 인간 유전자/단백질을 발현하는 돼지 세포 또는 조직은 상응하는 기능적 돼지 유전자 및/또는 단백질을 발현하지 않는다.

[0047] 유전자의 "코딩 영역"은 유전자의 코딩 가닥의 뉴클레오티드 잔기 및 유전자의 전사에 의해 생산되는 mRNA 분자

의 코딩 영역과 각각 상동성이거나, 또는 그와 상보적인, 유전자의 비코딩 가닥의 뉴클레오티드로 이루어진다.

[0048] "대조군" 세포는 시험 세포와 동일한 세포 유형을 갖는 세포이다. 대조군 세포는 예를 들어, 시험 세포를 검사하는 시점과 정확하게 동일한 시점에 또는 거의 동일한 시점에 검사될 수 있다. 대조군 세포는 또한 예를 들어, 시험 세포를 검사하는 시점과 동떨어진 먼 시점에 검사될 수 있고, 대조군 세포의 검사 결과는 기록된 결과가 시험 세포의 검사에 의해 수득된 결과와 비교될 수 있도록 기록될 수 있다.

[0049] 본원에서 사용되는 바, "유효량" 또는 "치료학상 유효량"이란, 선택된 효과를 생산하는데, 예컨대 질환 또는 장애의 증상을 완화시키는데 충분한 양을 의미한다. 예컨대, 다중 화합물과 같이, 조합 형태로 화합물을 투여하는 것과 관련하여, 또 다른 화합물(들)과 조합하여 투여될 때, 각 화합물의 양은 상기 화합물이 단독으로 투여될 때와는 상이할 수 있다. 따라서, 비록 각 화합물의 실제 양은 달라질 수 있지만, 화합물의 조합의 유효량은 총칭하여 그 전체로서 조합을 지칭한다. "더욱 효과적인"이라는 용어는 선택된 효과가 그의 비교 대상이 되는 제2 치료법과 비교하였을 때, 한 치료법에 의해 더 큰 정도로 완화되었다는 것을 의미한다.

[0050] "코딩하는"이란, 생물학적 프로세스에서 뉴클레오티드 (즉, rRNA, tRNA 및 mRNA)의 정의된 서열 또는 아미노산의 정의된 서열 중 하나를 갖는 다른 중합체 및 거대분자의 합성을 위한 주형으로서의 역할을 하는 폴리뉴클레오티드, 예컨대 유전자, cDNA, 또는 mRNA 중의 뉴클레오티드의 특정 서열의 고유한 특성, 및 그로부터 생성된 생물학적 특성을 지칭한다. 따라서, 유전자에 상응하는 mRNA의 전사 및 번역을 통해 세포 또는 다른 생물학적 시스템에서 단백질이 생산된다면, 유전자는 단백질을 코딩하는 것이다. 그의 뉴클레오티드 서열이 mRNA 서열과 동일하고, 일반적으로 서열 목록에 제공되어 있는 코딩 가닥, 및 유전자 또는 cDNA의 전사를 위한 주형으로서 사용되는 비-코딩 가닥 둘 다는 상기 유전자 또는 cDNA의 단백질 또는 다른 생성물을 코딩하는 것으로서 지칭될 수 있다.

[0051] "단편" 또는 "절편"은 적어도 하나의 아미노산을 포함하는 아미노산의 일부분, 또는 적어도 하나의 뉴클레오티드를 포함하는 핵산 서열의 일부분이다. "단편" 및 "절편"이라는 용어는 본원에서 상호교환적으로 사용된다.

[0052] 본원에서 사용되는 바, "기능적" 생물학적 분자는 특징으로 하는 특성을 보이는 형태의 생물학적 분자이다. 예를 들어, 기능적 효소는 효소가 특징으로 하는 특징적인 촉매성 활성을 보이는 것이다.

[0053] 본원에서 사용되는 바, "상동성"이란, 2개 중합체 분자 사이의, 예컨대 2개 핵산 분자 사이의, 예컨대 2개 DNA 분자 또는 2개 RNA 분자 사이의, 또는 2개 폴리펩티드 분자 사이의 서브유니트 서열 유사성을 지칭한다. 2개 분자 중 둘 다에서 서브유니트 위치가 동일한 단량체 서브유니트로 점유되어 있을 때, 예컨대 각각의 2개 DNA 분자 중의 위치가 아데닌으로 점유되어 있다면, 이때 그들은 상기 위치에서 상동성을 띠는 것이다. 2개 서열 사이의 상동성은 매칭 또는 상동성 위치의 수의 직접적인 함수이며, 예컨대 2개 화합물 서열 중 위치의 절반 (예컨대, 길이가 10개의 서브유니트로 이루어진 중합체 중의 5개의 위치)이 상동성을 띤다면, 이때 2개 서열은 50% 상동성이고, 위치의 90%, 예컨대 10개 중 9개가 매치되거나, 상동성을 띤다면, 2개 서열은 90%의 상동성을 공유하는 것이다. 예로서, DNA 서열 3'ATTGCC5' 및 3'TATGGC는 50%의 상동성을 공유하는 것이다.

[0054] 본원에서 사용되는 바, "상동성"은 "동일성"과 동의어로 사용된다.

[0055] 2개 뉴클레오티드 또는 아미노산 서열 사이의 퍼센트 동일성의 결정은 수학적 알고리즘을 사용하여 달성될 수 있다. 예를 들어, 2개 서열을 비교하는데 유용한 수학적 알고리즘은 문헌 [Karlin and Altschul (1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877)]에서 변형된 것과 같은, 카를린(Karlin) 및 알트슐(Altschul)의 알고리즘 (1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-2268)이다. 상기 알고리즘은 문헌 [Altschul, et al. (1990, J. Mol. Biol. 215:403-410)]의 NBLAST 및 XBLAST 프로그램으로 도입되고, 예를 들어, 미국 국립 생물 공학 정보 센터(National Center for Biotechnology Information: NCBI) 웹사이트에서 BLAST 도구를 사용하여 공용 리소스 로케이터를 갖는 NCBI 월드 와이드 웹 사이트에서 액세스가 가능하다. 하기 파라미터: 캡 패널티 = 5; 캡 연장 패널티 = 2; 미스매치 패널티 = 3; 매치 보상 = 1; 기대 값 10.0; 및 워드 크기 = 11을 사용하여 (NCBI 웹 사이트에서 "blastn"으로 지정된) NBLAST 프로그램을 이용하여 BLAST 뉴클레오티드 검색을 수행함으로써 본원에 기술된 핵산에 상동성인 뉴클레오티드 서열을 수득할 수 있다. 하기 파라미터: 기대 값 10.0, BLOSUM62 스코어링 행렬을 사용하여 (NCBI 웹사이트에서 "blastn"으로 지정된) XBLAST 프로그램 또는 NCBI "blastp" 프로그램을 이용하여 BLAST 단백질 검색을 수행함으로써 본원에 기술된 단백질 분자에 상동성인 아미노산 서열을 수득할 수 있다. 비교 목적으로 캡이 있는 정렬을 수득하기 위해 문헌 [Altschul et al. (1997, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402)]에 기술된 바와 같이 캡드 BLAST(Gapped BLAST)가 사용될 수 있다. 대안적으로, PSI-Blast 또는 PHI-Blast는 분자 사이의 면 관계 (상기 문헌 동일) 및 공통 패턴을 공유하는 분자 사이의 관계를 검출하는

반복 검색을 수행하는데 사용될 수 있다. BLAST, 캡드 BLAST, PSI-Blast, 및 PHI-Blast 프로그램을 사용할 때, 각 프로그램 (예컨대, XBLAST 및 NBLAST)의 디폴트 파라미터가 사용될 수 있다.

[0056] 2개 서열 사이의 퍼센트 동일성을 캡을 허용하면서, 또는 허용하지 않으면서, 상기 기술된 것과 유사한 기술을 사용하여 결정될 수 있다. 퍼센트 동일성을 산출할 때, 전형적으로는 정확한 매치가 계수된다.

[0057] 본원에서 사용되는 바, "설명서"는 본원에서 언급된 각종 질환 또는 장애를 완화시키기 위한 키트에서의 본 발명의 유용성을 전달하는데 사용될 수 있는 간행물, 기록물, 다이어그램, 또는 임의의 다른 표현 매체를 포함한다. 임의적으로, 또는 대안적으로, 설명서는 포유동물의 세포 또는 조직에서의 질환 또는 장애를 완화시키는 하나 이상의 방법을 기술할 수 있다. 본 발명의 키트의 설명서는 예를 들어, 확인된 본 발명, 또는 그의 일부를 함유하는 용기에 부착될 수 있거나, 또는 본 발명, 또는 그의 일부를 함유하는 용기와 함께 수송될 수 있다. 대안적으로, 설명서는 설명서 및 화합물이 수혜자에 의해 협조적으로 사용될 수 있게 하고자 하는 의도로 용기와 따로따로 수송될 수 있다.

[0058] 본원에서 사용되는 바, "핵산"이라는 용어는 RNA 뿐만 아니라, 단일 및 이중 가닥 DNA 및 cDNA를 포함한다. 추가로, "핵산", "DNA", "RNA"라는 용어 및 유사 용어는 또한 핵산 유사체, 즉, 포스포디에스테르 백본 이외의 것을 갖는 유사체를 포함한다. 예를 들어, 관련 기술분야에 공지되어 있고, 백본 중에 포스포디에스테르 결합 대신 펩티드 결합을 가지는, 소위 "펩티드 핵산"이라고 불리는 것은 본 발명의 범주 내에 포함되는 것으로 간주된다. "핵산"이란, 데옥시리보뉴클레오시드 또는 리보뉴클레오시드로 구성되었는지 여부와 상관 없이, 및 포스포디에스테르 결합 또는 변형된 결합, 예컨대 포스포트리에스테르, 포스포라미데이트, 실록산, 카르보네이트, 카르복시메틸에스테르, 아세트아미데이트, 카르바메이트, 티오에테르, 가교된 포스포라미데이트, 가교된 메틸렌 포스포네이트, 가교된 포스포라미데이트, 가교된 포스포라미데이트, 가교된 메틸렌 포스포네이트, 포스포로티오에이트, 메틸포스포네이트, 포스포로디티오에이트, 가교된 포스포로티오에이트 또는 술폰 결합, 및 상기 결합의 조합으로 구성되었는지 여부와 상관 없이 임의의 핵산을 의미한다. 핵산이라는 용어는 또한 구체적으로 생물학적으로 발생된 5종의 엔기 (아데닌, 구아닌, 티민, 시토신, 및 우라실) 이외의 다른 엔기로 구성된 핵산을 포함한다. 본원에서는 폴리뉴클레오티드 서열을 기술하는데 관용적 표기법이 사용된다: 단일 가닥 폴리뉴클레오티드 서열의 좌측 단부가 5'-단부이고; 이중 가닥 폴리뉴클레오티드 서열의 좌측 방향은 5'-방향으로 지칭된다. 5'에서 3'으로의, 초기 RNA 전사체에의 뉴클레오티드 부가 방향은 전사 방향으로 지칭된다. mRNA와 동일한 서열을 갖는 DNA 가닥은 "코딩 가닥"으로 지칭되고; DNA 상의 기준점에 대해 5'에 위치하는 DNA 가닥 상의 서열은 "상류 서열"로서 지칭되고; DNA 상의 기준점에 대해 3'에 위치하는 DNA 가닥 상의 서열은 "하류 서열"로서 지칭된다.

[0059] 본원에서 사용되는 바, "핵산 구축물"이라는 용어는 계놈 또는 합성 방법에 의해 수득되는지 여부와 상관 없이, 원하는 특정 유전자 또는 유전자 단편을 코딩하는 DNA 및 RNA 서열을 포함한다.

[0060] 달리 언급되지 않는 한, "아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열"은 서로의 축퇴성 베전이고, 동일한 아미노산 서열을 코딩하는 모든 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 단백질 및 RNA를 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 인트론을 포함할 수 있다.

[0061] "올리고뉴클레오티드"라는 용어는 전형적으로 짧은 폴리뉴클레오티드, 일반적으로는 약 50개 이하의 뉴클레오티드를 지칭한다. 뉴클레오티드 서열이 DNA 서열 (즉, A, T, G, C)에 의해 표시되는 경우, 이는 "U"가 "T"를 대체하는 것인 RNA 서열 (즉, A, U, G, C)을 포함한다는 것을 이해할 것이다.

[0062] 전사 활성인자-유사 이펙터 뉴클레아제 (TALEN)는 TAL 이펙터 DNA 결합 도메인을 DNA 절단 도메인에 융합시킴으로써 생성되는 인공 제한 효소이다. 상기 시약을 통해 계내에서 계놈 편집을 위한 효율적이고, 프로그램 가능하고, 특이적인 DNA 절단이 이루어질 수 있다. 전사 활성인자-유사 이펙터 (TALE)는 서열 특이적인 방식으로 DNA에 결합하는 단백질이다. 상기 TALE를 뉴클레아제 (예컨대, FokI 엔도뉴클레아제)에 융합시킴으로써 고도로 특이적인 DNA "가위"가 제조된다 (상기 분자는 임의의 DNA 서열에 결합하도록 조작될 수 있다). 본원에서 사용되는 바, TALEN이라는 용어는 광범위하고, 또 다른 TALEN의 도움 없이 이중 가닥 DNA를 절단할 수 있는 단량체 TALEN을 포함한다. TALEN이라는 용어는 또한 함께 작용하여 같은 부위에서 DNA를 절단하도록 조작된 TALEN 쌍 중 하나 또는 둘 다의 구성원을 지칭하는 것으로 사용된다. 함께 작용하는 TALEN은 DNA의 방향성을 지칭하는 좌측-TALEN 및 우측-TALEN으로서 지칭될 수 있다.

[0063] 일단 TALEN 유전자를 어셈블리하고 나면, 이를 플라스미드 내로 삽입한 후; 플라스미드를 사용하여 표적 세포를 형질감염시키고, 여기서 유전자 생성물은 발현이 되고, 핵으로 진입하여 계놈에 접근하게 된다. 이중 가닥 파

단 (DSB)을 유도하고, 임의적으로, 세포가 수복 기전을 이용하여 반응하게 되는 그 반응 대상인 카르고/미리 선택된 유전자를 삽입함으로써 계놈을 편집하는데 TALEN이 사용될 수 있다. 이러한 방식으로, 예를 들어, 질환을 유발하는 계놈 중의 돌연변이를 교정하는데 사용될 수 있다.

[0064] 유전자 편집을 포함하는, 유전자 조작은 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 이용가능한 임의의 방법에 의해 예를 들어, 표적화된 엔도뉴클레아제, 및 상동성 지정 수복 (HDR), TALEN, CRISPR (예컨대, CAS9/CRISPR), 리콤비나제 융합 분자, 합성 꽈지 인공 염색체, 메가뉴클레아제, 아연 평거 또는 (예컨대, 원하는 표적 유전자를 넉아웃시키기 위한) 유전자 편집을 위한 rAAV 기반 시스템의 사용에 의해 수행될 수 있다. 추가로, 넉아웃 목적으로, 유전자 (예컨대, 간접 RNA (shRNA, siRNA, dsRNA, RISC, miRNA)의 불활성화를 위해 또는 유전자를 발현시키기 위해서 다양한 핵산이 세포 내로 도입될 수 있다.

[0065] 체세포 핵 이식 (SCNT)은 체세포 및 난세포로부터 생존가능한 배아를 창출하기 위한 실험실 기술이다. 체세포 핵 이식 프로세스는 2종의 상이한 세포를 포함한다. 첫 번째 것은 난자 (난/난모세포)로 알려져 있는 암컷 생식 세포이다. 두 번째 것은 인간 신체의 세포로 지칭되는 체세포이다. 피부 세포, 지방 세포, 및 간 세포만이 유일의 몇 안 되는 예가 된다. 공여자 난세포의 핵을 제거하고, 폐기하여 '탈프로그램화된' 상태가 되게 남겨둔다. 체세포의 핵 또한 제거하되, 그대로 남겨 두고, 제핵 체세포를 폐기한다. 남아있는 것은 단독 체세포 핵과 제핵 난세포이다. 이어서, 체세포 핵을 '빈' 난자 내로 스쿼트함으로써 융합시킨다. 체세포 핵은 난 내로 삽입된 후, 그의 숙주 난세포에 의해 재프로그램화된다. 이제 체세포의 핵을 함유하는 난자를 쇼크를 주어 자극시키고, 이는 분열하기 시작할 것이다. 이제 난은 생존가능하고, 오직 한 부모로부터의 모든 필요한 유전 정보를 함유하는 성체 유기체를 생산할 수 있다. 보통은 이어서 발생이 일어나게 될 것이며, 다회에 걸친 유사 분열 후, 상기 단일 세포는 원래의 유기체 (즉, 클론)와 동일한 계놈을 갖는 배반포 (약 100개의 세포를 포함하는 초기 단계의 배아)를 형성한다. 이어서, 치료학적 클로닝에서 사용하기 위해 상기의 클론 배아를 파괴시킴으로써 줄기 세포를 수득할 수 있거나, 재생 클로닝인 경우, 추가 발생을 위해 클론 배아를 숙주 모체 (가임신/대리모) 내로 이식시키고, 분만시킨다.

[0066] "키메라"란, 유전적으로 상이한 세포로 구성된 단일 유기체를 지칭한다/유기체이다.

[0067] 무효접합성 유기체는 동일한 유전자에 대해 2개의 돌연변이체, 또는 결손 대립유전자를 보유한다. 돌연변이체/결손 대립유전자는 둘 다 완전한 기능 상실 또는 '널' 대립유전자인 바, 이에 동형접합성 널 및 무효접합성은 동의어이다.

[0068] 유전자 넉아웃 (약어: KO)은 유기체의 대립유전자 둘 다를 작동불가능하게 만드는 (유기체를 "넉 아웃시키는") 유전적 기술이다. 이는 또한 넉아웃 유기체 또는 간단하게 넉아웃으로도 알려져 있다. 상기 용어는 또한 유전자를 "넉 아웃시키는 것"에서와 같이 상기와 같은 유기체를 창출하는 프로세스를 지칭한다. 본 기술은 본질적으로 유전자 넉인과 반대되는 것이다.

[0069] 유전자라는 용어는 광범위하고, 발현되어 기능적 생성물을 생산하는 염색체 DNA를 지칭한다. 유전자는 대립유전자를 갖는다. 유전자 편집은 단일-대립유전자성 또는 이중-대립유전자성일 수 있다.

[0070] 2개 폴리뉴클레오티드가 "작동가능하게 연결된" 것으로서 기술되어 있는 것은 단일 가닥 또는 이중 가닥 핵산 모이어티가, 2개 폴리뉴클레오티드 중 적어도 하나가 그가 특징으로 하는 생리학적 효과를 그 나머지 하나에서 대해 발휘할 수 있도록 하는 방식으로 핵산 모이어티 내에 배열되어 있는 2개 폴리뉴클레오티드를 포함한다는 것을 의미하는 것이다. 예로서, 유전자의 코딩 영역에 작동가능하게 연결된 프로모터는 코딩 영역의 전사를 촉진시킬 수 있다.

[0071] "재조합 폴리뉴클레오티드"란, 천연적으로는 함께 연결되어 있지 않은 서열을 갖는 폴리뉴클레오티드를 지칭한다. 중복된 또는 어셈블리된 재조합 폴리뉴클레오티드는 적합한 벡터에 포함될 수 있고, 상기 벡터는 적합한 숙주 세포를 형질전환시키는데 사용될 수 있다.

[0072] 재조합 폴리뉴클레오티드는 또한 비-코딩 기능부 (예컨대, 프로모터, 복제 기점, 리보솜-결합 부위 등)로서의 역할을 할 수 있다.

[0073] 재조합 폴리뉴클레오티드를 포함하는 숙주 세포는 "재조합 숙주 세포"로서 지칭된다. 유전자가 재조합 폴리뉴클레오티드를 포함하는 경우, 재조합 숙주 세포에서 발현되는 유전자는 "재조합 폴리펩티드"를 생산한다.

[0074] "재조합 세포"란, 트랜스진을 포함하는 세포이다. 상기 세포는 진핵 또는 원핵 세포일 수 있다. 또한, 트랜스제닉 세포는 트랜스진을 포함하는 배아 줄기 세포, 세포가 트랜스진을 포함하는 트랜스제닉 배아 줄기 세포로부

터 유래된 키메라 포유동물로부터 수득된 세포, 트랜스제닉 포유동물, 또는 그의 태아 또는 태반 조직으로부터 수득된 세포, 및 트랜스진을 포함하는 원핵 세포를 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0075] "조절한다"라는 용어는 관심 기능 또는 활성을 자극시키거나, 또는 억제시키는 것을 지칭한다.

[0076] 본원에서 사용되는 바, "그를 필요로 하는 대상체"는 본 발명으로부터 이익을 얻게 되는 환자, 동물, 포유동물, 또는 인간이다.

[0077] 본원에서 사용되는 바, "실질적으로 상동성인 아미노산 서열"은 참조 항체 쇄의 아미노산 서열과 적어도 약 95% 상동성, 바람직하게, 적어도 약 96% 상동성, 더욱 바람직하게, 적어도 약 97% 상동성, 더욱더 바람직하게, 적어도 약 98% 상동성, 및 가장 바람직하게, 적어도 약 99% 이상의 상동성을 갖는 상기 아미노산 서열을 포함한다. 아미노산 서열 유사성 또는 동일성은 BLAST (기본 국소 정렬 검색 도구) 2.0.14 알고리즘을 사용하는 BLASTP 및 TBLASTN 프로그램을 사용함으로써 산출될 수 있다. 상기 프로그램을 위해 사용되는 디폴트 설정 환경은 본 발명의 목적을 위한 실질적으로 유사한 아미노산 서열을 확인하는데 적합하다.

[0078] "실질적으로 상동성인 핵산 서열"이란, 상응하는 서열이 참조 핵산 서열에 의해 코딩된 웨티드와 실질적으로 동일한 구조 및 기능을 갖는 웨티드를 코딩하며; 예컨대, 다만 상기 웨티드 기능에 유의적인 영향을 주지 않는 아미노산 변이만이 존재하는 것인, 참조 핵산 서열에 상응하는 핵산 서열을 의미한다. 바람직하게, 실질적으로 동일한 핵산 서열은 참조 핵산 서열에 의해 코딩된 웨티드를 코딩한다. 실질적으로 유사한 핵산 서열과 참조 핵산 서열 사이의 동일성의 백분율은 적어도 약 50%, 65%, 75%, 85%, 95%, 99% 또는 그 초과이다. 핵산 서열의 실질적인 동일성은 예를 들어, 물리적/화학적 방법 (즉, 하이브리드화)에 의해, 또는 컴퓨터 알고리즘을 통한 서열 정렬에 의해 2개 서열의 서열 동일성을 비교함으로써 결정될 수 있다. 뉴클레오티드 서열이 참조 뉴클레오티드 서열과 실질적으로 유사한지 여부를 결정하는데 적합한 핵산 하이브리드화 조건은 하기와 같다: 50°C에서 7% 소듐 도데실 술페이트 SDS, 0.5 M NaPO4, 1 mM EDTA, 50°C에서 2X 표준 염수 시트레이트 (SSC), 0.1% SDS 중에서 세척; 바람직하게, 50°C에서 7% (SDS), 0.5 M NaPO4, 1 mM EDTA, 50°C에서 1X SSC, 0.1% SDS 중에서 세척; 및 더욱 바람직하게, 50°C에서 7% SDS, 0.5 M NaPO4, 1 mM EDTA, 65°C에서 0.1X SSC, 0.1% SDS 중에서 세척. 2개 핵산 서열 사이의 실질적인 유사성을 결정하는데 적합한 컴퓨터 알고리즘으로는 GCS 프로그램 패키지 (Devereux et al., 1984 Nucl. Acids Res. 12:387), 및 BLASTN 또는 FASTA 프로그램 ([Altschul et al., 1990 Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1990 87:14:5509-13]; [Altschul et al., J. Mol. Biol. 1990 215:3:403-10]; [Altschul et al., 1997 Nucleic Acids Res. 25:3389-3402])을 포함한다. 상기 프로그램과 함께 제공된 디폴트 설정 환경은 본 발명의 목적을 위한 핵산 서열의 실질적인 유사성을 결정하는데 적합하다.

[0079] "벡터"는 단리된 핵산을 포함하고, 단리된 핵산을 세포 내부로 전달하는데 사용될 수 있는 물질의 조성물이다. 선형 폴리뉴클레오티드, 이온성 또는 양쪽성 화합물과 회합되어 있는 폴리뉴클레오티드, 플라스미드, 및 바이러스를 포함하나, 이에 제한되지 않는, 다수의 벡터가 관련 기술분야에 공지되어 있다. 따라서, "벡터"라는 용어는 자율 복제 플라스미드 또는 바이러스를 포함한다. 상기 용어는 또한 핵산의 세포로의 이식 또는 전달을 촉진시키는 비-플라스미드 및 비-바이러스 화합물, 예컨대, 예를 들어, 폴리리신 화합물, 리포솜 등을 포함하도록 구축되어야 한다. 바이러스 벡터의 예로는 아데노바이러스 벡터, 아데노-연관 바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터, 재조합 바이러스 벡터 등을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 비-바이러스 벡터의 예로는 리포솜, DNA의 폴리아민 유도체 등을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0080] 종래의 분자생물학 기술을 포함하는 방법이 본원에 기술되어 있다. 상기 기술은 관련 기술분야에 일반적으로 공지되어 있으며, 방법에 관한 논문, 예컨대 [Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., vol. 1-3, ed. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989]; 및 [Current Protocols in Molecular Biology, ed. Ausubel et al., Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York, 1992] (정기 간행물 최신판 포함)에 상세하게 기술되어 있다. 핵산의 화학적 합성 방법은 예를 들어, 문헌 [Beaucage and Carruthers, Tetra. Letts. 22: 1859-1862, 1981], 및 [Matteucci et al., J. Am. Chem. Soc. 103:3185, 1981]에서 논의되고 있다.

[0081] "포함한다", "포함하는"이라는 용어 등은 미국 특허법에 그에 속한다는 의미를 가질 수 있고, 이는 "수반한다", "수반하는"이라는 용어 등을 의미할 수 있다. 본원에서 사용되는 바, "수반하는" 또는 "수반한다" 등은 제한 없이 포함한다는 것을 의미한다.

[0082] 외인성 기관/조직 생산

- [0083] 인간화 큰 동물 모델은 재생 의학을 위한 자원이며, 이는 개인맞춤형 인간화 돼지 모델을 위한 플랫폼으로서의 역할을 하게 될 것이다. 이러한 전략법은 만성 근골격 질환 및 이식을 위한 혈행의 임상 실무 패러다임을 전환시키게 될 것이다. 돼지 심근 제거가 유일한 것인데, 그 이유는 상기 제거가 큰 동물 모델에서의 인간화 심근 발생을 목적으로 할 뿐만 아니라, 이는 면역 거부를 피할 수 있는 신규한 접근법이고, 외인성 기관 발생 전략법을 위해 광범위하게 적용될 수 있기 때문이다.
- [0084] 현재, 진행성 말기 기관 부전을 위한 유일의 최종적인 요법은 이식이다. 수백만 명의 환자가 상기 요법으로부터 이익을 얻을 수는 있지만, 공여자 기관의 이용가능성이 제한되어 있기 때문에 상기 환자들이 이식을 받을 수 있는 자격이 있는 것은 아니다. 그러므로, 시신 또는 생체 관련 공여자 기관이 현저히 부족하다. 추가로, 기관 이식을 위해서는 장기간의 면역억제가 요구되는데, 이는 또한 유해하고, 생활을 제한하는 부작용을 갖는다. 본원에서는 이식을 위한 기관의 비제한적인 공급원으로서의 역할을 하고, 심혈관 질환 치료를 위한 패러다임-전환 플랫폼을 제공하게 될, 돼지에서 생성된 인간화 조직을 기술한다 (도 6).
- [0085] 강렬한 관심이 외인성 이식에 집중되고 있고, 최근의 기술 발전은 상기 전략법이 성공적일 수 있다는 개념을 뒷받침한다. 예를 들어, 래트 췌장은 배반포 상보 프로세스에 의해 마우스에서 생산되었다 (38). 상기 연구에서, 췌장 발생에 대한 마우스 조절 유전자인 Pdx1에 대한 배반포 돌연변이체에 야생형 래트로부터의 만능성 줄기 세포 (rPSC)를 주사하였다 (38). rPSC를 주사맞은 배반포를 마우스 대리모 내로 이식하면 래트 세포로 구성된 기능적 췌장을 갖는 마우스 키메라가 생성된다. 상기 돌연변이체 속주는 건강한 공여자 줄기 세포가 공여자 유래의 기관을 증식시키고, 그를 생성할 수 있도록 하는 발생 "니치"를 제공한다. 배반포 상보 전략법은 또한 기관, 예컨대 설치류에서 신장 및 간을, 및 최근에서는 돼지에서 췌장을 생산하였다 (39-41). 돼지 모델을 사용한 후자의 상기 보고는 후속하여 이식 또는 진보된 요법을 위해 사용될 수 있는, 돼지에서의 인간 환자 특이적 기관의 발생을 뒷받침한다 (도 6).
- [0086] 인간화 큰 동물 모델은 재생 의학을 위한 자원이며, 이는 개인맞춤형 인간화 돼지 모델을 위한 플랫폼으로서의 역할을 하게 될 것이다. 이러한 전략법은 만성 근골격 질환 및 이식을 위한 혈행의 임상 실무 패러다임을 전환시키게 될 것이다. 돼지 심장 조직 제거가 유일한 것인데, 그 이유는 상기 제거가 큰 동물 모델에서의 인간화 심장 조직 발생을 목적으로 할 뿐만 아니라, 이는 면역 거부를 피할 수 있는 신규한 접근법이고, 외인성 기관 발생 전략법을 위해 광범위하게 적용될 수 있기 때문이다.
- [0087] 유전자-편집 플랫폼을 사용하여 각종의 발생 유전자를 돌연변이시켜 기관 및/또는 조직 결손 돼지를 생성할 수 있고, 여기서 외인성 기관 및/또는 조직 생성을 위해 배반포 상보를 사용할 수 있다. 상기 시스템의 효율성을 통해 다수의 유전자를 실험적으로 시험할 수 있다. 다중의 조절 유전자를 동시에 변형시킴으로써 복합 조직 개체 발생을 조정할 수 있다.
- [0088] **근육 질환/장애**
- [0089] 심장 조직 및 세포는 심근 세포를 포함하거나, 또는 (심근세포 또는 심장 근세포로도 공지되어 있는) 심근세포는 심근을 구성하는 근육 세포 (근세포)이다. 심혈관 질환 또는 심장 질환은 심장 및 혈관 질환을 포함하며, 그 중 다수는 죽상동맥경화증과 관련이 있다. 질환/장애로는 심장마비, 뇌졸중, 심장 부전, 부정맥, 및 심장 판막 장애를 포함하나, 이에 제한되지 않는다.
- [0090] **정밀 네아웃 (KO) 돼지의 기관 생산을 위한 생성된 인간-돼지 키메라로의 생성**
- [0091] 부위 특이적 뉴클레아제의 사용으로 큰 동물 계놈에서의 정밀 유전자 변경의 도입 효율은 100,000배 초과로 개선되었다. 부위 특이적 뉴클레아제에 의해 절단된 이중 가닥 파단의 비-상동성 단부-연결 (NHEJ)에 의해 유전자를 불활성화시키기는 TALEN 기반 플랫폼을 사용함으로써 가축에서 각각 50% 및 20% 비율의 고도로 효율적인 이형접합성 및 이중-대립유전자성 네아웃 (KO)이 입증되었다 (27). 유전자-편집 플랫폼을 사용하여 각종의 발생 유전자를 돌연변이시켜 기관-결손 돼지를 생성할 수 있고, 여기서 외인성 기관 생성을 위해 배반포 상보를 사용할 수 있다. 상기 시스템의 효율성을 통해 다수의 유전자를 실험적으로 시험할 수 있다.
- [0092] **ETV2 네아웃 돼지 배아에는 내피 계통이 결여된다**
- [0093] ETV2가 결여된 배아는 맥관 구조의 부재와 함께 대략 E9.5에서 치명적인 바, 선행 연구를 통해 Nkx2-5는 Etv2 유전자의 상류 조절인자이며, Etv2는 마우스에서 내피 계통의 마스터 조절인자라는 것이 입증되었다 (8, 10, 12, 13). 돼지에서의 ETV2의 역할을 조사하기 위해, 돼지 섬유모세포에서 유전자에 플랭킹된 2개 TALEN 쌍을 사용하여 전체 ETV2 코딩 서열을 제거하였다 (도 7a). 상기 프로세스는 동형접합성 유전자 제거시에는 15%의

효율성을 띠었고; 유전자형 분석된 클론 528개 중 79개는 ETV2 유전자 결실에 대해 동형접합성을 띠었다 (도 7b). 핵 클로닝 (체세포 핵 이식; SCNT)을 위해 ETV2 동형접합성 넉아웃 섬유모세포 클론을 사용하여 ETV2 널 배아를 생성하였고, 이는 대리모 암퇘지 내로 이식되었다. 클로닝 효율은 29%였으며, 평균 성공률이 20%인 것 보다 더 높았다. 배아를 수확하였고, E18.0에서 분석하였다 (도 8). 상기 단계에서, *Wt* 배아는 요막에 잘 발생된 혈관 얼기를 가지며 혈관화되었다 (도 8a, c). 그에 반해, ETV2 KO에서의 성장은 유의적으로 지연되었고 (도 7b), 이를 배아에는 심장내/내피 계통이 결여되었다 (도 8d, f, h). *Wt* 배아에서는 확실하게 발생이 이루어지는 주정맥, 등대동맥, 및 심내막이 ETV2 KO 배아에는 결여되었다 (도 8e-h). 본 결과는 마우스 및 돼지 표현형의 유사성을 반영하며, 이는 ETV2의 기능이 이들 종 간에 보존된다는 것을 시사한다. 추가로, 본 데이터는 다중 돌연변이를 돼지 계통으로 지시함으로써 1종 초파의 세포 유형에서 인간화될 수 있는 키메라 기관의 성장을 지원할 수 있다는 것을 입증한다.

#### [0094] *Nkx2-5, HandII 및 Tbx5*

[0095] *Nkx2-5, HandII 및 Tbx5*를 돌연변이시켜 심장 근육 계통 결손 돼지 배아 (*Nkx2-5/HandII/Tbx5* 널 돼지 배아)를 생성하였다. *Nkx2-5/HandII/Tbx5*에 대한 다중의 유전자 편집을 수행함으로써 만능성 능력을 갖는 인간 세포를 사용하여 심장 세포로 재증식되는 허용 니치를 창출하여 인간화 심장/심장 조직 및/또는 심근을 수득하였다. 실시예 2의 상세한 설명을 참조한다.

[0096] 인간화 큰 동물 모델은 재생 의학을 위한 중요한 자원이 될 것이며, 이는 개인맞춤형 기관 제조를 위한 플랫폼으로서의 역할을 하게 될 것이다. 이러한 전략법은 근육 질환 및 이식을 위한 현행의 임상 실무 패러다임을 전환시킬 수 있다. 현재까지, 기관의 외인성 이식은 마우스와 래트 (27, 29); 및 돼지와 돼지 (31) 사이에서 수행되어 왔으며, 큰 동물 모델에서의 인간화 기관의 성공적인 발생에 대해서는 보고된 바 없다. 미국 가출원 시리얼 번호 62/247,092; 62/247096; 및 62/247,122가 본원에서 참조로 포함된다.

[0097] 하기 실시예는 본 발명의 특정의 특히 바람직한 실시양태를 추가로 예시하고자 하는 것이며, 이는 어느 방식으로든 본 발명의 범주를 제한하는 것으로 의도되지 않는다.

#### [0098] 실시예

##### [0099] 실시예 1: 심장 발생의 조절인자로서의 *Nkx2-5, HandII 및 Tbx5*

[0100] 심장 발생은 전기적으로 커플링되고, 최종적으로는 기능적 합포체를 형성하는 심장 선조의 특수화, 증식, 이동 및 분화를 포함하는, 복잡한 고도로 조직화된 이벤트이다 (도 1). 상기 심장 발생 단계는 유전자 파괴 기술을 사용하여 심장 형성 및 생존가능성을 위해 요구되는 것으로 밝혀진 전사 네트워크에 의해 지배를 받는다 (6, 8, 9, 22-26) (표 1).

표 1: 심장 유전자 발현의 표현형

돌연변이된 유전자	심장에서의 표현형		
	치명적 단계	심장의 형태학적 특징	마향-조절관 전사 인자
<i>Nkx2-5</i>	E9.5	심장 판은 형성되나, 심장은 고리형성되지 않음. 심방 및 심실의 경계 없음.	<i>Hand1, Me12C</i>
<i>Tbx5</i>	E10.5	좌심실 및 동방 구조(원시 심방 및 유입로)의 형성저하증. 심장은 고리형성되지 않음.	<i>Nkx2-5, Gata4</i>
<i>Hand2</i>	E10.5	우심실 형성저하증 및 대동맥궁 결함.	<i>Gata4</i>
<i>Nkx2-5, Hand2</i>	E8.5-9.5	완전한 심실이 발생중 동반한 단일의 심장 챔버.	<i>Hand1</i>

[0101] [0102] *Nkx2-5*는 초파리(*Drosophila*) 호메오도메인 단백질인 틴맨(Tinman) (*Csx*)의 척추동물 동족체이다. 틴맨 돌연변이 결과 상기 파리에서는 심장 형성이 이루어지지 않게 된다 (35). *Nkx2-5*는 심장 계통에서 발현되는 가장 초기의 전사 인자 중 하나이다. *Nkx2-5*의 표적화된 파괴는 심장 형태 발생을 동요시키고, 성장은 심각하게 지연되고, 대략 E9.5에서 배아 치명성을 띠게 된다 (22, 24). *Nkx2-5* 상호작용 인자 중 하나는, 함께 복합체를 형성하는 T-박스 전사 인자인 *Tbx5*이고, 심장 유전자 발현을 전사활성화시킨다 (36). 마우스에서의 *Tbx5*의 전체적인 결실은 심장 형태 발생을 동요시키고 (종종 심방 및 심실 형성저하증), E10.5까지 배아 치명성을 띠게 된다 (25). 심지어 반수체기능부전 마우스 (*Tbx5*<sup>+/−</sup>)는 중증의 선천성 심장 및 앞다리 기형을 보이고, 환자에서 홀트-오람 증후군을 동반한 결함을 유발하는 것으로 밝혀졌다 (25). *HandII* (*dHand*)는 심장 형태 발생을 위해 필요한 것으로도 또한 밝혀진 bHLH 전사 인자이다. *HandII* 돌연변이체 배아는 조기 배아발생 동안

치명적이고, 중증 우심실 형성저하증 및 대동맥궁 결함을 갖는다 (23). 추가로, Nkx2-5 및 HandII 둘 다가 결여된 마우스는 심실 무발생을 보이며, 오직 단일의 심방 챕버만을 갖는다 (도 2) (26).

[0103] 돼지 NKK2-5, HANDII 및 TBX5 유전자의 다중 네아웃

[0104] 심장 선조 세포에서의 Nkx2-5 전사 조절 캐스케이드를 정의하기 위해, 조작된 네아웃 및 트랜스제닉 마우스 모델을 사용하여 줄기 세포 집단으로부터 심장 계통의 특수화를 지시하는 분자 네트워크를 정의하였다 (8, 9, 37). 심장 발생 동안 Nkx2-5 매개 네트워크를 정의하기 위해, 발생 중인 Nkx2-5 널 심장 (9)에서의 CPC 집단의 분자 시그니처를 조사하였다. 6 kb의 Nkx2-5 인핸서-EYFP 트랜스제닉 마우스 모델을 Nkx2-5 널 배경과 조합 방식으로 매이팅시켜 Nkx2-5 널 CPC에서의 EYFP 발현을 유도하였다. FACS를 사용하여 단계 (연령)가 매칭되는 개별 배아로부터의 Wt 및 Nkx2-5 널 CPC를 단리시키고, RNA를 단리시키고, 증폭시키고, 전체 게놈 분석을 사용하여 각 분자 프로그램에서 정보를 얻었다. 상기 전략법은 하류 Nkx2-5 표적 유전자를 정의하였고, 심장 발생, 내피/심장내 계통 특수화 (Etv2의 유도) 및 혈액 형성의 억제에서의 Nkx2-5의 역할을 밝혀냈다 (도 5f). 본 연구에서는 또한 Nkx2-5, HandII 및 Tbx5를 유도한 조기 CPC 집단에 대한 분자 시그니처가 확인되었다 (37).

[0105] 돼지에서의 다중 상동성-의존성 재조합 (HDR)

[0106] 앞서 기술된 바와 같이 (상기 참조), TALEN 특이적 HDR 기술을 사용하여 이중-대립유전자성 네아웃 (KO)을 돼지 섬유모세포 내로 도입시키는 방법 (28)이 개발되어 있다. 이러한 신흥 기술을 추가로 사용하여 다중 유전자 KO를 수행하였다 (즉, 그를 수행함으로써 NKX2-5/HANDII/TBX5 돌연변이 및 다른 기관 특이적 인자와 함께 ETV2 네아웃을 조작하였다). 다중의 이중-대립유전자성 유전자 편집을 위한 상기 기술을 확인하기 위해 TALEN 쌍을 사용하였고, 이를 각각을 통해 20% 초과의 HDR/부위를 얻었고, 3가지 조합으로 상기 쌍을 동시에 공동 형질감염시켰으며, 여기서 상기의 각 조합은 돼지 게놈에서 5개의 별개의 유전자를 표적화하였다 (28).

[0107] TALEN 유도 HDR 및 (본원에서 논의된) NHEJ에 의한 돌연변이의 조합을 사용하여 NKX2-5/HANDII/TBX5 돌연변이체 돼지 배아 섬유모세포를 생성하였다. 각 유전자는 그의 보존 전사 인자/DNA 결합 도메인 내에서 또는 그 바로 앞에서 표적화하였다 (도 3a). 이러한 전략법은 하류 AUG에서의 개시에 의해 기능적 웨티드를 생산할 수 있는 기회를 감소시키기 위해 전사 출발 부위 부근의 유전자를 표적화하는 것보다 바람직하다. TBX5 및 NKX2-5의 경우, 상동성 주형을 제공하여 신규한 프레임내 정지 코돈, RFLP 스크리닝을 위한 제한 부위, 및 기능적 번역초과 단백질을 방지하기 위해 정지 코돈 뒤의 추가의 5개의 염기 삽입을 생성하였다. HANDII TALEN은 약 10%의 효율성을 띠었고, 그러므로, 본 실험은 돼지 섬유모세포에서 다중 HDR을 사용할 때 관찰된 현상인 TBX5 및 NKX2-5 HDR 간섭 (비공개 데이터)을 피하기 위해 상동성 주형 없이 수행되었다. 3 단계로 된 접근법을 사용하여 삼중 돌연변이체를 확인하였다. 먼저, RFLP 검정법에 의해 TBX5 및 NKX2-5의 이중 녹아웃에 대해 콜로니를 스크리닝하였다 (도 3b). 480개의 콜로니로 이루어진 제1 라운드에서, 33개 (7%)가 이중 녹아웃인 것으로 밝혀졌다. 이중 녹아웃 중에서, 4개가 HANDII에 대해서도 또한 돌연변이체인 것으로 확인되었다 (총 1%) (도 3c). 단일 샷으로 삼중 널 돼지 섬유모세포 세포주를 신뢰가능하게 생산할 수 있는 능력은 유일하며, 혁신적인 기술이다.

[0108] 삼중 녹아웃 돼지 배아 중의 심장 부재

[0109] 본 실험은 심장 발생을 동요시키는 다수의 전사 인자 (즉, MESP1, GATA4, NKX2-5, HANDII, TBX5 등)를 표적화하였고, 선천성 심장 질환 연구 및 치료를 위한 새로운 모델을 제공한다. NKX2-5/HANDII/TBX5 유전자의 결실에 대해 동형접합성을 띠는 클론의 성공적인 표적화 및 생성이 개념 입증으로서 본원에서 증명된다. 핵 클로닝 (SCNT)을 위해 삼중 녹아웃 섬유모세포 클론을 사용하여 NKX2-5/HANDII/TBX5 널 돼지 배아를 생성하였고, 이는 대리모 암퇘지 내로 이식되었다. 배아를 수확하였고, 마우스의 E11와 등가인 E18에서 분석하였다. E18에서, 삼중 녹아웃 돼지 배아는 맥관 구조, 골격근 및 혈액은 가지지만, 야생형 대조군 돼지 배아와 비교하였을 때, 심장은 결여된다 (최소의 GATA4 면역조직화학적으로 양성인 심근세포) (도 4 참조).

[0110] **실시예 2 - 인간 줄기 세포는 돼지 반수성개체 (수정 없이 발생되도록 전기적으로 활성화된 배아)의 내부 세포 괴 (ICM)로 통합된다.**

[0111] 인간 줄기 세포/선조 세포 집단이 돼지 반수성개체 키메라에 기여하고, 참여할 수 있다. 돼지 반수성개체 발생에 기여할 수 있는 인간 유도성 만능성 줄기 세포 (hiPSC), 인간 중간엽 줄기 세포 (hMSC), 인간 만능성 줄기 세포 및 인간 심장 선조 (hCPC)의 능력을 비교할 것이다. 돼지 단위생식성 배반포를 사용한 데이터 (30)가 hiPSC가 반수성개체의 내부 세포괴로 통합된다는 믿음을 지지한다. 본 실험에서는 hiPSC 세포주, hMSC 세포주, 인간 만능성 줄기 세포 및 hCPC, 및 인간-돼지 키메라를 성공적으로 생산할 수 있는 그의 능력에 대해 돼지 단위생식성 배아를 사용하여 시험관내에서 및 생체내에서 조사할 것이다. 본 연구는 시험관내 분석을 위해 인간

줄기 세포 집단의 증식성 능력, 아폽토시스 및 발생 진행을 조사할 것이다. 생체내 분석은 인간 특이적 항혈청을 이용하는 면역조직화학법 및 이식 후 반수성개체의 계내 하이브리드화를 이용할 것이다.

[0112] 돼지 배반포로 통합될 수 있고, 배아 발생에 참여할 수 있는 hiPSC의 능력에 대해 평가하였다. 난모세포의 전기 자극을 사용하여 돼지 단위생식성 배반포를 생성하였다 (42). 활성화 후 6일 경과하였을 때, 9-12개의 DiI-또는 EdU (24 hr)-표지된 hiPSC를 배반포장 내로 주사하였다. 배반포가 배양물 중에서 회복될 수 있도록 2일을 허용한 후, 영상화하였다. 90%의 돼지 배반포의 ICM에서 표지된 hiPSC가 관찰되었다 (도 9a, b, 대표 영상이 제시되어 있음). 인간 핵 항원 특이적 항체 (HNA)를 사용하여 면역조직화학법을 이용함으로써 DiI 분포를 비교한 결과, HNA 항체가 주사된 인간 줄기 세포를 검출한 것으로 나타났다 (도 9a, 화살표 표시). 증식 세포를 검출하기 위하여 수확하기 전 1시간 동안 BrdU를 사용하여 EdU 표지된 hiPSC 주사를 맞은 배반포를 추가로 펼성하였다. EdU로 이중 표지한 결과, 주사된 인간 줄기 세포가 주사 48 hr 후에도 계속하여 증식한 것으로 나타났다 (도 9b, 화살표 표시). 본 결과는 인간 줄기 세포의 돼지 배반포의 ICM으로의 도입, 및 키메라 배반포의, 자궁내로의 이식을 위한 준비에서 부화 단계로의 발생 진행을 입증한다.

[0113] 본 결과는 제안된 전략법의 근거 및 실현 가능성을 뒷받침하고, 인간 줄기 세포 집단이 화합성을 띠고/거나, ICM 발생에 기여하는지 여부를 조사하기 위한 신속한 검정법을 제공한다. 추가로, 단위생식성 배반포의 이식이 인간 줄기 세포의 발생하는 배아로의 조합 및 분화를 조사할 수 있는 고처리량 방법을 제공한다. 본 전략법의 유의적인 이점은 돼지 난모세포가 식품 생산의 부산물로서 풍부하게 이용가능하고, 단위생식성 배아가 정기적으로 대량으로 생성될 수 있다는 점이다. 단위생식성 배아는 8주 경과 후에는 생존하지 못하는 바, 그러므로, 원치않는 인간-돼지 키메라를 의도치 않게 출생시킬 수 있을 것이라는 우려를 무색하게 만든다는 점에 주목하여야 한다.

[0114] 인간 줄기 세포 집단은 증식되고, 인간-돼지 반수성개체 키메라의 형성에 기여한다. 인간 중간엽 줄기 세포 (hMSC) (46) 및 심장 선조 세포 (hCPC) (47)는 발생하는 돼지에서 배아 계통에 기여할 수 있는 그의 능력에 있어서 더욱 큰 제한을 받게 될 것이다. 추가로, hiPSC 및 돼지 줄기 세포 집단은 동등하게 배아 계통에 기여할 수 있다.

[0115] 인간 줄기/선조 세포 집단은 NKX2-5/HANDII/TBX5 돌연변이체 돼지 배아를 구제할 것이다. hiPSC는 NKX2-5/HANDII/TBX5 돌연변이체 조산 배아에서 모든 심장 세포에 대한 선조가 될 것이다.

[0116] TALEN 매개 기술을 사용하여 (27, 28), 생존불가능하고, 내피 계통이 결여된 ETV2 돌연변이체 돼지 배아를 생성하였다. TALEN 매개 기술을 사용하여 NKX2-5/HANDII/TBX5 돌연변이체 섬유모세포를 생성함으로써, 및 데이터를 통해 상기 돌연변이체 돼지 배아에는 심장이 결여된다는 것을 입증한다. 데이터는 인간 줄기 세포 (인간 제대 혈 줄기 세포 및 인간 iPSC)가 돼지 반수성개체의 ICM 내로 통합될 수 있다는 개념을 추가로 뒷받침한다. 인간-돼지 상보 연구에서는 E17 인간 줄기 세포-돼지 키메라에서의 인간 줄기 세포의 생착에 대해 조사할 것이다.

### 0117] 실시예 3

#### 0118] 물질 및 방법

#### 0119] TALEN 디자인 및 생산

[0120] 온라인 도구 "TAL 이펙터 뉴클레오티드 타겟터 2.0(TAL EFFECTOR NUCLEOTIDE TARGETER 2.0)"을 사용하여 후보 TALEN 표적 DNA 서열 및 RVD 서열을 확인하였다. 이어서, 최종 목적 벡터로서 RCI스크립트-GOLDYTALEN (애드진(Addgene) ID 38143)을 사용하여 골든 게이트 어셈블리(Golden Gate Assembly) 프로토콜에 따라 TALEN DNA 형질감염 또는 시험관내 TALEN mRNA 전사를 위한 플라스미드를 구축하였다 (Carlson 2012). QIAPREP SPIN MINIPREP 키트 (퀴아젠(Qiagen))를 사용하여 제조된, 어셈블리된 RCI스크립트 벡터를 SacI에 의해 선형화하여 앞서 명시된 바와 같이 (Carlson, 2009) m메시지 m머신(mMESSAGE mMACHINE)® T3 키트 (앰비온(Ambion))를 사용하는 시험관내 TALEN mRNA 전사를 위한 주형으로서 사용하였다. 생성된 mRNA를 메가클리어 리액션 클린업 (MEGACLEAR REACTION CLEANUP) 키트 (어플라이드 바이오사이언시스(Applied Biosciences)) 또는 RN이지(RNeasy) 키트 (퀴아젠)를 사용하여 정제 이전에 DNase로 처리하였다.

#### 0121] 조직 배양 및 형질감염

[0122] 돼지 섬유모세포를 (명시된 바와 같이) 37 또는 30°C에서 5% CO<sub>2</sub>하에 10% 우태아 혈청, 100 I.U./mL 페니실린 및 스트렙토마이신, 2 mM L-글루타민 및 10 mM Hepes로 보충된 DMEM 중에서 유지시켰다. 네온 트랜스펙션 시스템(Neon Transfection system) (라이프 테크놀로지스(Life Technologies))을 사용하여 TALEN 및 HDR 올리고를

전달하였다. 전면생장률이 70-100%인, 저계대수의 오사보(Ossabaw) 또는 랜드레이스(Landrace) 돼지 섬유모세포를 1:2로 나누고, 다음날 전면생장률이 70-80%일 때 수확하였다. mRNA TALEN 및 HDR 올리고를 포함하는 "R" 버퍼 (라이프 테크놀로지스) 중에 대략 600,000개의 세포를 재현탁시키고, 하기 파라미터를 사용하여 100  $\mu$ L 텁에서 전기천공시켰다: 입력 전압: 1800V; 펄스 폭: 20 ms; 펄스 수: 1. 관심의 특이적인 유전자(들)를 위한 0.1-4 ug의 TALEN mRNA 및 0.1-0.4 nmol의 HDR 올리고를 각 형질감염을 위해 포함시켰다. 형질감염된 세포를 30°C에서 2 또는 3일 동안 배양한 후, 유전자 편집 효율에 대해 분석하고, 콜로니를 위해 플레이팅하였다.

#### [0123] 회석 클로닝

[0124] 형질감염 후 2 또는 3일 경과 후, 50 내지 250개의 세포를 10 cm 디쉬 상에 시딩하고, 개별 콜로니의 직경이 대략 5 mm에 도달할 때까지 배양하였다. TrypLE 및 DMEM 배지 (라이프 테크놀로지스)의 1:4 (vol/vol) 혼합물 8 mL를 첨가하고, 콜로니를 흡인시키고, 48 웨л 디쉬 및 복제 96 웨л 디쉬의 웨л로 옮기고, 같은 조건하에서 배양하였다. 냉동보존 및 유전자형 분석을 위한 샘플 제조를 위해 전면생장에 도달한 콜로니를 수집하였다.

#### [0125] 샘플 제조

[0126] 3일 및 10일째에 형질감염된 세포 집단을 6 웨л 디쉬의 웨л로부터 수집하고, 10-30%를 50  $\mu$ l의 1X PCR 화합성 용해 완충제: 200  $\mu$ g/ml 프로테이나제 K로 새로 보충된 10 mM 트리스(Tris)-Cl pH 8.0, 2 mM EDTA, 0.45% 트리톤(Tryton) X-100(vol/vol), 0.45% 트윈(Tween)-20(vol/vol) 중에 재현탁시켰다. 55°C에서 60분, 95°C에서 15 분 동안인 프로그램을 사용하여 열 순환기에서 용해물을 프로세싱하였다.

#### [0127] 유전자-편집 분석

[0128] 1  $\mu$ l의 세포 용해물과 함께 아큐스타트(AccuStart)<sup>TM</sup> Taq DNA 폴리머라제 하이파이 (콴타 바이오사이언시스(Quanta Biosciences))를 사용하여 제조사의 권고사항에 따라 의도 부위에 플랭킹된 PCR을 수행하였다. 상기 기술된 바와 같은 PCR 생성물 10  $\mu$ l를 사용하여 서베이어 뮤테이션 디텍션(SURVEYOR MUTATION DETECTION) 키트 (트랜스게노믹(Transgenomic))를 이용함으로써 제조사의 권고사항에 따라 집단 중의 돌연변이의 빈도를 분석하였다. 서베이어(SURVEYOR) 반응물을 10% TBE 폴리아크릴아미드 겔 상에서 분리 분석하고, 에티디움 브로마이드 염색에 의해 시각화하였다. 이미지J(ImageJ)를 사용하여 밴드의 농도계측 측정을 수행하였고; 문헌 (Guschin et al. 2010)에 기술된 바와 같이 서베이어 반응물의 돌연변이율을 산출하였다. 프라이머를 사용하여 HDR 대립 유전자의 존재에 대해 개별 콜로니를 스크리닝하였다. 생성된 PCR 앰플리콘을 HindIII으로 분해하여 PCR 생성물에 대해 제한 단편 길이 다형성 분석(RFLP)을 수행함으로써 대립유전자 중 하나, 둘 다가 절단되었는지 또는 그 어느 것도 절단되지 않았는지 여부, 및 이로써, HDR 대립유전자를 함유하였는지 여부를 결정하였다. 생성물을 아가로스 겔 상에서 분리 분석하였다.

#### [0129] 돼지 서열

[0130] Nkx2-5: ENSSSCG00000016984

[0131] Tbx5: ENSSSCG00000009867

[0132] Hand2:ENSSSCG00000009703

[0133] 돼지 유전자: NKX2-5 유전자 ID: ENSSSCG00000016984

[0134] 설명: NK2 호메오박스 5 [공급원:HGNC 기호:Acc:HGNC:2488]

[0135] 동의어: CSX, CSX1, NKX2.5, NKX2E, NKX4-1

[0136] 위치: 염색체 16: 55,400,561-55,403,626 정방향 가닥.

[0137] INSDC 좌표: 염색체:Sscrofa10.2:CM000827.4:55400561:55403626:1

[0138] 상기 유전자에 대해: 상기 유전자는 1개의 전사체 (스플라이스 변이체), 37개의 오르토로그, 15개의 파라로그를 가지며, 이는 1개의 양상을 단백질 패밀리의 구성원이다.

[0139]

폐지 NKX2-5 개놈 서열 ID: CU928102

.....gtccccctctccggcctggccctggcccttcgtccccctggccccca  
 TTACCTGCCGCCATGGCACATCCCGAGCTGGAAGGCAGGGTGCAGGGCGCAGCGGGCA  
 CCAAGCAGGGAGGCTGCCAGGGACCGTGGGAGCGCCGCGCTCTCTGCCGCCACCTGGCGC  
 TGTGAGACGCGCGCTGCCACCATGTTCCCCAGCCCCGCGCTACGCCACGCCGTTCTCG  
 GTCAAAGACATCTGAACCTGGAGCAACAGCAGCGCACCTGGCCGGAGCTCTCC  
 GCGCGCTGGAGGCCACCTGGCGCCGCCCTCGCATGCTGGCCGCCCTCAAGCCCGAG  
 GCCTACGCAGGGGGCGAGGCCAGCGCCGCCCTCTCCGAGCTGCGCCGAGCTGGG  
 CCCGCCCTCACCAAGTGCAGCCCTCTCAAGCCGCCCTCAAGCCCG  
 CGTGCCTATGGCAGCCGACCCGACCCGCAAGGACCCCTGAGCCGATAAGAAAG  
 gtgaggaggaaacacaagcttcttc.....tctgcctctgttcccccccgca  
 AGCTGTGCGCGCTGCAGAAGGGGGAGCTGGAGAAGCCAGAGGCGGACAGCGCCGAGA  
 GACCTCGGGCGCGACGAAGGAAGCCGCGCTGCTTTGCAGGCACAGGTCTACG  
 AGCTGGAGCGACGCTCAAGCAGCAGCGGTACCTGTCGGCTCCCGAGCGTGACCAGTTGG  
 CCAGCGTGCTGAAGCTCACGTCACCGAGGTCAAGATCTGGTCCAGAACGGCGCTACA  
 AGTGCAAGCGGAAACGGCAGGACCAAGACTCTGGAGCTAGTGGGCTGCCCGGCC  
 CGCCGCGGCCCGCAGGATCGCGTGCAGTGCTGGTGCAGTGGCAAGCCTTGCCCTCG  
 GGGACTCCGCGCCCTACGCGCCAGCCTACGGCGIGGGCCTCAACGCCAACGGCTATAACG  
 CCTACCCGCCAACCGGGTTACGGTGGCGGGCTGCAGCCCTGGCTACAGCTGCACCG  
 CTGCGTACCCAGCCGGCGCCGGCGCAGTCGGCTACGGCCGCCAATAACA  
 TCGTGAACCTCGCGTCGGGACTTAAACCGGGTGCAGAGCCGGGATTCCGAGGGCA  
 ACTCGGGAGTGTCCACGCTGCACGGTATCGGAGGCTGGTAGGAAAGGGGCTGTCTGGG  
 CACCTCTAAAGAGGGGCACTAACTATCGGGAGAGGGAGGGCTCCGATACGATCC  
 TCCCTCAGATGTCACATTGACTCCCCACGGAGGGCTCGGAGCTTTTCCGTCCGGTGC  
 TTTATCCCCACCGCGGGAGAGTTCTGGCAGAGGTTACGCAGCTGGGTGAGTGATCC  
 CGCAGCCGGTGCCTAGCCGTCGCCCGGGAGTGCCCTCCAAGCGCCACGGCATCCC  
 CAATCGGCTGACACCGGCCAGTTGGGACCGGGAGGCCAGGGCTGAGGCTAA  
 GATGGGGCCGCCCTTCCCCGATCTGGCCGGTGCCTGGGGCCCTGCTGCCCTGCC  
 TGCCCTCCCCACACCGTATTATGTTTACTTGTTCTGTAAGAAATGAGAATCTCCT  
 TCCCATAAAGAGAGTGCCTGA  
 tccgcctgtgtgtttttcagcttgctgtgttcagaaactgaaatttt..... (SEQ  
 ID NO:1)

[0140]

CGCCGCGGCCCGCAGGATCGCGTGCAGTGCTGGTGCAGTGGCAAGCCTTGCCCTCG  
 GGGACTCCGCGCCCTACGCGCCAGCCTACGGCGIGGGCCTCAACGCCAACGGCTATAACG  
 CCTACCCGCCAACCGGGTTACGGTGGCGGGCTGCAGCCCTGGCTACAGCTGCACCG  
 CTGCGTACCCAGCCGGCGCCGGCGCAGTCGGCTACGGCCGCCAATAACA  
 TCGTGAACCTCGCGTCGGGACTTAAACCGGGTGCAGAGCCGGGATTCCGAGGGCA  
 ACTCGGGAGTGTCCACGCTGCACGGTATCGGAGGCTGGTAGGAAAGGGGCTGTCTGGG  
 CACCTCTAAAGAGGGGCACTAACTATCGGGAGAGGGAGGGCTCCGATACGATCC  
 TCCCTCAGATGTCACATTGACTCCCCACGGAGGGCTCGGAGCTTTTCCGTCCGGTGC  
 TTTATCCCCACCGCGGGAGAGTTCTGGCAGAGGTTACGCAGCTGGGTGAGTGATCC  
 CGCAGCCGGTGCCTAGCCGTCGCCCGGGAGTGCCCTCCAAGCGCCACGGCATCCC  
 CAATCGGCTGACACCGGCCAGTTGGGACCGGGAGGCCAGGGCTGAGGCTAA  
 GATGGGGCCGCCCTTCCCCGATCTGGCCGGTGCCTGGGGCCCTGCTGCCCTGCC  
 TGCCCTCCCCACACCGTATTATGTTTACTTGTTCTGTAAGAAATGAGAATCTCCT  
 TCCCATAAAGAGAGTGCCTGA

[0141]

코드:

[0143]

• 엑손/ 인트론

[0144]

• 번역된 서열

[0145]

• 플랭킹 서열

[0146]

• 인트론 서열

[0147]

• UTR

[0148] 돼지 NKK2-5 mRNA 서열: ID ENSSCT00000018494

```

ATGTTCCCCAGCCCCGCGCTCACGCCAACGCCGTTCTCG
GTCAAAGACATCTTGAACCTGGAGCAACAGCAGCGCAGCCTGGCCGCCGGGGAGCTCTCC
GCGCGCTTGGAGGCCACCTGGCGCCCGCCTGCATGCTGGCCGCCCTCAAGCCCGAG
GCCTACGCGGGGCCGGAGGCCGAGCGGCCGCCCTCCGAGCTGCGGCCGAGCTGGC
CCCGCGCCCTCACCAAGGCCAAGTGCAGGCCCTCCCTCTCAGGCCGCCGCCCTACACCG
CGTGCCTATGGCGACCCCGACCCGCCAAGGACCCCTCGAGCCGATAAGAAAG
AGCTGTGCGCGCTGCAGAAGGCCGGIGGAGCTGGAGAAGCCAGAGGCCGACAGGCCGAGA
GACCTCGGGCGCGACGACGAAGGAAGGCCGCCGTGCTTTTCGCGAGGCACAGGTCTACG
AGCTGGAGCGACCGCTTCAGCAGCAGCGGTACCTGCGCTCCCGAGCGTGACCAAGTGG
CCAGCGTGCCTGAAGCTCACGTCCACCGCAGGTCAAGATCTGGTTCAAGAACCGGCCCTACA
AGTGCAAGCGGAAACGGCAGGACCAACTCTGGAGCTAGTGGGGCTGCCCGGCCCGC
CGCCGCCGGCCCGCAGGATCGCGGTGCCAGTGTCTGGTGCAGCAGCCTTGCGCTCG
GGGACTCCGCGCCCTACCGCAGGCCCTACGGCGTGGGCCCTCACGCCTACGGCTATAACG
CCTACCCCGCCTACCCGGGTTACGGTGGCGCCCTGCAGCCCTGGCTACAGCTGCACCG
CTGCGTACCCAGCCGGCCGCCCGCAGTCGGCTACGGCCGCCAATAACAACT
TCGIGAACTTCGGCGTCGGGGACTTAAACGCGGIGCAGAGGCCGGGATTCCGAGGGCA
ACTCGGGAGTGTCCACGGTACGGTATCCGAGCCTGGTAG (SEQ ID NO:2)

```

[0149]

[0150] 돼지 NKK2-5 단백질 서열: F1SJY9-1

10	20	30	40	50
MFPSPALPT	PFSVKDILNL	EQQQRSLAAG	ELSARLEATL	APASCMIAAF
60	70	80	90	100
KPEAYAGPEA	AAPGLSELRA	ELGPAPSPAK	CAPSFSAAPE	FYPRAYGDPD
110	120	130	140	150
PAKDPRAKK	ELCALQKAVE	LEKPEADSAE	RPRARRRKRP	RVLFSQAQVY
160	170	180	190	200
ELERRFKQQR	YLSAPERDQL	ASVLKLTSTQ	VKIWFQNRRY	KCKRQRQDQT
210	220	230	240	250
LELVGLPPP	PPPARRIAVP	VLVRDGKPCP	GDSAPYAPAY	GVGLNAYGYN
260	270	280	290	300
AYPAYPGYGG	AACSPGYSC	AAAYPAGPPPA	QSATAAANNN	FVNFGVGDLN
310	320			
AVQSPGIPQG	NSGVSTLHGI	RAW		

[0151] (SEQ ID NO:3)

[0152] 돼지 유전자: HAND2 ENSSCG00000009703 (양상블)

[0153] 설명; 심장 및 신경 능선 유도체 발현 2 [공급원:HGNC 기호;Acc: HGNC:4808]

[0154] 동의어; bHLHa26, dHand, Hed, Thing2

[0155] 위치; 염색체 14: 17,528,447-17,531,529 역방향 가닥.

[0156] INSDC 좌표; 염색체:Sscrofa10.2:CM000825.4:17528447:17531529:1

[0157] 상기 유전자에 대해: 상기 유전자는 1개의 전사체 (스플라이스 변이체), 54개의 오르토로그, 9개의 파라로그를 가지며, 이는 1개의 양상을 단백질 패밀리의 구성원이다.

[0158] 돼지 HAND2 게놈 서열 ID: CU468996

[0159] 돼지 HAND2-201 mRNA ID: ENSSCT00000010638 (양상블) XM\_005670479 (NCBI, 예측)

[0160] 298..767 /유전자="LOC100153751" /표준\_명칭="Hand2" /db\_xref="UniSTS:238134" 기원

```

1 atggagatct tgctgggaaa atccgcttgc tcccctcaag gcgtccagtc ccggagaaca
61 gcccggccg ccgtcaccca ggagccccca cggccgctgc gcaacagccc tccaaagccc
121 agccggccgg ttcgcccggc acggaggag agcggaaacac gttactcgct gctaaaagtca
181 cattccagga ccaaaaacaa aacaacccaa aatttcattaa aaacaataaag cggccaaagaa
241 cccagatcag gctgggtggg ggaaggagatc gggccaccccg agatgtcgcc ccccgactac
301 agcatggccc tgccttacag tccggagatc gcacagcggtg cccgcacgtt ggaccactcc
361 cattacgggg gggtgcgcgc gggccgggg ccccccggcc tggggggggc ggcgggggtg
421 aagcgcgggg gcacaggcaa cgcacaggag cggcgcaggat ctcagagcat caacagcgcc
481 ttcgcgcqagc tgcgcgatq tatccccat gtgccccccg acacccaaact ctccaaqatc
541 aagacgcgtgc gcctggccac cagctacatc gcctacatc tggacctgtgtt ggccaaaggac
601 gaccagaacg gcggggccga ggcctttaag gccggaaatca agaagacaga tggaaaagaa
661 gagaaaaagga agaaggagatc gaatgaaaatc ttgaaaaagca cagtggcggc caacgacaag
721 aaaacccaaag gccggacgggg ctggccgcgc catgtctggg ccctggggatc caagcgttga
781 ggtggagaaaa gaggagggtgg aggtgggtgg aagaggaggag gagagcgcga gccaggccct
841 ggagccggat gcaccccgag gactccgggg cgagctctgc gcaccccgat ctggggactt
901 cctgcatttt gatcatccggg tttatattatg tgcataatgtc ctccctctt ttggcccccct
961 ttgaggccatc cgctcccccac cacccttccaa aaaaaatgtgg atatgttgaag aaaaagcatc
1021 catattttaa tatgaagagg acactcccgc gtggtaaggg atcccgatgtt cgtctttag
1081 attctctgtt tggtaatgtt tcctcttggc tggtagaca ccacgcgttgc tccctcccca
1141 cctatccacgc cccttacaga taaagacgc tgataatagt gtatttggta agtgtatctt
1201 taatacctgg cctttggata taaatattcc tgggggat taaatgtt ttcaaaagcag
1261 aaaaacggggc cgctaacatt tccgtgggg tccgtatcta tggctggcgt ttcatctgtg
1321 tggttcccta tttgaatgtt tttccaacag ctccttgggg tggacttc cgtccctctaa
1381 aactaaatgtt aatttaattt atatttgg tggaaaatgtt gtaatgtt aataaaccac
1441 tgggtgtttt tttttttt (SEQ ID NO:4)

```

[0161]

[0162] 돼지 HAND2 단백질 (예측) XP\_005670536.1

[0163] 1..780 /유전자="LOC100153751" /코돈\_개시=1 /생성물="심장- 및 신경 능선 유도체-발현된 단백질 2-유사" /단백질\_id="XP\_005670536.1" /db\_xref="GI:545868321" /db\_xref="GeneID:100153751"

```

/번역="MEILLGKSACSPHGVQSRRTAAAVTQEPPRPLRNSPPSPSRRL
RGAREESGTRYSLLKSHSRTKTTTKNFIKTISAQEPRSGWLGEELGHPEMSPPDYSM
ALSYSPEYASGAASLDHSHYGGVPPGAGPPGLGGPRPVKRRGTANRKERRRTQSINSA
FAELRECIPNVPADTKLSKIITLRLATSYIAYLMDLLAKDDQNGEAEAFKAEIKKTDV
KEEKRKKELNEILKSTVSSNDKKTGRTGWPQHVALELKQ" (SEQ ID NO:5)

```

[0164]

```

10          20          30          40          50
GWLGEELGHPEMSPPDYSMA LSYSPEYASG AASLDHSHYGGVPPGAGPPGLGGPRPVKRRGTANRKERRRTQSINSA
60          70          80          90          100
LGGPRPVKRR GTANRKERRR TQSINSAFAE LRECIPNVPADTKLSKIITL
110         120         130         140         150
RLATSYIAYL MDLLAKDDQNGEAEAFKAEI KKTDVKEEKR KELNEILKS
160         170
TVSSNDKKTGRTGWPQHVALELKQ (SEQ ID NO:6)

```

[0166]

[0167] 돼지 유전자: TBX5 유전자 ID: ENSSCG00000009867

[0168] 돼지 TBX5 게놈 서열 ID: CU468413

[0169] 설명: T-박스 5 [공급원:HGNC 기호;Acc:HGNC:11604]

[0170] 동의어: HOS

[0171] 위치: 염색체 14: 40,211,210-40,259,321 정방향 가닥.

[0172] INSDC 좌표: 염색체:Sscrofa10.2:CM000825.4:40211210:40259321:1

[0173] 상기 유전자에 대해: 상기 유전자는 1개의 전사체 (스플라이스 변이체), 61개의 오르토로그, 8개의 파라로그를 가지며, 이는 1개의 양상을 단백질 패밀리의 구성원이다.

[0174] 돼지 Tbx5 유전자 ID: ENSSCG00000009867

[0175] 돼지 TBX5 mRNA 예측 서열

[0176] 487..609 /유전자="TBX5" /표준\_명칭="MARC\_15663-15664:1016570340:1" /db\_xref="UniSTS:267858"

```

1 actagagttt tcactcgca gtcacaggcgg ggtggctcc tccatctcc
acccctcaa

61 cccctgcacc gggtagacagag ctctttctg gcaagttct ccccgagaga
gaagaggaag

121 ggagagcagg acccagagcg gtcacaggc cctggctca ccatggccga
cgagacgag 181 ggcttggcc tggctcacac accctggaa ccagattcaa
aggatctacc ctgtactca 241 aaaccqaga gtggctagg ggccccagg
aagccccgt ctgtactca 301 acccagcagg gcatggaaagg
gatcaagggt tttctccatg aaagagaact gtggctgaaa 361 tttcacgaag
tggcacaga aatgtatata accaaggctg gcaaggat gttccctgt 421
tacaaaatgtg aggtgactgg cttatccc aaaaccatg acattctct tatggacatc
481 gttctgcgg atgaccacag atacaagttc gccgataata aatggctgt
gacaggcaaa 541 gcccggctg ccatggccgg cccctctac gtgcacccgg
actcgccgc cactggagcg 601 cattggatgc ggcagctgt ctccctccag
aaactcaagc tcaccaacaa ccacctggac 661 cccgttggc acattattct
aaattccatg cacaataatg agcccgatg acacatctgt 721 aaagccgacg
aaaataatgg atttggctca aaaaatactg cattctgtac ccacgttctt 781
cctgagacag cggtttattgc agtgacttcc taccagaacc acaagatcac ccaattaaag
841 atcgagaata atcccttgc caaaggattt cggggcagc atgacatgg
actgcacagg 901 atgtcaaggg tgcaaaatgg agaataatccc gtgggttccca
ggagcacatg gggacagaaaa 961 gtggctccca accacagttcc cttcagcgt
gagccctgtg ctctctccac ctcatccaa 1021 tggggtccc agatcgt
tgagaatgggt gtgtccggcc cttccctggaa cttctgtccc 1081 ccacctaacc
cgtaccctact tccccaggag cacagccaaa ttaccattt caccaggagg 1141
aaagatgaag atgttccac cacagagcat ccctataaga agccctacat ggagacgtca
1201 cccagtgaag aggacccctt ctaccgagcc ggctacccccc agcagcagg
tctgggttcc 1261 tccatccggaa cagacttccg ccaqccggcgtt qccatgt
acgcacggcc 1321 agtgagccgg tgcccagctt ggaggacatt
agctgcaaca cgtggcccaag catgcttcc 1381 tacagcgtt gacacgttcc
caccgttccg cccatggaca ggctaccata ccagcactt 1441 tctgttcc
tcacctgggg gccccctggc cccggctgg ctggcatggc caaccacggc 1501
tccccgttggggg aatgttccatg caccagaccc cctggccca ccagctgt
1561 gtcaggcgt gtggccctca gactggccctt cagtccccgg gcaagccca
agcgtccgg 1621 ttccctgtact ctcatggctt gccaaggacc ctgtccccgg
atcgatccca ctctgtgt 1681 cacggggctt gcatggttcc agatgggt
gacaaatggc aaagccggcc ctqcttcc 1741 actgacgtt ccagaggag
gggagagagg gagagagaca gtcgcaagaa gaaccccaag 1801 aacgagatgt
cgcatccatc tccatgttca cgtctgtact tgagaagccc accctggaca 1861
ctgtatcat cagtagttt aaaccacat tcaaaaaatgg tgactttgtt ttgtctaaa
1921 actaaaaaaa tccgacaaggg qcgatggatc ccaacccccc ctacccggcc
ccacccatcc 1981 accacccacca cagtcatcaa ctggccacat tcaacacgacc
tccagatgcc ctccgggatt 2041 cttcttttgc gtcctccagaa agtcttgcct
catggatgtt ttatccaa aacatagatg 2101 gagtcattcc ctgtcttgg
gttactgtt acattgtt (SEQ ID NO:7)

```

[0177]

[0178] 돼지 TBX5 단백질 ID: FIRKD2 (양상블, 예측)

[0179] >tr|F1RKD2|F1RKD2\_돼지 특징규명되지 않은 단백질 OS=멧돼지 GN=TBX5 PE=4 SV=2

```

MADGDEGFGLAHTPLEPDSKDLPCDSKPESGLGAPS SKSPSPQAAFTQQGMEGIKVFLHE
REWLKFHEVGTEMIITKAGRMRMFP SYKVKVTGLNPKTKYILLMDIVPADDHRYKFADNK
WSVTGKAEPAMPGRLYVHPDSPATGAHWMRQLVSFQKLKLTNNHLDPGHIIILNSMHKYQ
PRLHIVKADENNGFGSKNTAFCTHVFPETAFIAVTSYQNHKITQLKIEENNPFAKGFRGSD
DMELHMRMSRMQSKEYPVVPRSTVRQKVASNHSPPFSSEPRALSTSSNLGSQYQCENGVSGP
SQDLLPPPNNPYPLPQEHSQIYHCTKRADEECSTTEHPYKKPYMETSPSEEDPFYRAGYP
QQQGLGASYRTESAQRQACMYASSAPPSEPVPSLEDISCTWPSMPSYSSCTVITVQPMD
RLPYQHFSAHFTSGPLVPRLAGMANHGSPQLGEGMFQHQTSVAHQPVVRQCGPQTGLQSP
GSLQASEFLYSHGVPTLSPHQYHSAVHGVMVPEWSDNS (SEQ ID NO:8)

```

[0180]

[0181] /db\_xref="유전자ID:100522280" (NCBI 엔트리, 예측)

```
/번역="MADGDEGFGLAHTPLEPDSKDLPCDSKPESGLGAPS KSPSSPQA
AFTQQGMEGIKVFLHERELWLKFHEVGTEMIITKAGRMRMPSYKVKTGLNPK
TKYIL
LMDIVPADDHRYKFADNKWSVTGKAEPAMPGR LYVHPDSPATGAHWMRQLV
SFQKLKL
TNNHLDPF GHILNSMHKYQPRLHIVKADENNGPGSKNTAFC THVFPETAFIAVT
SYQ
N HKITQLK IENNPF AKGFRGSDDMELHRMSRMQSKEYPV VPRSTVRQKV ASNH
SPFSS
EPRALSTSSNLGSQYQCENGVSGPSQ DLLPPP NPYPLPQEHSQIYHCTKRKDEEC
STT
EHPYKKPYMETSPSEEDPFYRAGYPQQQGLGAS YRTESAQRQACMYASS APPS
EPVPS
LEDISCNTWPSMPSYSSCTVTTVQPMDR LPYQHFSAHFTSGPLVPRLAGMANH
GSPQL
GEGMFQHQTSVAHQPVVRQCGPQTGLQSPGSLQASEFLYSHGV PRTLSPHQYH
```

SAVHG VGMVPEWSDNS" (SEQ ID NO:9)

[0182]

[0183] 호모 사피엔스(*Homo sapiens*) NK2 전사 인자 관련, 유전자좌 5 (초파리), mRNA (cDNA 클론 MGC:34495 IMAGE:5225103), 완전 cds

[0184] 인간 NKX2-5 유전자 정보: 진뱅크: BC025711.1

[0185] 유전자좌 BC025711 1632 bp mRNA 선형 PRI 15-JUL-2006

[0186] 정의 호모 사피엔스 NK2 전사 인자 관련, 유전자좌 5 (초파리), mRNA (cDNA 클론 MGC:34495 IMAGE:5225103), 완전 cds. 수탁 BC025711 버전 BC025711.1 GI:19343930

[0187] 단백질 서열 정보

[0188] 108..1082 /유전자="NKX2-5" /유전자\_동의어="CSX1" /유전자\_동의어="NKX2.5" /코돈\_개시=1 /생성물="NK2 전사 인자 관련, 유전자좌 5 (초파리)" /단백질\_id="AAH25711.1" /db\_xref="GI:19343931" /db\_xref="유전자ID:1482" /db\_xref="HGNC:HGNC:2488" /db\_xref="MIM:600584"

[0189] 인간 NKX2-5 단백질 서열

```
"MFPSPALTPPTPFSVKDILNLEQQQRSLAAAGEL SARLEATLAPS
SCMLAAFKPEAYAGPEAAAPGLPELRAELGRAPS PAKCASA AFPAAPAFYPRAYS DPD P
AKDPRAEKKELCALQKAVELEKTEADNAERPRAR RRRKPRVLF SQAQVYELERRFKCQQ
RYLSAPERDQQLASV LKTSTQVKIWFQNRRYKCKRQRQDQQTLELVGLPPPPP PARRI
AVPV LVRDGKPCLGDSAPYAPAYGVGLNPYGYNAYPA YPGYGG AACSPG YSCTAAYPA
GPSPAQPATAAANNNFVNFGVGDLNAVQSPGIPQ5NSGVSTLH GIRAW" (SEQ ID NO:10)
```

[0190]

[0191]

인간 NKK2-5 mRNA 서열

```

1 gacgggtgcg cgggcggcgcg cgggcacccat gcaggaaagc tgccaggggc
cgtgggcagc
61 gccgctttct gccgcccacc tggcgtgtg agactggcgc tgccaccatg
ttccccagcc 121 ctgtcteac gcccacgccc ttctcaqtca aagacatct
aaacctggaa cagcagcagc 181 gcagecttgc tgccggcgggagactctcg
cccgcccttggaa gcegaccctg gcccgcctct 241 ctgtcatgtct ggccgccttc
aagccagagg cctacgctgg gcccggaggcg gctgcggccgg 301 gcctccca
gtcgccgca gagctggcc gcccgccttc accggccaag tgcgtctg 361
cttcccccgcg cggcccccggc ttctatccac gtcgttgcg cggcccccggc
421 acccttagagc cggggggaaa gagctgtgcg cgttgcagaa ggcgggtggag
ctggagaaga 481 cagaggcgggaa acacgcggag cggcccccggg cggccggc
gaagaagccg cgcgtgtct 541 tctcgagggc gcagggtctat gagctggagc
ggccgttcaa gcaagcgggaa tacctgtcg 601 ccccccgaacg cgaccagctg
gccaacgtgc tggaaactcac gtcacacgcg gtcaagatct 661 ggttccagaa
cccgccgttac aatgtcaagc ggcggccggca ggaccggact ctggagctgg 721
tggggctgccc cccggccggc cccggccctg cccggggat cgcgttgcga gtgtgggtgc
781 gcaatggcaaa gccatgccta ggggactcgg cggccatccgc gcctgcctac
ggcgttggcc 841 tcaatcccta cgggttataac gcttaccccg cctatccggg
ttacggccggc gggccctgca 901 gcccggcta cagctgcact gcccgttacc
ccggccggcc ttccccagcg cagccggcca 961 ctggcccccgc caacaacaac
ttctgttact tggcgttgcg ggacttgcgt ggggttccaga 1021 gccccggat
tccgcagggc aacttggggat tgcgttgcgt gcatggatcc cgaggcttgcgt 1081
agggaaaggga cccggcgttgc gggcccttgc cccatcccac ctcaacagst cctgtactt
1141 cggggggggaaa agggggttccca aacatgaccc tggatccccct ggattttgc
tttacttctg 1201 cggagaccta gggacttttt ctgtcccaacg cgggtttgtt
cttgccgcacg gggaggtttg 1261 tggccggcgt tatgcagcgt gcaatgagtg
atccctgcagc ctgggtgttct agctgtcccc 1321 ccaggagtgc cctccggagag
tccatggggca cccgggggttgc gaaacttggac tgagctcg 1381 cacgcaggc
cttggatctg gggccggcatt cccgcggcaca gggccggccggc cccggggctt 1441
tgcgttgcgttgc cccatggggca cccacgcacc caccgttatt tatgtttttt cctattgtgc
1501 taagaaaatgtt cccatggggaaa agatgttgcgtt gaaaaaaaaaaaaaaa
aaaaaaaaaaaaaaa 1561 aaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaa
aaaaaaaaaaaaaaa 1621 aaaaaaaaaaaa aa // (SEQ ID NO:11)

```

[0192]

호모 사피엔스 심장 및 신경 능선 유도체 발현 2 (HAND2) mRNA, 완전 cds

[0193]

진뱅크: FJ226608.1

[0194]

인간 HAND2 유전자 정보

[0195]

유전자좌 FJ226608 2351 bp mRNA 선형 PRI 15-APR-2009

[0196]

정의 호모 사피엔스 심장 및 신경 능선 유도체 발현 2 (HAND2) mRNA, 완전 cds. 수탁 FJ226608 VERSION FJ226608.1 GI:209170693

[0197]

인간 HAND2 mRNA 정보

[0199] 2234..2239 /조절\_부류="폴리A\_신호\_서열" /유전자="HAND2" 기원

```

1 agctgtacat ggagatcttg ctggaaaaat ccgcttgc tc ccacgtc
gtccagccca

61 ggagaaccac cgccgtcacc ccggagcttc ctccggccacc gcgcagagcc
ctccgagagc

121 ccgagccgcg gtcttcgagc tccaaggctc attcagggcc ccagatcctt
gccccgaaag 181 gagaggatct gaaaaatgg atgcactgag acctctctga
aaacccctcg agagagcgcg 241 agaggagcga ggacacgtta ctccgcgcgt
aaatcacatt taaggaccaa aacaacaaca 301 accaaaaatt tcttaaaac
aataaggcgc caagaaccca gatcgggctg gtggggggag 361 gggaaagggc
ggaaaggggg qggtagcgc gaggtagctt tgcaatgc agtgcacccc 421
gccgcgcgc ggcacagctg gacccgcttc tccagccgcg gcctagactc gcccctggat
481 tccgggttsg ctccgggtcc agggccgcgg cccgggctt gattcccgag
actccgcgt 541 ccagccctgc gggagccccc gcaccccttgc atgacacga
gaggattctg ctccgcgc 601 gcagccccgg aagcaggagc cgaagcgcgg
gcccgtggc aaggccggaa ccggaggccgg 661 cggccgcgc ggcaggggc
gcacgcgtcc aggaccatgc cggccgcgc catggggagc 721 cggccgcgc
agcgcgtctg aggccggccgc ggctggccag gcggggggac gggcccccggg 781
ctgcagcgc cccctctgcg gctgcgggac gggccgggc gcccggggc tgggggggtgg
841 ggggtgggg aggacggcga gogctgaggc agggggccgg gccgaggggc
cgccggggct 901 ggcgcacgc tggggcgcgt ggagggggcggaa
atgatgtgg taggtggttt 961 tccccacac cccgtgggtgc accacagagg
ctaccgggtt ggcgcggcgc cccgcgcagc 1021 tgccgcgcgc gccgcagcc
gctgcagccca tgaggagaac ccctacttcc atggctggct 1081 catcgccac
cccgagatgt cgcgcgcgcg ctacagcatg gcccgttcc acagcccccga 1141
gtatgcgcgc ggcgcgcgcg gcctggacca ctccattac ggggggggtgc cggccggcgc
1201 cggggccccc ggctgggggg ggcgcgcgcg ggtgaagcgc cgaggcaccg
ccaaacgc 1261 ggacgcgcgc aggactcaga gcatcaacag cgccttcgc
gaactgcgcg agtgcacatccc 1321 caacgtaccc ggcacacca aacttccaa
aatcaagacc ctgcgcctgg ccaccagcta 1381 catcgctac ctcatggacc
tgctggccaa qgacgaccag aatggcgagg cggaggccctt 1441 caaggcagag
atcaagaaga cgcacgtgaa agaggagaag aggaagaagg agtgcacgca 1501
aatcttggaa agcacagtga gcaagcaacga caagaaacc aaaggccgga cgggctggcc
1561 qcagcacgtc tggccctgg agtcaagcga tgaggaggaa ggagaaggag
gaggaggaga 1621 ggcgcgactgca gcaaggggcaga aggcgcgcga tgcaagccca
ggactccggaa aagccgtcc 1681 ggcgcgcgt ctggggactc ctgcatttg
qaatcatccg qtttattttat tgcaatttc 1741 ctcccccttc ctgttgcaccc
ctttgaggca tctgtcccc gtctccccc ccaaaaaaaaaa 1801 agtggatatt
tgaagaaaaag cattccatat tttaatacga agaggacact cccgtgtgg 1861
aaggatccc gtcgttcat agatctgtg tgctgttgc tcccttgc gctgtgtaga
1921 caccagcggtt gccccccgcg aactactca accccttcca gataaaagaca
gtggcacta 1981 gtgcgtttgtt gaagtgttca tttaataactt ggcctttgg
tataatattt cctgggtatt 2041 ataaaatgtt attcaaaagc agaaaacagg
ggcgcctaaca ttccgttgg ggtcggtatc 2101 tagtgcatac cattcatctg
tggcggttcc ctccgttgaag atgtttccaa cagccacttg 2161 ttttgcac
ttccgttcc taaaactaaa tggaaattttaa ttatattga aggtgtaaac 2221
gttgcgttca ttcaataaac cactgtgttt ttttttaca aaaaccttaa tcttttaatg
2281 gctgataacct caaaagagtt ttgaaaacaa agtgcgttata cttgttttcg
taatattttaa 2341 aatattcaga a // (SEQ ID NO:12)

```

[0200]

[0201] 인간 HAND2 단백질 정보

[0202]

/생성물="심장 및 신경 능선 유도체 발현 2" /단백질\_id="ACI42790.1" /db\_xref="GI:209170694"

```

/번역="MSLVGGFPHHVPHHEGYPFAAAAAAAAAASRC SHEENPYFH
GWLIGHPEMSPPDYSMALSYSPEYASGAAGLDHSHYGGVPPGAGPPGLGGPRPVKRRG
TANRKERRRTQSINSAF AELRECIPNVPADTKLSKIKTLRLATSYIAYLMDLLAKDDQ
NGEAEAFKAEIKKTDVKEEKRKKE LNEILKSTVSSNDKKTGRTGWPQHVWALELKQ" (SEQ ID
NO:13)

```

[0203]

[0204] 호모 사파엔스 T-박스 5, mRNA (cDNA 클론 MGC:35581 IMAGE:5204163), 완전 cds

[0205]

진뱅크: BC027942.1

[0206]

인간 TBX5 유전자 정보:

[0207]

유전자좌 BC027942 3748 bp mRNA 선형 PRI 15-JUL-2006

[0208]

정의 호모 사파엔스 T-박스 5, mRNA (cDNA 클론 MGC:35581 IMAGE:5204163), 완전 cds. 수탁 BC027942 VERSION BC027942.1 GI:20379838

### 인간 TBX5 mRNA 정보:

기원

```

 1 ttcagagaga gagagagagg gagagagagt gagagagact gactttacc
tcgaatccgg 61 gaacttaat cctgaaagct gcgctcagaa aggacttca
ccatcactg ggcttccaaac

121 ttccctccg tgggggtgta aaggaggagc ggggcactga gattatatgg
ttccgggtgc 181 tcttgaggc tattttgtgt tctttggcgc ttgccaactg
ggaaagtattt agggagagca 241 agcgcacagc agaggaggtg tgggtggag
gtgggcagtc gccgcggagg ctccagcggt 301 aggtgcgccc tagtaggcag
cagtagccgc tattctgggt aagcagtaaa ccccgatcaa 361 accccggagc
ccatcgct gtcggccgc ctcaccccg 961 gtcggccgc taggagcgc 421
agaggatgtg gtgaatgcac cggcttcacaa gaacgcgagc agaaccttgc ggggcacag
481 ggccttggc gcacatggc cgacgcacagc gagggttgc gcttggcga
cagcgtctg 541 gagoctgacg caaaagaccc gcccgtcgat tcgaaacccg
aqaqcgcgctt cggggcccc 601 aqcaaqtcac cgttcgtcccc qcaqgcgcqcc
ttcacccagc aqggcatgga gggatcaaa 661 gtgtttctcc atgaaagaga
actgtggcta aaattccacg aqgtggc 961 aqcaaqtcac cgttcgtcccc qcaqgcgcqcc
ctgaaaggcg gatgtttccg aqgttacaag tggaaatgtac 721 ataaccaagg
cccggccaa aqgtacatct tctcatggc attqtatctt cggacgtatca cagatacaca
841 ttgcagata aataatggt tggacgggg aqgtgacg cggccatgcc
tggccgcctg 901 tacgtgcacc cagaatcccc cggccacccgg ggcatttgg
tgaggcactg cgttcgtcccc 961 cagaaactca agtgcacccaa caaccacccgt
gaccatattt ggcataattat tctaaattcc 1021 atgcacaaaat accagccatag
attacacatc gtgaaagcgg atgaaaataa tggatttggc 1081 tcaaaaaataa
caggttctg cactcacgtc ttccgtgaga ctgcgtttat agcagtgtact 1141
tcttaccaga accacaagat caccaatca aqgttgcata ataatccctt tgccaaadga
1201 ttccggggca gtgtatgacat ggagctgcac aqgtgtcaaa gaatgtcaaa
taaagaataat 1261 cccgttggcc ccaaggacac cgttggggca aqgttgcctt
ccacccacaaq tccttccac 1321 aqcaqgttc acgttgcac caccatccatc

```

3721 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaa (SEQ ID NO:14)

[0213] 인간 TBX5 단백질 정보

/코돈\_개시=1 /생성물="T-박스 5" /단백질\_id="AAH27942.1" /db\_xref="GI:20379839" /db\_xref="유전자ID:6910" /db\_xref="HGNC:HGNC:11604" /db\_xref="MIM:601620"

/번역="MADADEGFGLAHTPLEPDAKDLPCDSKPESALGAPSJKSPSSPQA  
AFTQQGMEGIKVFLHERELWLKFHEVGTEMIITKAGRRMFPSSYKVKTGLNPKTKYIL  
LMDIVPADDHRYKFADNKWVSGKAEPAMPGRLYVHPDSPATGAHWMRQLVSFQKLKL  
TNNHLDPFQGHIIILNSMHKYQPRHLHIVKADENNGFGSKNTAFCTHVFPETAFIAVTSYQ  
NHKITQLKIENNPFAGFRGSDDMELHRMSRMQSKEYPVVPRSTVRQKVASNHSPFSS  
ESRALSTSSNLGSQYQCENGVSGPSQDLPNNPYPLPQEHSQJYHCTKRKEEECSTT  
DHPYKKPYMETSPSEEDSFYRSSYPQQQGLGASYRTEASAQRQACMYASSAPPSEPVPS  
LEDISCNWTWPSMPSYSSCTVTTVQPMDRLPYQHFSAHFTSGPLVPRLAGMANHGSPQL  
GEGMFQHQTSVAHQPVVRQCGPQTGLQSPGTLQPPEFLYSHGVPRTLSPHQYHSVHGV

[0215] GMVPEWSDNS" (SEQ ID NO:15)

[0216] 참고문헌

1. Garry, DJ, Martin, CM. Circ Res. 2004;95(9):852-4.
2. Hoffman, JL. Pediatr Cardiol. 1995;16(3):103-13.
3. Kang, HK, et al. American journal of industrial medicine. 2000;38(4):447-54.
4. Kramarow, EA, Pastor, PN. NCHS data brief. 2012(101):1-8.
5. Rasmussen, TL, et al. Circulation. 2011;123(16):1771-9.
6. Garry, DJ, Olson, EN. Cell. 2006;127(6):1101-4.
7. Latif, S, et al. Trends Cardiovasc Med. 2006;16(7):234-40.
8. Ferdous, A, et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009;106(3):814-9. PMCID: 2630085.
9. Caprioli, A, et al. Circulation. 2011;123(15):1633-41. PMCID: 3110259.
10. Rasmussen, TL, et al. Development. 2011;138(21):4801-12. PMCID: 3190388.
11. Borges, L, et al. Blood. 2012;119(23):5417-28.
12. Koyano-Nakagawa, N, et al. Stem Cells. 2012;30(8):1611-23. PMCID: 3651838.
13. Rasmussen, TL, et al. PLoS One. 2012;7(11):e50103. PMCID: 3501484.
14. Behrens, et al. Stem Cells and Development. 2013;22(15):2211-20. PMCID: 3715789.
15. Behrens, AN, et al. Etv2 transactivates Sox7 and regulates endothelial development. Submitted to Developmental Biology. 2013.
16. Borges, L, et al. Levels of endoglin distinctively control TGFb/BMP signaling at different stages of yolk sac hematopoiesis. Submitted to Stem Cells Revised manuscript under review. 2013.
17. Borges, L, et al. Stem Cells. 2013;31(9):1893-901. PMCID: 3795927.
18. Chan, SS, et al. Cell Stem Cell. 2013;12(5):587-601. PMCID: 3646300.
19. Rasmussen, TL, et al. Genesis. 2013;51(7):471-80.
20. Behrens, AN, et al. Stem Cells Dev. 2014;23(17):2004-13. PMCID: 4142794.
21. Shi, X, et al. Dev Biol. 2014;389(2):208-18. PMCID: 4099474.

[0217]

22. Lyons, I, et al. *Genes Dev.* 1995;9(13):1654-66.
23. Srivastava, D, et al. *Nat Genet.* 1997;16(2):154-60.
24. Tanaka, M, et al. *Development.* 1999;126(6):1269-80.
25. Bruneau, BG, et al. *Cell.* 2001;106(6):709-21.
26. Yamagishi, H, et al. *Dev Biol.* 2001;239(2):190-203.
27. Carlson, DF, et al. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(43):17382-7. PMCID: 3491456.
28. Tan, W, et al. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013.
29. Xin, J, et al. *PLoS One.* 2013;8(12):e84250. PMCID: 3866186.
30. Kure-bayashi, S, et al. *Theriogenology.* 2000;53(5):1105-19.
31. Naseem, RH, et al. *Physiol Genomics.* 2007;30(1):44-52.
32. Martin, CM, et al. *Circ Res.* 2008;102(9):1075-81.
33. Sadek, H, et al. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(16):6063-8. PMCID: 2329693.
34. Roger, VL, et al. *Circulation.* 2012;125(1):188-97.
35. Bodmer, R. *Development.* 1993;118(3):719-29.
36. Hiroi, Y, et al. *Nat Genet.* 2001;28(3):276-80.
37. Masino, AM, et al. *Circ Res.* 2004;95(4):389-97.
38. Kobayashi, T, et al. *Cell.* 2010;142(5):787-99.
39. Usui, J, et al. *Am J Pathol.* 2012;180(6):2417-26.
40. Bort, R, et al. *Dev Biol.* 2006;290(1):44-56.
41. Matsunari, H, et al. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(12):4557-62. PMCID: 3607052.
42. Kure-Bayashi, S, et al. *Theriogenology.* 1996;46(6):1027-36.
43. Adamo, L, Garcia-Cardena, G. *Dev Biol.* 2012;362(1):1-10.
44. Rhee, JM, Iannaccone, PM. *Dev Biol.* 2012;365(1):1-13. PMCID: 3322272.
45. Heinz, M, et al. *Exp Hematol.* 2002;30(7):809-15.
46. Crisan, M, et al. *Cell Stem Cell.* 2008;3(3):301-13.
47. Makkar, RR, et al. *Lancet.* 2012;379(9819):895-904.
48. Nakano, K, et al. *PLoS One.* 2013;8(4):e61900. PMCID: 3633951.
49. King, TJ, et al. *Reproduction.* 2002;123(4):507-15.
50. Zhu, J, et al. *Cloning Stem Cells.* 2003;5(4):355-65.

[0218] 51. Brustle, O, et al. *Nat Biotechnol.* 1998;16(11):1040-4.

52. Messina, E, et al. *Circ Res.* 2004;95(9):911-21.

Bodmer, R. (1993) *Development* 118(3): 719-729.

Bruneau, B. G., et al. *Cell* 106(6): 709-721.

Caprioli, A., et al. *Circulation* 123(15): 1633-1641.

Ferdous, A., et al. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(3): 814-819.

Garry, D. J. and E. N. Olson (2006). *Cell* 127(6): 1101-1104.

Lyons, I, et al. *Genes Dev* 9(13): 1654-1666.

Srivastava, D, et al. *Nat Genet* 16(2): 154-160.

Tanaka, M, et al. *Development* 126(6): 1269-1280.

Yamagishi, H, et al. *Dev Biol* 239(2): 190-203.

[0219]

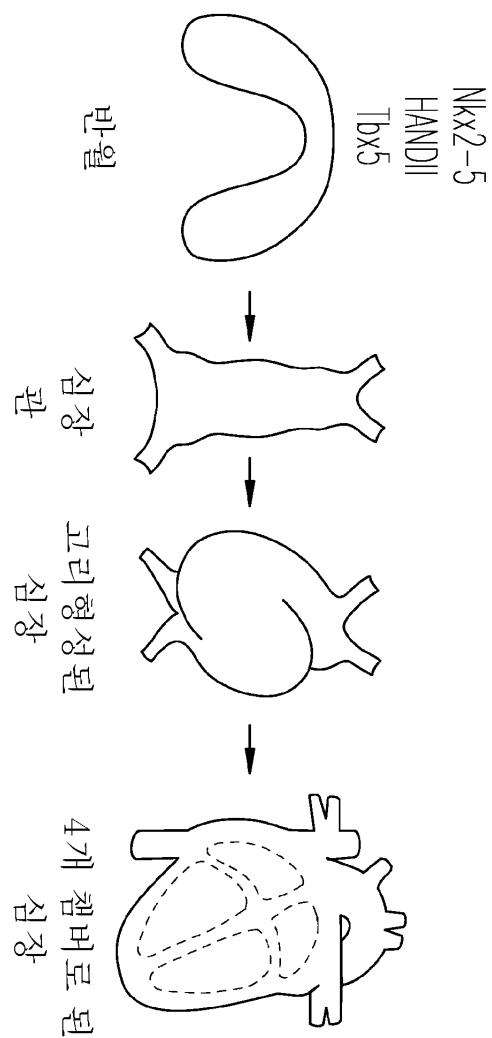
[0220]

본원의 개시내용 전역에 걸쳐 언급된 모든 공개문헌, 특허, 및 특허 출원, 진뱅크(진뱅크) 서열, 웹사이트 및 다른 공개된 자료는 마치 각각의 개별 공개문헌, 특허, 또는 특허 출원, 진뱅크 서열, 웹사이트 및 다른 공개된 자료가 참조로 포함되는 것으로 구체적으로 및 개별적으로 명시된 것과 같은 정도로 본원에서 참조로 포함된다.

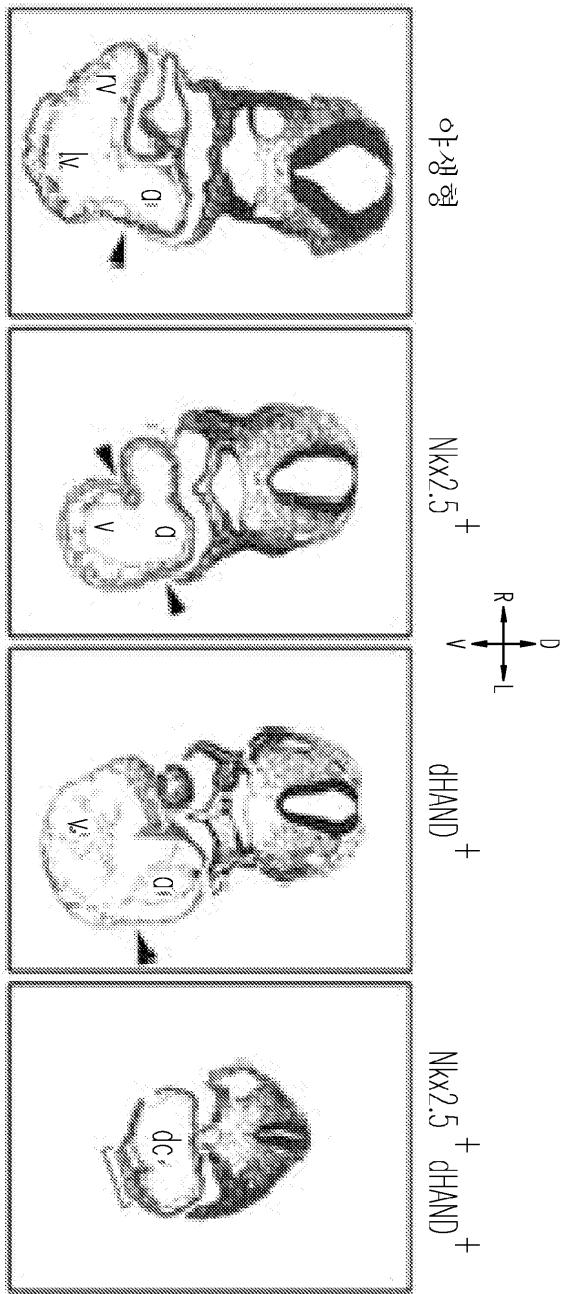
참조로 포함된 용어 정의가 본원에서 정의된 용어와 상충하는 경우, 본 명세서가 조정하여야 한다.

## 도면

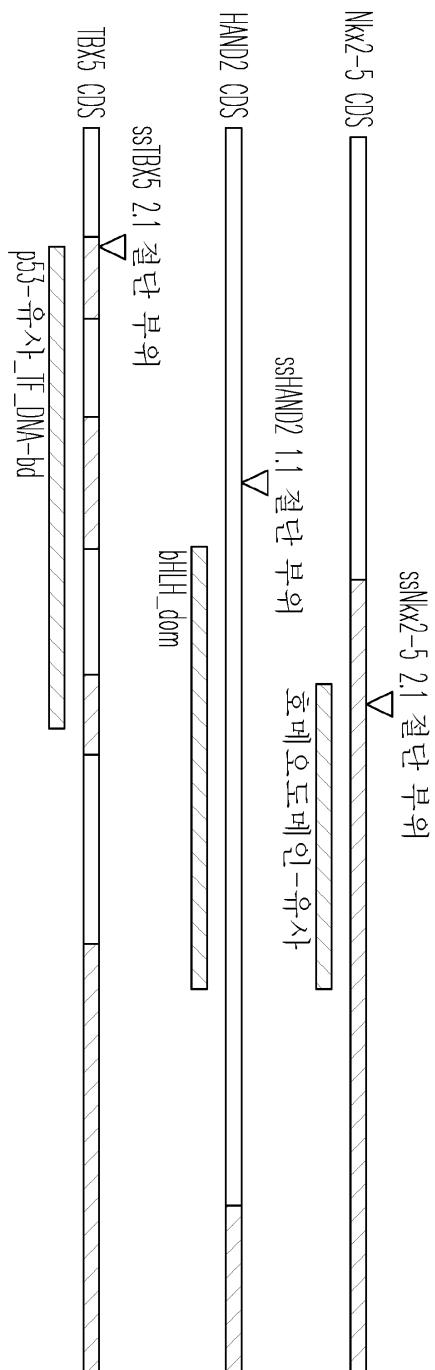
### 도면1



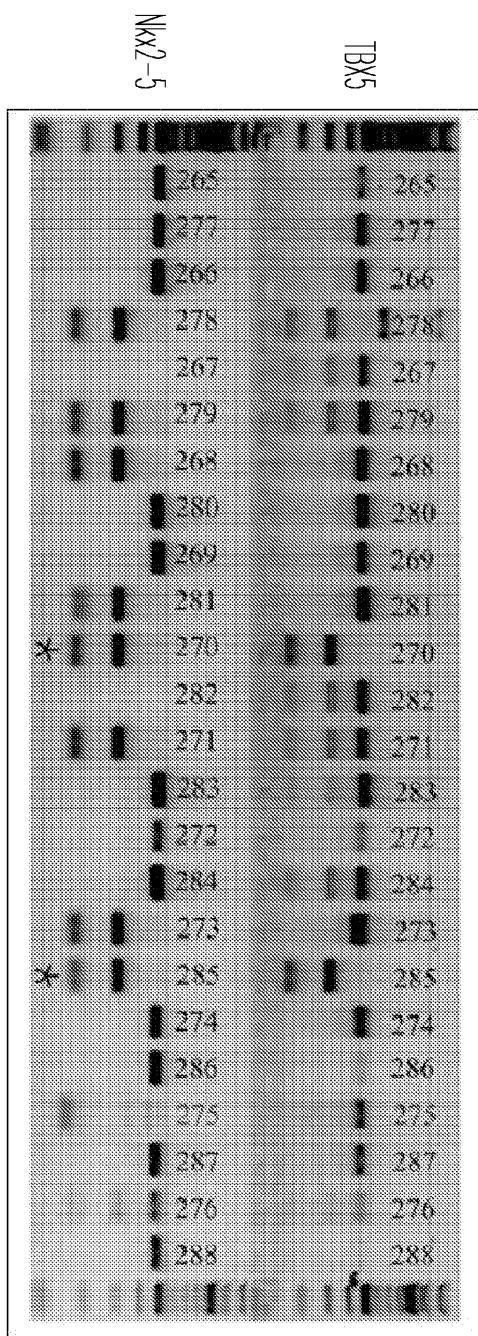
도면2



## 도면3a



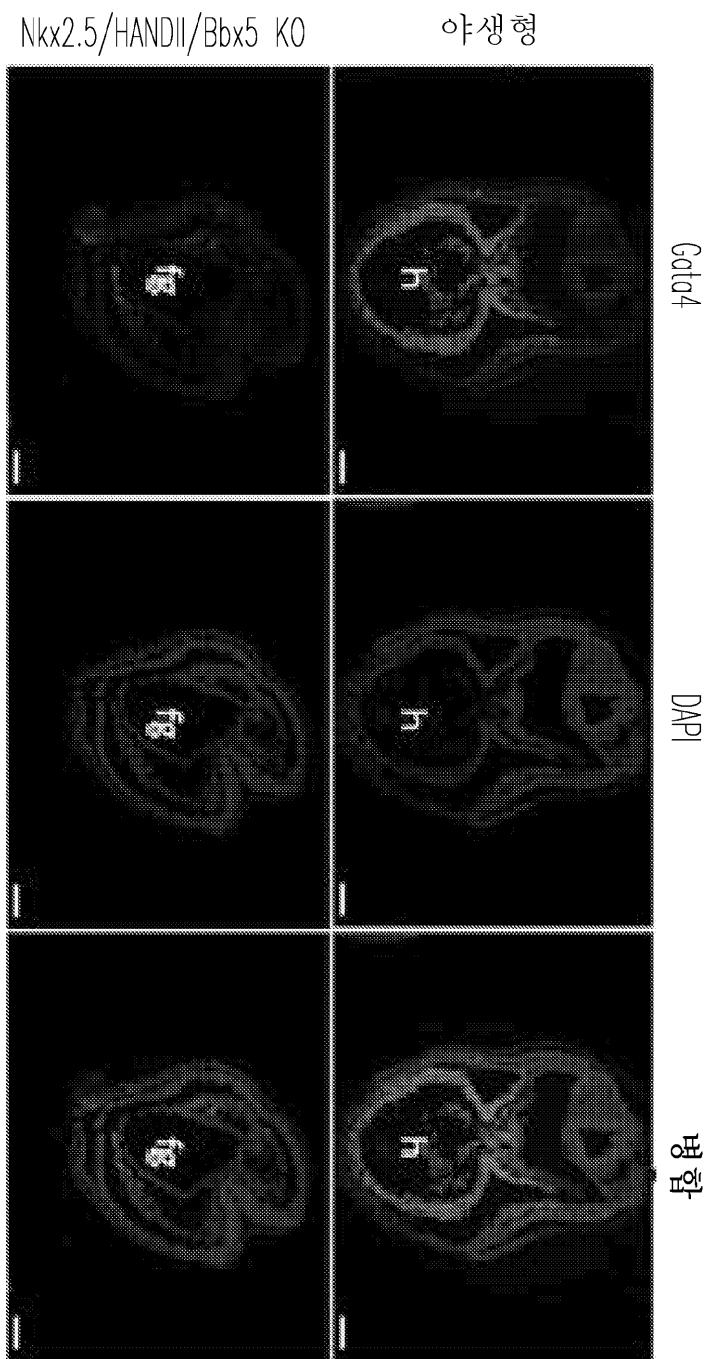
## 도면3b



## 도면3c

TALEN 상	동형접합성		Nkx2-5 및 TBX5 이중 KO의 수 (전체 중 %)	삼중 유전자 돌연변이체의 수 (전체 중 %)
	KO의 수 (전체 중 %)	이중 KO의 수 (전체 중 %)		
ssNkx2-5 2.1	102 (21%)			
ssNkx2-5 2.1	N/A	33 (7%)		4 (1%)
ssTBX5 2.1		65 (14%)		

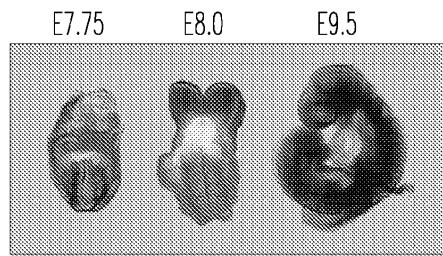
도면4



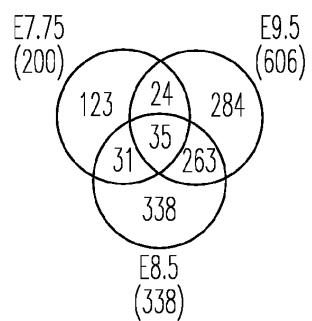
도면5a

Nkx 2.5 6kb 인핸서	Hsp68	EYFP
-----------------	-------	------

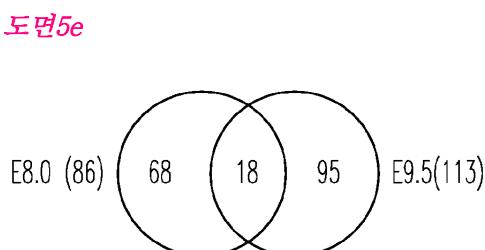
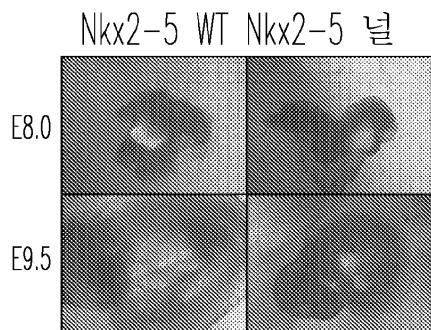
도면5b



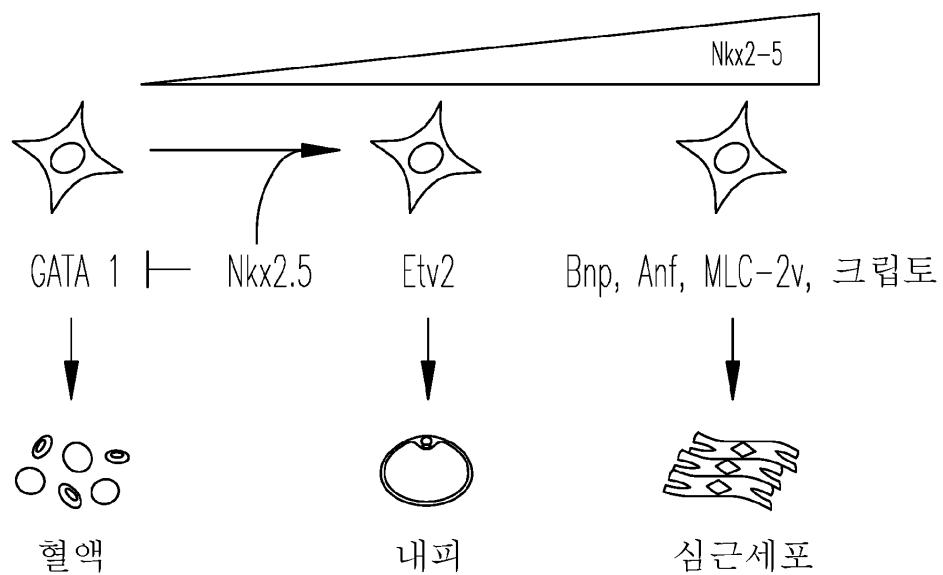
도면5c



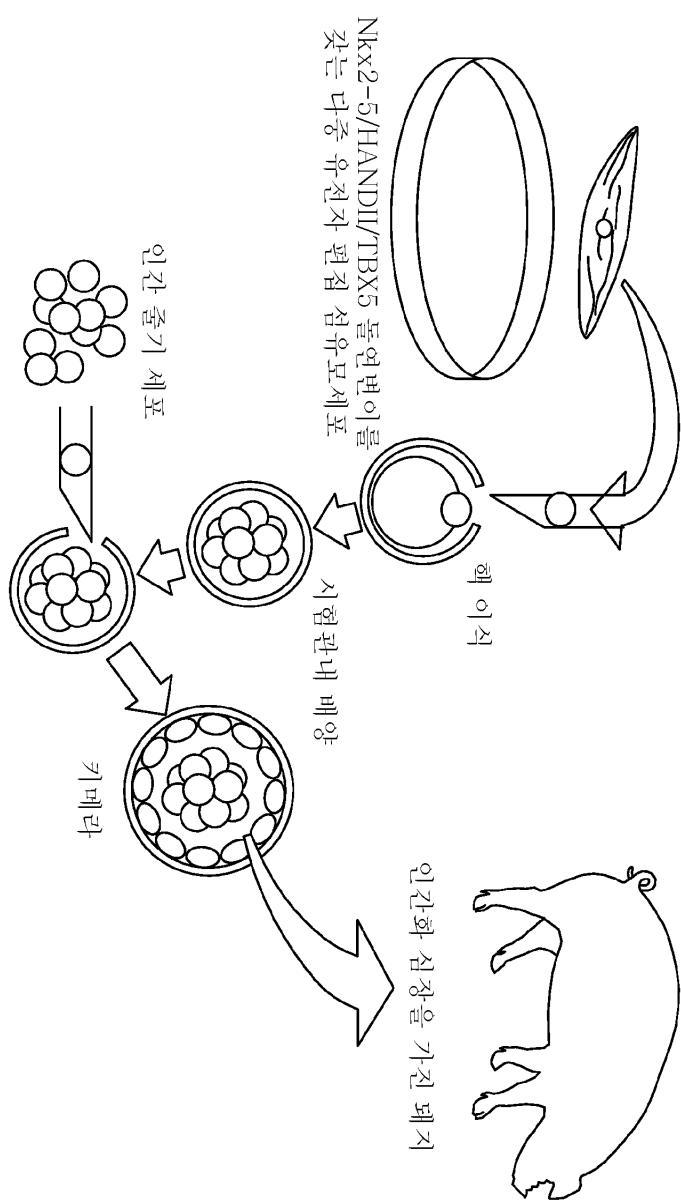
도면5d



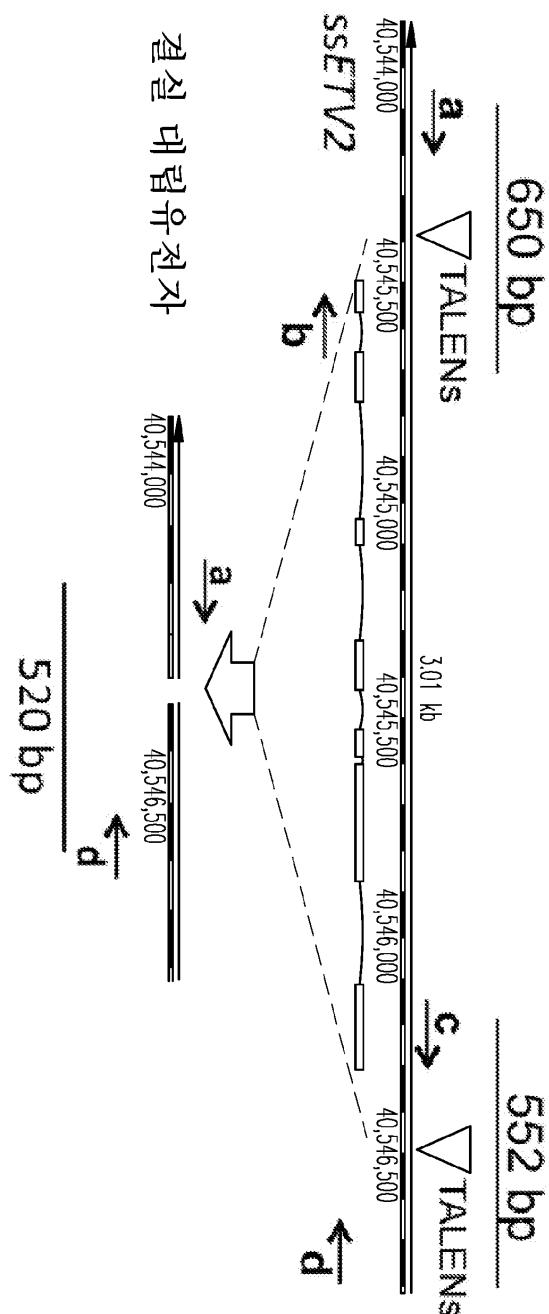
도면5f



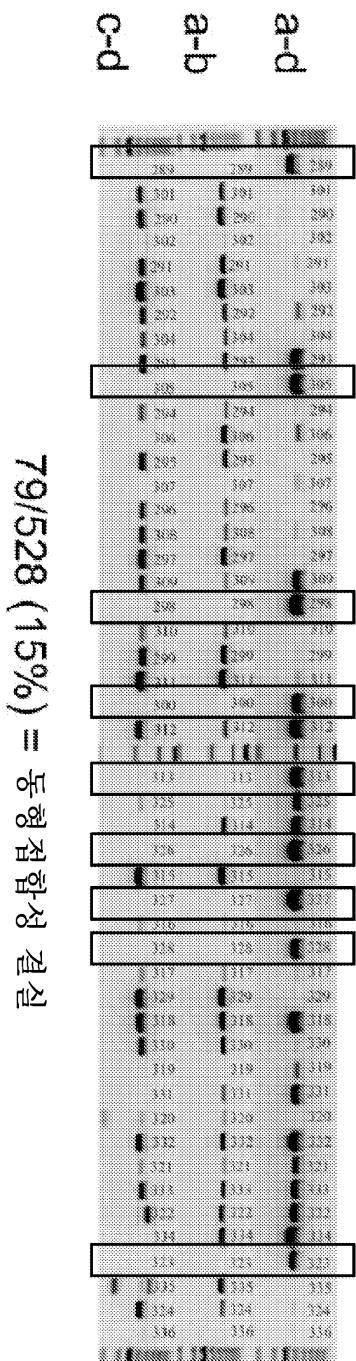
도면6



도면7a



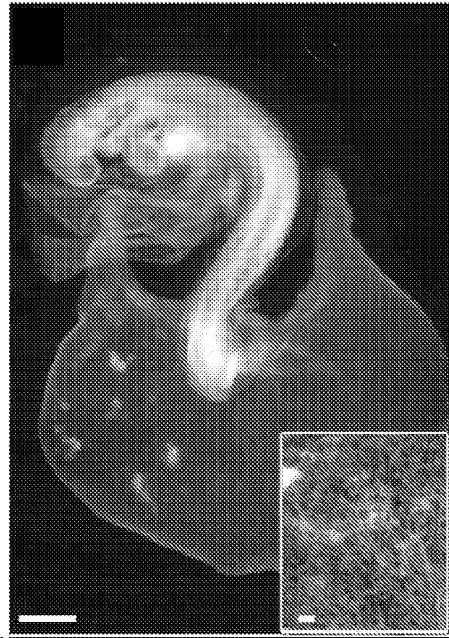
### 도면7b



79/528 (15%) = 동형접합성 결실

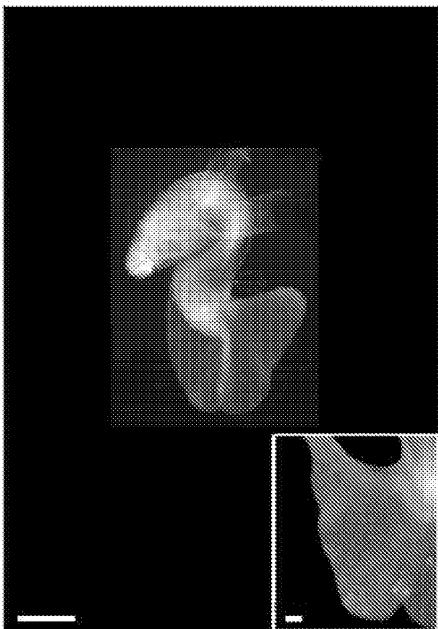
도면8a

E18 야생형

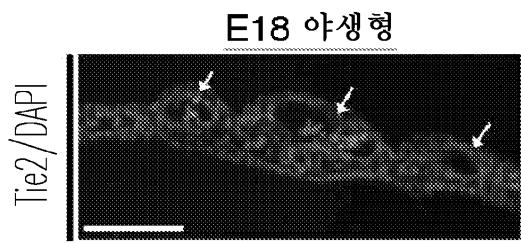


도면8b

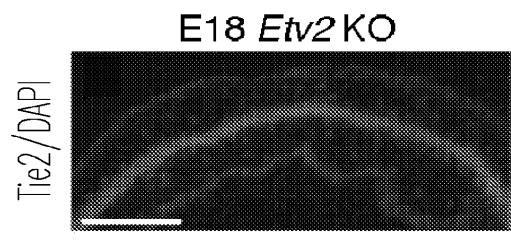
E18 *Etv2* KO



도면8c

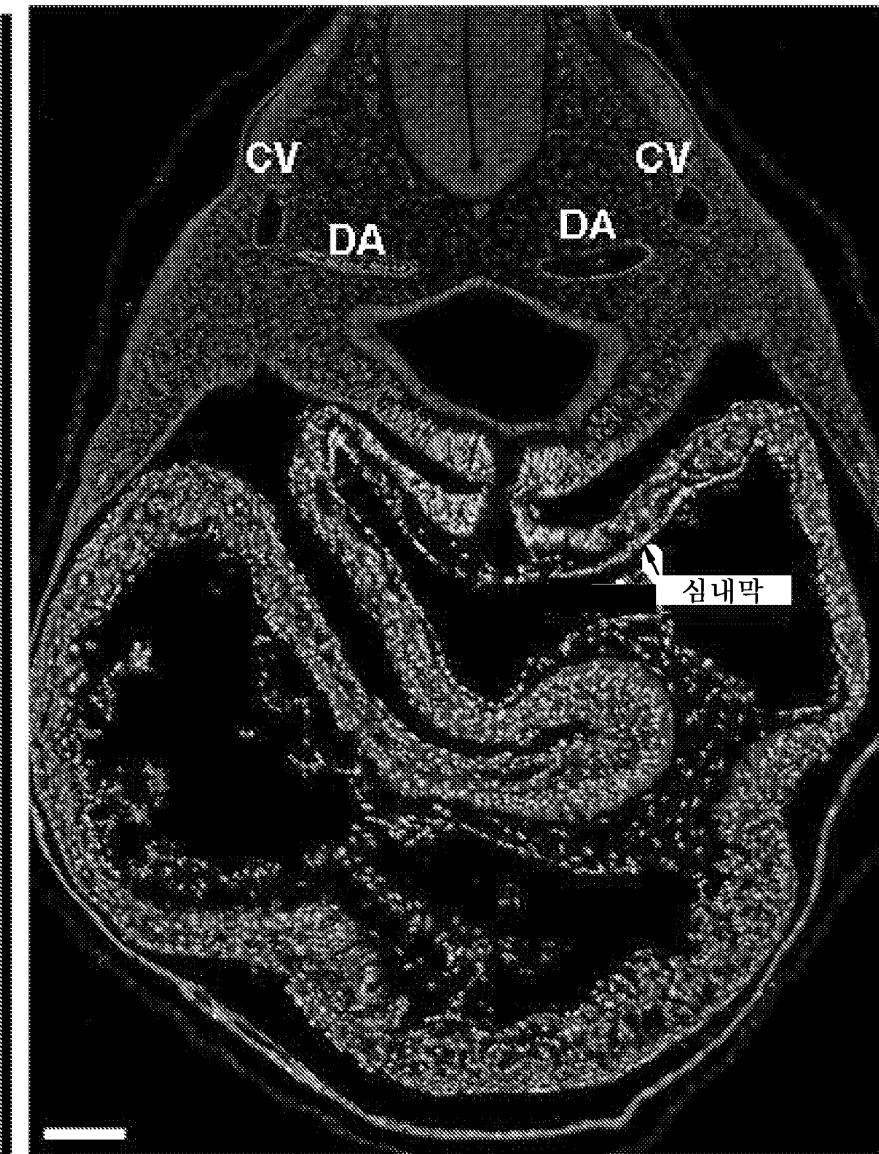


도면8d



도면8e

Tie2/GATA4/DAPI



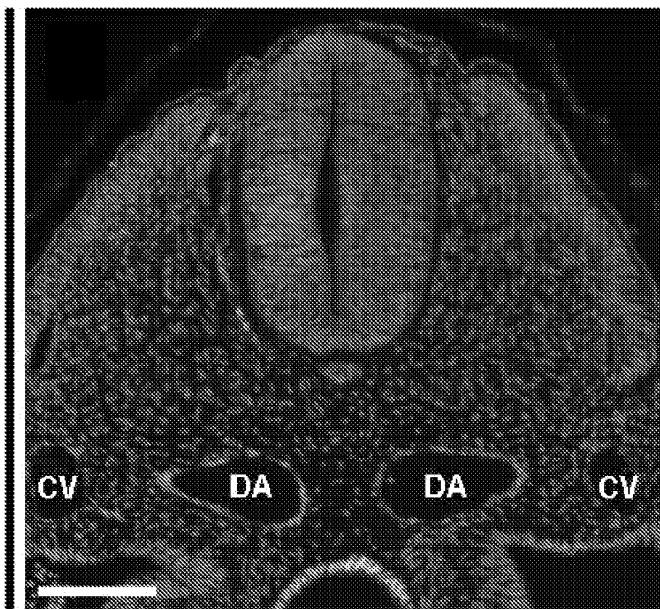
도면8f

Tie2/GATA4/DAPI



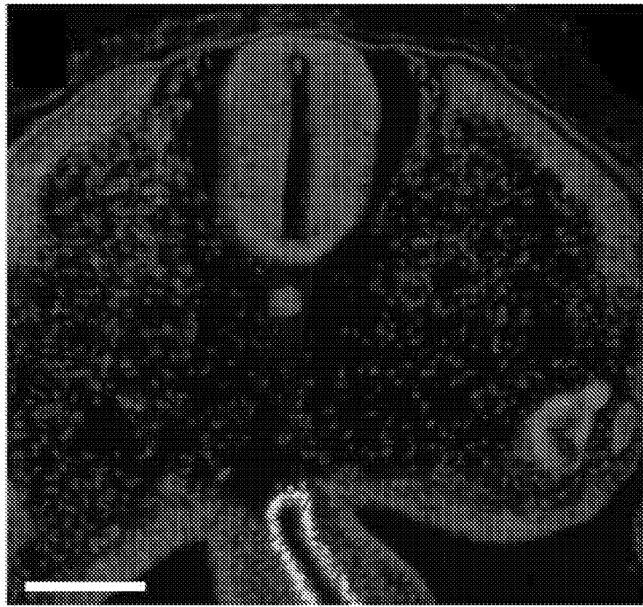
도면8g

Tie2/GATA4/DAPI

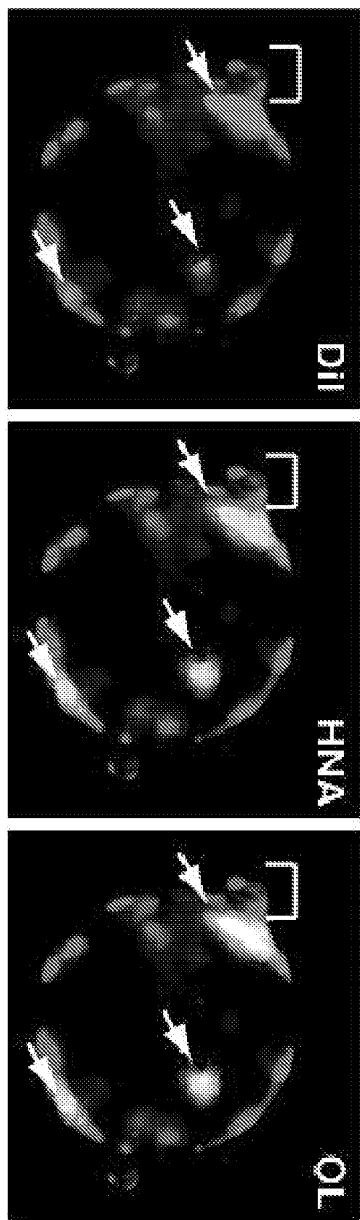


도면8h

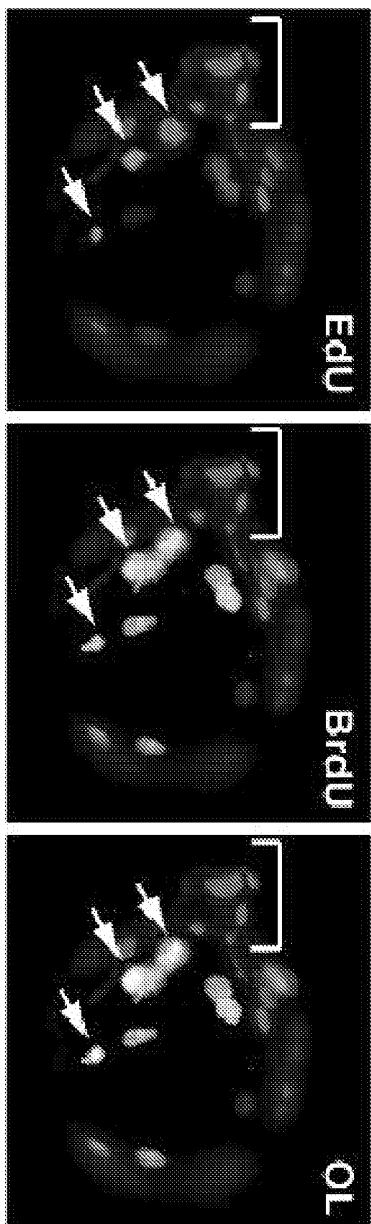
Tie2/GATA4/DAPI



도면9a



도면9b



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> Garry, Daniel J.

Garry, Mary G.

Koyano-Nakagawa, Naoko

Regents of the University of Minnesota

<120> HUMANIZED HEART MUSCLE

<130> 600.978W01

<140> PCT/US2016/040431

&lt;141&gt; 2016-06-30

&lt;150&gt; US 62/187,040

&lt;151&gt; 2015-06-30

&lt;160&gt; 15

&lt;170&gt; FastSEQ for Windows Version 4.0

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 1725

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Sus scrofa

&lt;400&gt; 1

gtccccctcc tccggcctgg tcccgcctct cctgcccctt ggcgcggca ttacctgccc 60

cctggccaca tcccgagctg gaaggcgggt ggcgcggcgc gcagcgggca ccatgcaggg 120

aggctgccag ggaccgtggg cagcgcgcgt ctctgcccac cacctggcgc tgtgagacgc 180

gcgcgtgccac catgttcccc agcccccgcgc tcacgcacac gccgttctcg gtcaaagaca 240

tcttgaacct ggagcaacag cagcgcagcc tggccgcgg ggagctctcc ggcgcgttgg 300

aggccacccct ggcgcggcc tcctgcatgc tggccgcctt caagcccgag gcctacgcgg 360

ggccggaggc cgcaaggcccc ggcctctccg agctgcgcgc cgagctggc cccgcgcct 420

caccagccaa gtgcgcgccc tccttctcag ccgcggccgc ctcttaccccg cgtgcctatg 480

gcgcacccga cccgcgaag gaccctcgag ccgataagaa aggtgaggag gaaacacaag 540

cttcttctct gcctctctgt tccccccgc agagctgtgc gcgcgtgcaga aggccgtgga 600

gctggagaag ccagaggcgg acagcgccga gagacctcg ggcgcacgcga gaaggaagcc 660

gcgcgtgctc ttgcgcagg cacaggctta cgagctggag cgacgcttca agcagcagcg 720

gtacctgtcg gctcccgagc gtgaccagtt ggccagcgtg ctgaagctca cgtccacgca 780

ggtaaagatc tggttccaga accggcgcta caagtgcac ccggcaacggc aggaccagac 840

tctggagcta gtggggctgc cccggcccc gccgcggccg gcccgcaggta tcgcgggtgcc 900

agtgcgtggc cgcgatggca agcctgcct cggggactcc gcgcctacg cgccagccta 960

cggcgtggc ctaaacgcct acggctataa cgcctacccc gcctacccgg gttacggtg 1020

cgcggcctgc agccctggct acagctgcac cgctgcgtac ccagccggc cgcccccggc 1080

gcagtcggct acggccgccc ccaataacaa cttcgtgaac ttccgcgtcg gggacttaaa 1140

cgcggcgtcag agccgggaa ttccgcaggc caactcgaa gtgtccacgc tgacacgtat 1200

ccgagcctgg tagggaaaggc gcctgtctgg ggcacctcta aagagggccta ctaactatcg 1260

gggagaggga gggctccga tacgatcctg agtccctcag atgtcacatt gactccacg 1320

gaggcctcg agcttttcc gtccggtgcg ccttatccc cacgcgcggg agagttcgtg 1380  
 gcagaggta cgagcttgg ggtgagtgtat cccgcagccc ggtgccttag cggtcgcccc 1440  
 gggagtgcgc tccaagcgcc cacgggcata cccaatcgcc tgacaccggc cagttggac 1500  
 cgggagcccg agcccaggcg tgccaggctt aagatgggc cgccttccc cgatcctggg 1560  
 cccggtgccc gggcccttg ctgccttgcc gctgcctcc ccacaccgt atttatgttt 1620  
 ttacttgttt ctgtaagaaa tgagaatctc cttccat aagagagtgc gctgatccgc 1680  
 ctgtgtgctt cttcagctt gctgtgctt agaaaactgaa atttt 1725

<210> 2

<211> 972

<212> DNA

<213> Sus scrofa

<400> 2

atgttccca gccccgcgt cacgcccacg ccgttctcg tcaaagacat cttgaacctg 60  
 gagcaacagc agcgcagct ggccgcggg gagctctcg cgcgcttgaa ggccaccctg 120  
 ggcgcgcctt cctgcatgtt ggccgccttc aagcccgagg cctacgcggg gccggaggcc 180  
 gcagcgcggc gcctctccga gctgcgcgcg gagctggcc ccgcgcctc accagccaag 240  
 tgcgcgcctt cttctcagc cgcccccgc ttctacccgc gtgcctatgg cgaccccgac 300  
 cccgccaagg accctcgagc cgataagaaa gagctgtgctc cgctgcagaa ggcggtgag 360

ctggagaagc cagaggcgga cagcgccgag agacctcggt cgcgacgacg aaggaagccg 420  
 cgcgtgtctt ttcgcagggc acaggtctac gagctggagc gacgcttcaa gcagcagcg 480  
 tacctgtcggtt ctcccgagcg tgaccagttt gccagcgtgc tgaagctcac gtccacgcag 540  
 gtcaagatct gttccagaa cggcgctac aagtgcacgc ggcaacggca ggaccagact 600  
 ctggagctag tggggctgccc cccggccccc cccgcaggat cgccgtgcca 660  
 gtgctgggtgc gcgatggcaa gcctgcctc gggactccg cgcctacgc ggcagctac 720  
 ggcgtggcc tcaacgccta cgctataac gcctaccccg cctacccggg ttacggtgcc 780

gcggcctgca gcccggcta cagctgcacc gctgcgtacc cagccggcc gccccggcg 840  
 cagtcggcta cggccggccgc caataacaac ttctgtaaact tcggcggtgg ggacttaaac 900  
 gcgggtgcaga gcccggggat tccgcaggcc aactcggtgg tgcacgcgt gcacggatc 960  
 cgagcctgggtt ag 972

<210> 3

&lt;211&gt; 323

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Sus scrofa

&lt;400&gt; 3

Met Phe Pro Ser Pro Ala Leu Thr Pro Thr Pro Phe Ser Val Lys Asp

1 5 10 15

Ile Leu Asn Leu Glu Gln Gln Gln Arg Ser Leu Ala Ala Gly Glu Leu

20 25 30

Ser Ala Arg Leu Glu Ala Thr Leu Ala Pro Ala Ser Cys Met Leu Ala

35 40 45

Ala Phe Lys Pro Glu Ala Tyr Ala Gly Pro Glu Ala Ala Ala Pro Gly

50 55 60

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

65 70 75 80

Cys Ala Pro Ser Phe Ser Ala Ala Pro Ala Phe Tyr Pro Arg Ala Tyr

85 90 95

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

100 105 110

Cys Ala Leu Gln Lys Ala Val Glu Leu Glu Lys Pro Glu Ala Asp Ser

115 120 125

Ala Glu Arg Pro Arg Ala Arg Arg Arg Lys Pro Arg Val Leu Phe

130 135 140

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

145 150 155 160

Tyr Leu Ser Ala Pro Glu Arg Asp Gln Leu Ala Ser Val Leu Lys Leu

165 170 175

Thr Ser Thr Gln Val Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Tyr Lys Cys

180 185 190

Lys Arg Gln Arg Gln Asp Gln Thr Leu Glu Leu Val Gly Leu Pro Pro

195 200 205

Pro Pro Pro Pro Ala Arg Arg Ile Ala Val Pro Val Leu Val Arg

210 215 220

Asp Gly Lys Pro Cys Leu Gly Asp Ser Ala Pro Tyr Ala Pro Ala Tyr

225 230 235 240

Gly Val Gly Leu Asn Ala Tyr Gly Tyr Asn Ala Tyr Pro Ala Tyr Pro

245 250 255

Gly Tyr Gly Ala Ala Cys Ser Pro Gly Tyr Ser Cys Thr Ala Ala

260 265 270

Tyr Pro Ala Gly Pro Pro Ala Gln Ser Ala Thr Ala Ala Ala Asn

275 280 285

Asn Asn Phe Val Asn Phe Gly Val Gly Asp Leu Asn Ala Val Gln Ser

290 295 300

Pro Gly Ile Pro Gln Gly Asn Ser Gly Val Ser Thr Leu His Gly Ile

305 310 315 320

Arg Ala Trp

<210> 4

<211> 1458

<212> DNA

<213> Sus scrofa

<400> 4

atggagatct tgcgtggaaa atccgcttgc tcccctcacg gcgcccgatc ccggagaaca	60
gcccggcccg ccgtcaccca ggagccccca cggccgctgc gcaacagccc tccaagcccc	120
agccggccgc ttccggagc acgagaggag agcggAACAC gttactcgct gctaaagtca	180
cattccagga ccaaaacaac aacaacccaa aatttcatta aaacaataag cgcccaagaa	240
cccagatcag gctgggtggg ggaagagatc ggccaccccg agatgtcgcc ccccgactac	300

agcatggccc tgcctacag tccggagtac gccagcggtg cggccagcct ggaccactcc	360
cattacgggg gggtgccgccc gggcgccggg ccccccggcc tggggggggcc ggcggccggtg	420
aagcgccggg gcacagccaa cgcgaaggag cggcgccagga ctcagagcat caacagcgcc	480
ttcgccgagc tgcgcgagtg tatccccat gtgcccggc acaccaaact ctccaagatc	540
aagacgctgc gcctggccac cagctacatc gcctacctca tggacctgct ggcgaaggac	600
gaccagaacg gcgaggcgga ggccttaag gcgaaatca agaagacaga tgtgaaagaa	660
gagaaaagga agaaggagct gaatgaaatc ttgaaaagca cagtgagcag caacgacaag	720

aaaacccaaag gccggacggg ctggccgcag catgtctggg ccctggagct caagcagtga	780
--	-----

ggtgaggaaa	gaggagggtgg	aggtggtgga	agaggaggag	gagagcgcga	gccaggccct	840
ggagccggat	gcagacccag	gactccgggg	cgagctctgc	gcactccgct	ctgaggactt	900
cctgcatttgc	gatcatccgg	tttattttatg	tgcaatgtgc	ctccctctct	ttgccccctt	960
ttgaggcatc	cgtccccac	caccccttc	aaaaaaagtgg	atatttgaag	aaaagcattc	1020
catatttaa	tatgaagagg	acactcccgc	gtggtaaggg	atcccgctgt	cgtttgttag	1080
attctctgtt	tgtgaatgtt	tcctcttggc	tgttagaca	ccagcgttgc	tccctccccca	1140

cctatccagc	ccttacaga	taaagacagc	tgataatagt	gtatttgtga	agtgtatctt	1200
taataacctgg	ccttggata	taaatattcc	tgggatttat	aaagtttat	ttcaaaggcag	1260
aaaacggggc	cgttaacatt	tccgttgggg	tcggtatcta	tgctgccgt	ttcatctgt	1320
tggttcccta	tttgaagatg	ttccaacag	ctcctgttt	tgtgcacttc	cgtcctctaa	1380
aactaagtgg	aatttaatta	atattgaagg	tgtaaacgtt	gtaagtaatc	aataaaccac	1440
tgtgtgtttt	tttttttt					1458

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 259

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Sus scrofa

&lt;400

&gt; 5

Met Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ser Ala Cys Ser Pro His Gly Val Gln

1 5 10 15

Ser Arg Arg Thr Ala Ala Ala Val Thr Gln Glu Pro Pro Arg Pro

20 25 30

Leu Arg Asn Ser Pro Pro Ser Pro Ser Arg Arg Leu Arg Gly Ala Arg

35 40 45

Glu Glu Ser Gly Thr Arg Tyr Ser Leu Leu Lys Ser His Ser Arg Thr

50 55 60

Lys Thr Thr Thr Lys Asn Phe Ile Lys Thr Ile Ser Ala Gln Glu

65 70 75 80

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

85 90 95

Pro Pro Asp Tyr Ser Met Ala Leu Ser Tyr Ser Pro Glu Tyr Ala Ser

100 105 110

Gly Ala Ala Ser Leu Asp His Ser His Tyr Gly Gly Val Pro Pro Gly

115	120	125	
Ala Gly Pro Pro Gly Leu Gly Gly Pro Arg Pro Val Lys Arg Arg Gly			
130	135	140	
Thr Ala Asn Arg Lys Glu Arg Arg Arg Thr Gln Ser Ile Asn Ser Ala			
145	150	155	160
Phe Ala Glu Leu Arg Glu Cys Ile Pro Asn Val Pro Ala Asp Thr Lys			
165	170	175	
Leu Ser Lys Ile Lys Thr Leu Arg Leu Ala Thr Ser Tyr Ile Ala Tyr			
180	185	190	
Leu Met Asp Leu Leu Ala Lys Asp Asp Gln Asn Gly Glu Ala Glu Ala			
195	200	205	
Phe Lys Ala Glu Ile Lys Lys Thr Asp Val Lys Glu Glu Lys Arg Lys			
210	215	220	
Lys Glu Leu Asn Glu Ile Leu Lys Ser Thr Val Ser Ser Asn Asp Lys			
225	230	235	240
Lys Thr Lys Gly Arg Thr Gly Trp Pro Gln His Val Trp Ala Leu Glu			
245	250	255	
Leu Lys Gln			
<210> 6			
<211> 176			
<212> PRT			
<213> Sus scrofa			
<400> 6			
Gly Trp Leu Gly Glu Ile Gly His Pro Glu Met Ser Pro Pro Asp			
1	5	10	15
Tyr Ser Met Ala Leu Ser Tyr Ser Pro Glu Tyr Ala Ser Gly Ala Ala			
20	25	30	
Ser Leu Asp His Ser His Tyr Gly Gly Val Pro Pro Gly Ala Gly Pro			
35	40	45	
Pro Gly Leu Gly Gly Pro Arg Pro Val Lys Arg Arg Gly Thr Ala Asn			
50	55	60	
Arg Lys Glu Arg Arg Arg Thr Gln Ser Ile Asn Ser Ala Phe Ala Glu			

65 70 75 80

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

85 90 95

Ile Lys Thr Leu Arg Leu Ala Thr Ser Tyr Ile Ala Tyr Leu Met Asp

100 105 110

Leu Leu Ala Lys Asp Asp Gln Asn Gly Glu Ala Glu Ala Phe Lys Ala

115 120 125

Glu Ile Lys Lys Thr Asp Val Lys Glu Glu Lys Arg Lys Glu Leu

130 135 140

Asn Glu Ile Leu Lys Ser Thr Val Ser Ser Asn Asp Lys Lys Thr Lys

145 150 155 160

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

165 170 175

<210> 7

<211> 2139

<212> DNA

<213> Sus scrofa

<400> 7

actagagttt	tcactcgac	ctccaggcg	ggtgtgcctcc	tccatcctcc	acccctcaa	60
ccctgcacc	gggtacagag	ctctttctg	gcaaggttct	ccccgagaga	gaagaggaag	120
ggagagcagg	acccagagcg	gtcacaggc	cctgggctca	ccatggccga	cggagacgag	180
ggctttggcc	tggcacac	acccctggaa	ccagattcaa	aggatctacc	ctgtgactca	240
aaacccgaga	gtggctagg	ggcccccagc	aagtccccgt	cgtcccgca	ggccgccttc	300

acccagcagg	gcatggaagg	gatcaaggtg	tttctccatg	aaagagaact	gtggctgaaa	360
tttcacgaag	tggcacaga	aatgatcata	accaaggctg	gcaggcgat	gtttcccgat	420
tacaaagtga	aggtgactgg	ccttaatccc	aaaaccaagt	acattctcct	tatggacatc	480
gttcctgccc	atgaccacag	atacaagttc	gccgataata	aatggctgt	gacaggcaaa	540
gcggagcctg	ccatgccgg	ccgcctctac	gtgcacccgg	actcgccggc	cactggagcg	600
cattggatgc	ggcagctcg	ctccttccag	aaactcaagc	tcaccaacaa	ccacctggac	660
cggttgggc	acattattct	aaattccatg	cacaataacc	agcccagatt	acacatcgtg	720

aaagcggacg	aaaataatgg	atggctca	aaaaatactg	cattctgtac	ccacgtcttt	780
------------	------------	----------	------------	------------	------------	-----

cctgagacag cgtttattgc agtgacttcc taccagaacc acaagatcac ccaattaaag	840		
atcgagaata atcccttgc caaaggattc cggggcagcg atgacatgga actgcacagg	900		
atgtcaagga tgcaaagtaa agaatatccc gtggttccca ggagcacagt gagacagaaa	960		
gtggcctcca accacagtcc cttagcagt gagcctcggt ctctccac ctcatccaac	1020		
ttgggtccc agtatcagtg tgagaatggt gtgtccggc cctccagga cctctgccc	1080		
ccacctaacc cgtacccact tccccaggag cacagccaaa ttaccattg caccaggagg	1140		
aaagatgaag aatgttccac cacagagcat ccctataaga agccctacat ggagacgtca	1200		
cccagtgaag aggaccctt ctaccgagcc ggctacccc agcagcaggg tctgggtgcc	1260		
tcctaccgga cagagtcagc ccagcggcag gcctgcatgt acgccagctc cgccaccgccc	1320		
agtgagccgg tgcccagct ggaggacatt agctgcaaca cgtggccag catgccttcc	1380		
tacagcagct gcacagtcac caccgtgeag cccatggaca ggctacccta ccagcacttc	1440		
tctgctcaact tcacctcggt gcccctggc cccggctgg ctggcatggc caaccacggc	1500		
tcccccgcgt tgaaaaaggaa aatgttccag caccagaccc ccgtggccca ccagcctgtg	1560		
gtcaggcagt gtgggcctca gactggcctc cagtcccccgg gcagccctca agcgtccgag	1620		
ttcctgtact ctcatggcgt gccaaggacc ctgtccccgc atcagtacca ctctgctgtg	1680		
cacgggtcg gcatgggtcc agagtggagt gacaacagct aaagcgaggc ctgctccttc	1740		
actgacgtt ccagagggag gggagagagg gagagagaca gtcgcagaga gaaccccaag	1800		
aacgagatgt cgcatccatcc tccatgttca cgtctgcact tgagaagccc accctggaca	1860		
ctgatgtaat cagtagcttggaa acccacaat tcaaaaaatg tgactttgtt ttgtctcaaa	1920		
actttaaaaaa tcgacaagag gcgtggatcc ccaacccccc ctacccggcc cccaccatcc	1980		
accaccacca cagtcatcaa ctggccacat tcacacgacc tccagatgcc ctccggatt	2040		
ccttcttttgc gtctccagaa agtcttgcct catggagtgt ttatccaa aacatagatg	2100		
gagtcattcc ctgtcttggt gttactgttgc acattgtta	2139		
<210> 8			
<211> 520			
<212> PRT			
<213> Sus scrofa			
<400> 8			
Met Ala Asp Gly Asp Glu Gly Phe Gly Leu Ala His Thr Pro Leu Glu			
1	5	10	15
Pro Asp Ser Lys Asp Leu Pro Cys Asp Ser Lys Pro Glu Ser Gly Leu			

20 25 30

Gly Ala Pro Ser Lys Ser Pro Ser Ser Pro Gln Ala Ala Phe Thr Gln

35 40 45

Gln Gly Met Glu Gly Ile Lys Val Phe Leu His Glu Arg Glu Leu Trp

50 55 60

Leu Lys Phe His Glu Val Gly Thr Glu Met Ile Ile Thr Lys Ala Gly

65 70 75 80

Arg Arg Met Phe Pro Ser Tyr Lys Val Lys Val Thr Gly Leu Asn Pro

85 90 95

Lys Thr Lys Tyr Ile Leu Leu Met Asp Ile Val Pro Ala Asp Asp His

100 105 110

Arg Tyr Lys Phe Ala Asp Asn Lys Trp Ser Val Thr Gly Lys Ala Glu

115 120 125

Pro Ala Met Pro Gly Arg Leu Tyr Val His Pro Asp Ser Pro Ala Thr

130 135 140

Gly Ala His Trp Met Arg Gln Leu Val Ser Phe Gln Lys Leu Lys Leu

145 150 155 160

Thr Asn Asn His Leu Asp Pro Phe Gly His Ile Ile Leu Asn Ser Met

165 170 175

His Lys Tyr Gln Pro Arg Leu His Ile Val Lys Ala Asp Glu Asn Asn

180 185 190

Gly Phe Gly Ser Lys Asn Thr Ala Phe Cys Thr His Val Phe Pro Glu

195 200 205

Thr Ala Phe Ile Ala Val Thr Ser Tyr Gln Asn His Lys Ile Thr Gln

210 215 220

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

225 230 235 240

Asp Met Glu Leu His Arg Met Ser Arg Met Gln Ser Lys Glu Tyr Pro

245 250 255

Val Val Pro Arg Ser Thr Val Arg Gln Lys Val Ala Ser Asn His Ser

260 265 270

Pro Phe Ser Ser Glu Pro Arg Ala Leu Ser Thr Ser Ser Asn Leu Gly  
 275 280 285  
 Ser Gln Tyr Gln Cys Glu Asn Gly Val Ser Gly Pro Ser Gln Asp Leu  
 290 295 300  
 Leu Pro Pro Pro Asn Pro Tyr Pro Leu Pro Gln Glu His Ser Gln Ile  
 305 310 315 320  
  
 Tyr His Cys Thr Lys Arg Lys Ala Asp Glu Glu Cys Ser Thr Thr Glu  
 325 330 335  
 His Pro Tyr Lys Lys Pro Tyr Met Glu Thr Ser Pro Ser Glu Glu Asp  
 340 345 350  
 Pro Phe Tyr Arg Ala Gly Tyr Pro Gln Gln Gln Gly Leu Gly Ala Ser  
 355 360 365  
 Tyr Arg Thr Glu Ser Ala Gln Arg Gln Ala Cys Met Tyr Ala Ser Ser  
 370 375 380  
 Ala Pro Pro Ser Glu Pro Val Pro Ser Leu Glu Asp Ile Ser Cys Asn  
  
 385 390 395 400  
 Thr Trp Pro Ser Met Pro Ser Tyr Ser Ser Cys Thr Val Thr Thr Val  
 405 410 415  
 Gln Pro Met Asp Arg Leu Pro Tyr Gln His Phe Ser Ala His Phe Thr  
 420 425 430  
 Ser Gly Pro Leu Val Pro Arg Leu Ala Gly Met Ala Asn His Gly Ser  
 435 440 445  
 Pro Gln Leu Gly Glu Gly Met Phe Gln His Gln Thr Ser Val Ala His  
 450 455 460  
  
 Gln Pro Val Val Arg Gln Cys Gly Pro Gln Thr Gly Leu Gln Ser Pro  
 465 470 475 480  
 Gly Ser Leu Gln Ala Ser Glu Phe Leu Tyr Ser His Gly Val Pro Arg  
 485 490 495  
 Thr Leu Ser Pro His Gln Tyr His Ser Ala Val His Gly Val Gly Met  
 500 505 510  
 Val Pro Glu Trp Ser Asp Asn Ser  
 515 520

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 519

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Sus scrofa

&lt;400&gt; 9

Met Ala Asp Gly Asp Glu Gly Phe Gly Leu Ala His Thr Pro Leu Glu

1 5 10 15

Pro Asp Ser Lys Asp Leu Pro Cys Asp Ser Lys Pro Glu Ser Gly Leu

20 25 30

Gly Ala Pro Ser Lys Ser Pro Ser Ser Pro Gln Ala Ala Phe Thr Gln

35 40 45

Gln Gly Met Glu Gly Ile Lys Val Phe Leu His Glu Arg Glu Leu Trp

50 55 60

Leu Lys Phe His Glu Val Gly Thr Glu Met Ile Ile Thr Lys Ala Gly

65 70 75 80

Arg Arg Met Phe Pro Ser Tyr Lys Val Lys Val Thr Gly Leu Asn Pro

85 90 95

Lys Thr Lys Tyr Ile Leu Leu Met Asp Ile Val Pro Ala Asp Asp His

100 105 110

Arg Tyr Lys Phe Ala Asp Asn Lys Trp Ser Val Thr Gly Lys Ala Glu

115 120 125

Pro Ala Met Pro Gly Arg Leu Tyr Val His Pro Asp Ser Pro Ala Thr

130 135 140

Gly Ala His Trp Met Arg Gln Leu Val Ser Phe Gln Lys Leu Lys Leu

145 150 155 160

Thr Asn Asn His Leu Asp Pro Phe Gly His Ile Ile Leu Asn Ser Met

165 170 175

His Lys Tyr Gln Pro Arg Leu His Ile Val Lys Ala Asp Glu Asn Asn

180 185 190

Gly Phe Gly Ser Lys Asn Thr Ala Phe Cys Thr His Val Phe Pro Glu

195 200 205

Thr Ala Phe Ile Ala Val Thr Ser Tyr Gln Asn His Lys Ile Thr Gln

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

450 455 460  
 Pro Val Val Arg Gln Cys Gly Pro Gln Thr Gly Leu Gln Ser Pro Gly  
 465 470 475 480  
 Ser Leu Gln Ala Ser Glu Phe Leu Tyr Ser His Gly Val Pro Arg Thr  
 485 490 495  
 Leu Ser Pro His Gln Tyr His Ser Ala Val His Gly Val Gly Met Val  
  
 500 505 510  
 Pro Glu Trp Ser Asp Asn Ser  
 515  
 <210> 10  
 <211> 324  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 10  
 Met Phe Pro Ser Pro Ala Leu Thr Pro Thr Pro Phe Ser Val Lys Asp  
 1 5 10 15  
 Ile Leu Asn Leu Glu Gln Gln Arg Ser Leu Ala Ala Ala Gly Glu  
 20 25 30  
 Leu Ser Ala Arg Leu Glu Ala Thr Leu Ala Pro Ser Ser Cys Met Leu  
 35 40 45  
  
 Ala Ala Phe Lys Pro Glu Ala Tyr Ala Gly Pro Glu Ala Ala Ala Pro  
 50 55 60  
 Gly Leu Pro Glu Leu Arg Ala Glu Leu Gly Arg Ala Pro Ser Pro Ala  
 65 70 75 80  
 Lys Cys Ala Ser Ala Phe Pro Ala Ala Pro Ala Phe Tyr Pro Arg Ala  
 85 90 95  
 Tyr Ser Asp Pro Asp Pro Ala Lys Asp Pro Arg Ala Glu Lys Lys Glu  
 100 105 110  
 Leu Cys Ala Leu Gln Lys Ala Val Glu Leu Glu Lys Thr Glu Ala Asp  
  
 115 120 125  
 Asn Ala Glu Arg Pro Arg Ala Arg Arg Arg Lys Pro Arg Val Leu  
 130 135 140

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

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

260 265 270  
 Ala Tyr Pro Ala Gly Pro Ser Pro Ala Gln Pro Ala Thr Ala Ala Ala  
 275 280 285  
 Asn Asn Asn Phe Val Asn Phe Gly Val Gly Asp Leu Asn Ala Val Gln  
 290 295 300  
 Ser Pro Gly Ile Pro Gln Ser Asn Ser Gly Val Ser Thr Leu His Gly  
 305 310 315 320  
 Ile Arg Ala Trp  
 <210> 11  
 <211> 1632  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 11

gacgggtgcg cggcgccg cggcaccat gcaggaaagc tgccagggc cgtggcagc 60

gccgcttct gccgccacc tggcgctgtg agactggcgc tgccaccatg ttccccagcc 120  
 ctgctctcac gcccacgccc ttctcagtca aagacatcct aaacctggaa cagcagcagc 180  
 gcagcctggc tgccgccgga gagctctctg cccgcctgga ggccaccctg ggcgcctcct 240

cctgcatgct ggcgccttc aagccagagg cctacgctgg gcccaggcg gctgcgcgg	300
gcctcccaaga gctgcgcga gagctggcc gcgcgccttc accggccaag tgtgcgtctg	360
ccttcccgc cgccccgccc ttctatccac gtgcctacag cgaccccgac ccagccaagg	420
accctagacg cgaaaagaaa gagctgtcg cgctgcagaa ggccgtggag ctggagaaga	480

cagaggcggca caacgcggag cggcccccggg cgcgacggcg gaggaaagccg cgctgtct	540
tctcgcaggc gcaggcttat gagctggagc ggcttcaa gcagcagcgg tacctgtcgg	600
cccccaacg cgaccagctg gccagcgtgc tgaaactcac gtccacgcag gtcaagatct	660
gttccagaa ccggcgctac aagtgcacgc ggccagggca ggaccagact ctggagctgg	720
tgggctgcc cccggcccg cggccgcctg cccgcaggat cgccgtgcca gtgcgtgtgc	780
gcgatggcaa gccatgccta ggggactcgg cgccctacgc gcctgcctac ggcgtggcc	840
tcaatcccta cggttataac gcctaccccg cctatccggg ttacggcgcc gccgcctgca	900

gccctggcta cagctgcact gccgcttacc cccggggcc ttccccagcg cagccggcca	960
ctgcccgc caacaacaac ttctgtact tcggcgtcgg ggacttgaat gcgggtcaga	1020
ccccggat tccgcagagc aactcggag tgcacgcgt gcatggtatac cgaccgttgt	1080
agggaaggga cccgcgtggc gcgaccctga ccgcattccac ctcaacagct ccctgactct	1140
cggggggaga aggggctccc aacatgaccc tgagtccctt ggatttgca ttactctg	1200
cggagaccta ggaactttt ctgtcccacg cgccgttgtt ctgcgcacg ggagagttt	1260
tggccgcgtat tatgcagcgt gcaatgagtg atccgcacgc ctgggtctt agctgtcccc	1320

ccagggagtgc cctccgagag tccatggca ccccggttg gaactgggac tgagctcggt	1380
cacgcaggc ctgagatctg gccgccttccatt ccgcgagcca gggccggcg cccggccctt	1440
tgctatctcg ccgtcgcccg cccacgcacc cacccgtatt tatgtttta cctattgt	1500
taagaaatga cgatcccattt cccattaaag agagtgcgtt gaaaaaaaaaaaaaaa	1560
aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaa	1620
aaaaaaaaaaa aa	1632

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 2351

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 12

agctgtacat ggagatcttg ctggaaaaat ccgttgctc ccctcacgtc gtccagccca	60
ggagaaccac cgccgtcacc ccggagcttc ctggccacc gcgcagagcc ctccgagagc	120

ccgagccgcg gtcttcgagc tccaggcgtt attcaggccc ccagatcctt gccccgaaag	180
gagaggatct gagaaaatgg atgcactgag acctctctga aaaccctccg agagagcgcg	240
agaggagcga ggacacgtta ctgcagctt aaatcacatt taaggaccaa aacaacaaca	300
accaaaaatt tcattaaaac aataagcgcc caagaacccca gatcgggctg gtggggggag	360
gggaagaggc gggaagggga gggtcgcacg gaggtagctt tgcaagtggc agtcgacccc	420
gcccgcgcgc ggcacagctg gaccggctcc tccaggcgcg gctcagactc gcccctggat	480
tccgggttag ctgcgggtgcc aggaccgcgg cccgggctt gattcccgag actccgcgtt	540
ccagcctcgc gggagccccc gcacccctgt atgagcacga gaggattctg cctccgcgc	600
gcagccccggg aagcaggagc cgaagcgcgg gccgtggagc aaggcgggaa ccggaggcgg	660
cggcggcggc ggccaggggc gcacgggtgcc aggaccagct cgccgcgcgc catggggagc	720
cggcggccgc agcgcgtctg aggccggccc ggctggccag ggggggggac ggggcccggg	780
ctgcagcagc cccctctgct gtcgcggc gggccgggc gcccggggc tgggggggtgg	840
gggggtgggg aggacgcgcga gcgcgtggc agggggccgg gccgaggcgc cggcggggct	900
gcgcgcacgc tggggcgcgt ggagggcgcg ggagggcgaa atgagtctgg tagtgtgttt	960
tccccaccac ccggtgtgc accacgaggg ctacccgttt gccgcgcgc cgcgcgcagc	1020
tgcgcgcgc gcgcgcagcc gtcgcagcca tgaggagaac ccctacttcc atggctggct	1080
catcgccac cccgagatgt cgcgcgcgcga ctacagcatg gccctgtctt acagccccga	1140
gtatgccagc ggccgcgcgc gcctggacca ctcccattac ggggggggtgc cgccggcgc	1200
cggggccccc ggcctggggg ggccgcgcgc ggtgaagcgc cgaggcaccc ccaaccgcaa	1260
ggagcggcgc aggactcaga gcatcaacag cgccttcgccc gaactgcgcg agtgcacccc	1320
caacgtaccc gcccacacca aactctccaa aatcaagacc ctgcgcctgg ccaccagcta	1380
catcgccctac ctcatggacc tgctggccaa ggacgaccag aatggcgagg cggaggcctt	1440
caaggcagag atcaagaaga ccgacgtgaa agaggagaag aggaagaagg agctgaacga	1500
aatcttgaaa agcacagtga gcagcaacga caagaaaacc aaaggccgga cgggcgtggcc	1560
gcagcacgtc tggccctgg agctcaagca gtgaggagga ggagaaggag gaggaggaga	1620
gcgcgagtgaa gcagggccca aggccgcaga tgcagaccca ggactccgga aaagccgtcc	1680
gcgcgtccgt ctgaggactc ttgcatttgaatcatccg gtttattttat gtcaatttc	1740
cttccccctct ctttgacccc ctttgaggca tctgcgtcccc gtctccccc ccaaaaaaaa	1800
atggatatt tgaagaaaag cattccatat tttaatacga agaggacact cccgtgttgtt	1860
aaggatccc gtcgtctcat agattctgt tgctgtatg ttcccttgc gctgtgtaga	1920
caccagcgtt gccccccgc aacctactca accccttcca gataaagaca gtgggcacta	1980

gtgcgttgtt gaagtgtatc ttaatactt ggccttgga tataaatatt cctgggtatt 2040  
 ataaagttt attcaaagc agaaaacagg gccgctaaca tttccgttgg ggtcggtatc 2100

tagtgctatc cattcatctg tggtcggtcc ctcttgaag atgttccaa cagccacttg 2160  
 ttttgtgcac ttccgtcctc taaaactaaa tggaatttaa ttaatattga aggtgtaaac 2220  
 gttgttaagta ttcaataaac cactgtgtt ttttttaca aaaaccttaa tcttttaatg 2280  
 gctgataacct caaaagagtt ttgaaaacaa agctgttata ctgtttcg taatattaa 2340  
 aatattcaga a 2351

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 217

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 13

Met Ser Leu Val Gly Gly Phe Pro His His Pro Val Val His His Glu

1	5	10	15
Gly Tyr Pro Phe Ala			
20	25	30	
Ser Arg Cys Ser His Glu Glu Asn Pro Tyr Phe His Gly Trp Leu Ile			
35	40	45	
Gly His Pro Glu Met Ser Pro Pro Asp Tyr Ser Met Ala Leu Ser Tyr			
50	55	60	
Ser Pro Glu Tyr Ala Ser Gly Ala Ala Gly Leu Asp His Ser His Tyr			
65	70	75	80

Gly Gly Val Pro Pro Gly Ala Gly Pro Pro Gly Leu Gly Gly Pro Arg			
85	90	95	
Pro Val Lys Arg Arg Gly Thr Ala Asn Arg Lys Glu Arg Arg Arg Thr			
100	105	110	
Gln Ser Ile Asn Ser Ala Phe Ala Glu Leu Arg Glu Cys Ile Pro Asn			
115	120	125	
Val Pro Ala Asp Thr Lys Leu Ser Lys Ile Lys Thr Leu Arg Leu Ala			
130	135	140	
Thr Ser Tyr Ile Ala Tyr Leu Met Asp Leu Leu Ala Lys Asp Asp Gln			

145	150	155	160
Asn Gly Ala Glu Ala Phe Lys Ala Glu Ile Lys Lys Thr Asp Val			
165	170	175	
Lys Glu Glu Lys Arg Lys Glu Leu Asn Glu Ile Leu Lys Ser Thr			
180	185	190	
Val Ser Ser Asn Asp Lys Lys Thr Lys Gly Arg Thr Gly Trp Pro Gln			
195	200	205	
His Val Trp Ala Leu Glu Leu Lys Gln			
210	215		

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 3748

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 14

ttcagagaga gagagagagg gagagagagt gagagagact gactcttacc tcgaatccgg	60
gaacttaat cctgaaagct gcgctcagaa aggacttcga ccattcaactg ggcttccaac	120
ttccctccc tgggggtgta aaggaggagc ggggcactga gattatatgg ttgccgggtc	180
tcttggaggc tatttgtgt tcttggcgc ttgccaactg ggaagtattt agggagagca	240
agcgcacagc agaggaggtg tgtgttggag gtggcagtc gccgcggagg ctccagcggt	300
aggtgcgcccc tagtaggcag cagtagccgc tattctgggt aagcagtaaa cccgcataaa	360
accccgaggc caccatgcct gctcccccgc ctcaccgcgc gttccctgc taggagcagc	420
agaggatgtg gtgaatgcac cggcttcacc gaacgagagc agaaccttgc gcgggcacag	480
ggccctggc gcaccatggc cgacgcagac gaggcatttgc gcctggcgca cacgccttg	540
gagcctgacg caaaagacct gccctgcgt tcgaaacccg agagcgcgt cggggcccc	600
agcaagtccc cgtcgcccc gcaggccgcc ttcacccagc agggcatgga gggaatcaaa	660
gtgttctcc atgaaagaga actgtggcta aaattccacg aagtggcac gggaatgatc	720
ataaccaagg ctggaaggcg gatgtttccc agttacaaag tgaagggtgac gggccttaat	780
cccaaaacga agtacattct tctcatggac attgtacctg ccgacgatca cagataaaaa	840
ttcgcagata ataaatggtc tgtgacgggc aaagctgagc ccgcctatgcc tggccgcctg	900
tacgtgcacc cagactcccc cgccaccggg ggcgcattgga tgaggcagct cgtctccccc	960
cagaaactca agtccaccaa caaccacctg gacccatttg ggcattttat tctaaattcc	1020
atgcacaaat accagcctag attacacatc gtgaaagcgg atgaaaataa tggatttggc	1080

tcaaaaata cagcgttctg cactcacgtc tttcctgaga ctgcgtttat agcagtgact	1140
tcctaccaga accacaagat cagcgaatta aagattgaga ataatccctt tgccaaagga	1200
tttcgggca gtgtgacat ggagctgcac agaatgtcaa gaatgcaaag taaagaatat	1260
cccggttcc ccaggagcac cgtgaggcaaa aagtggcct ccaaccacag tccttcagc	1320
agcgagtctc gagctctc cacctcatcc aatttgggtt ccaatacca gtgtgagaat	1380
ggtgtttcg gcccctcca ggacctcctg cctccacca acccataccc actgccccag	1440
gagcatagcc aaatttacca ttgtaccaag aggaaagagg aagaatgttc caccacagac	1500
catccctata agaagcccta catggagaca tcacccagt aagaagattt ctttaccgc	1560
tctagctatc cacagcagca gggcctgggt gcctctaca ggacagagtc ggcacagcgg	1620
caagcttgc tttatgccag ctctgcgccccc cccagcgagc ctgtgcccag cctagaggac	1680
atcagctgca acacgtggcc aagcatgcct tcctacagca gctgcaccgt caccaccgt	1740
cagcccatgg acaggctacc ctaccagcac ttctccgcctc acttcacccctc gggggccctg	1800
gtccctcgcc tggctggcat ggccaaccat ggctccccac agctgggaga gggaaatgttc	1860
cagcaccaga cctcgtggc ccaccagct gtggcagggc agtgtggcc tcagactggc	1920
ctgcagtccc ctggcacccct tcagccccct gagttctct actctcatgg cgtgccaagg	1980
actctatccc ctcacatcgta ccactctgtg cacggagtgc gcatggtgcc agagtggagc	2040
gacaatacgat aaagtggggc ctgcttcaca acagacattt cctagagaaaa gagagagaga	2100
gaggagaaaa agagagaagg agagagacag tagccaagag aaccccacag acaagatttt	2160
tcatatcacc caatgttacat atctgcactc aagggtcgctg gatgctgate taatcagtag	2220
cttggaaacca caatttaaa aatgtgactt tcttgggggg tctcaaaaact taaaaaaaca	2280
aacacaaaaa gatgagtccc accccccact accaccacac ccatcaacca gccacattca	2340
cgctactccc cagatctttt ccccatcc ttctttggg ctctagaaag tcttgctca	2400
ttggatgtttt ttcccttagtg cgtagttggc gtctgtccct gtcttggtt taatgttgac	2460
attgttatataataatgat aatataatttttttttttaaaatggggacccaggat	2520
cccttatttggggggggggc tgaggcaagt atatttcaaa atatgtactt gggggattcc	2580
cttcaagtaa accatccctg aaacctaaat tcacgtttcc ctttgactaa gaaaagcacc	2640
tacctctgcc atgtgatgtt tctgaaaagc ctctgtatgt ccccatggc tttgggggg	2700
tcctgccttc tccaatatac cgtgctcagt ttgcctcta cttaccatg gagtcaggat	2760
aacactgacg ctccctggca tcctatctta ctcagcccta ccatcttgcc agctctgtct	2820

ttccagctgt ctgtcgctaa aacgtggcct atagctccc ttccggaaag cttgcttga 2880

aaaacttaaa aagccccgt ttacatgttag gcaggactgt gataacagtg caagcttgt 2940  
 gttgacaaga gttgtggaca aaaagccaaa ataaatattc ttctgatta aaaaaattt 3000  
 tttgaaaaa aacaaggcca gcccaacct tccaaacctc catcaccaac aacccaaact 3060  
 ggatgtcaag caaaatgcac aattcctaca gaagaggcaa gacacagtca ccaatgat 3120  
 ctgcggaaag aaaccacgcc cacaccaatg ccgacacaaa actgtgtta ctgaaagccg 3180  
 aaaacagtat taaaaaaagt gtgttaagtaa agtgttatgg tagggttctt cagatgtat 3240  
 attttactgg tactatttata ttataaatag gaattctaata taagtaataa catgaaatga 3300

aaccaggcat aggagctggc caagagctt taatttatt gatactaaa accaagtgg 3360  
 tgtttttg ttttttttg ttttttctt ctgtcgatg tgcttgctt ttttgatta 3420  
 aaaagaattt tttttcctt ttttataaac agaccctaata aaagagaaca gggtaagatg 3480  
 tgaggcttag tggttaag tacgtgagag agtgtgagtg tggttgaag tgagtgtccc 3540  
 tatgcgatta tgctctta cgttgctaag gggggaggg gaggattaag tactcgtgcc 3600  
 ttatatttg gtgccaatta atgcctaata aataccatgt gcttaaacaa gtaaaaaaaaaa 3660  
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 3720

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaa 3748

<210> 15

<211> 518

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15

Met Ala Asp Ala Asp Glu Gly Phe Gly Leu Ala His Thr Pro Leu Glu

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

Pro Asp Ala Lys Asp Leu Pro Cys Asp Ser Lys Pro Glu Ser Ala Leu

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

Gly Ala Pro Ser Lys Ser Pro Ser Ser Pro Gln Ala Ala Phe Thr Gln

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

Gln Gly Met Glu Gly Ile Lys Val Phe Leu His Glu Arg Glu Leu Trp

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

Leu Lys Phe His Glu Val Gly Thr Glu Met Ile Ile Thr Lys Ala Gly

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

Arg Arg Met Phe Pro Ser Tyr Lys Val Lys Val Thr Gly Leu Asn Pro

85 90 95

Lys Thr Lys Tyr Ile Leu Leu Met Asp Ile Val Pro Ala Asp Asp His

100 105 110

Arg Tyr Lys Phe Ala Asp Asn Lys Trp Ser Val Thr Gly Lys Ala Glu

115 120 125

Pro Ala Met Pro Gly Arg Leu Tyr Val His Pro Asp Ser Pro Ala Thr

130 135 140

Gly Ala His Trp Met Arg Gln Leu Val Ser Phe Gln Lys Leu Lys Leu

145 150 155 160

Thr Asn Asn His Leu Asp Pro Phe Gly His Ile Ile Leu Asn Ser Met

165 170 175

His Lys Tyr Gln Pro Arg Leu His Ile Val Lys Ala Asp Glu Asn Asn

180 185 190

Gly Phe Gly Ser Lys Asn Thr Ala Phe Cys Thr His Val Phe Pro Glu

195 200 205

Thr Ala Phe Ile Ala Val Thr Ser Tyr Gln Asn His Lys Ile Thr Gln

210 215 220

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

225 230 235 240

Asp Met Glu Leu His Arg Met Ser Arg Met Gln Ser Lys Glu Tyr Pro

245 250 255

Val Val Pro Arg Ser Thr Val Arg Gln Lys Val Ala Ser Asn His Ser

260 265 270

Pro Phe Ser Ser Glu Ser Arg Ala Leu Ser Thr Ser Ser Asn Leu Gly

275 280 285

Ser Gln Tyr Gln Cys Glu Asn Gly Val Ser Gly Pro Ser Gln Asp Leu

290 295 300

Leu Pro Pro Pro Asn Pro Tyr Pro Leu Pro Gln Glu His Ser Gln Ile

305 310 315 320

Tyr His Cys Thr Lys Arg Lys Glu Glu Cys Ser Thr Thr Asp His

325 330 335

Pro Tyr Lys Lys Pro Tyr Met Glu Thr Ser Pro Ser Glu Glu Asp Ser

340 345 350

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

355 360 365

Arg Thr Glu Ser Ala Gln Arg Gln Ala Cys Met Tyr Ala Ser Ser Ala

370 375 380

Pro Pro Ser Glu Pro Val Pro Ser Leu Glu Asp Ile Ser Cys Asn Thr

385 390 395 400

Trp Pro Ser Met Pro Ser Tyr Ser Ser Cys Thr Val Thr Thr Val Gln

405 410 415

Pro Met Asp Arg Leu Pro Tyr Gln His Phe Ser Ala His Phe Thr Ser

420 425 430

Gly Pro Leu Val Pro Arg Leu Ala Gly Met Ala Asn His Gly Ser Pro

435 440 445

Gln Leu Gly Glu Gly Met Phe Gln His Gln Thr Ser Val Ala His Gln

450 455 460

Pro Val Val Arg Gln Cys Gly Pro Gln Thr Gly Leu Gln Ser Pro Gly

465 470 475 480

Thr Leu Gln Pro Pro Glu Phe Leu Tyr Ser His Gly Val Pro Arg Thr

485 490 495

Leu Ser Pro His Gln Tyr His Ser Val His Gly Val Gly Met Val Pro

500 505 510

Glu Trp Ser Asp Asn Ser

515