



(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
리젠츠 오브 더 유니버시티 오브 미네소타
미국 55455 미네소타주 미니애폴리스 스위트 600
오크 스트리트 에스이 200 맥나마라 알럼니 센터
(72) 발명자
게리, 다니엘 제이.
미국 55122 미네소타주 이건 리버튼 포인트 1660
게리, 마리 지.
미국 55122 미네소타주 이건 리버튼 포인트 1660
교야노-나카가와, 나오키
미국 55126 미네소타주 쇼어뷰 힐러 레인 980
(74) 대리인
양영준, 김영

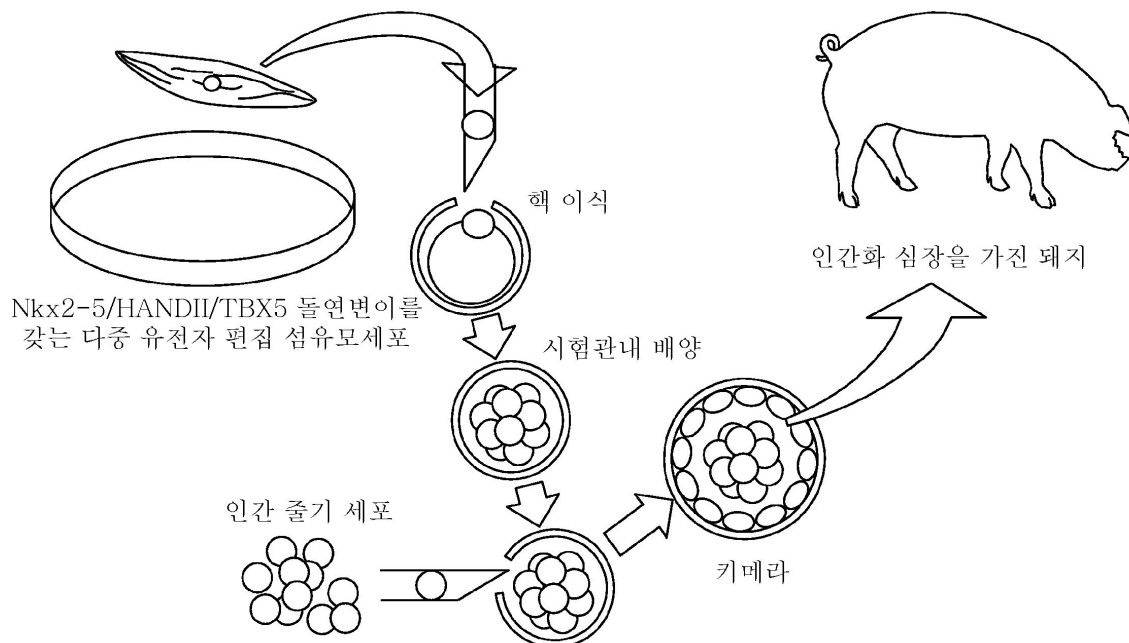
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 인간화 심장 근육

(57) 요약

본원에서는 a) NKX2-5, HAND1, TBX5 또는 그의 조합 널 비-인간 동물 세포를 생성하는 단계로서, 여기서 비-인간 NKX2-5, HAND1, TBX5 유전자 또는 그의 조합의 양쪽 카피는 상기 비-인간 동물에서 기능적 NKX2-5, HAND1, TBX5 단백질 또는 그의 조합의 생산을 방지하는 돌연변이를 보유하는 것인 단계; b) a)의 상기 NKX2-5, HAND1, (뒷면에 계속)

대표도



TBX5 또는 그의 조합 널 비-인간 동물 세포로부터의 핵을 제핵 비-인간 난모세포 내로 융합시키는 것 및 상기 난모세포를 활성화시켜 NKX2-5, HAND1, TBX5 또는 그의 조합 널 비-인간 배반포를 형성하도록 분열시키는 것을 포함하는 체세포 핵 이식에 의해 NKX2-5, HAND1, TBX5 또는 그의 조합 널 비-인간 배반포를 창출하는 단계; c) 인간 줄기 세포를 b)의 NKX2-5, HAND1, TBX5 또는 조합 널 비-인간 배반포 내로 도입시키는 단계; 및 d) c)로부터의 상기 배반포를 가임인 대리모 비-인간 동물 내로 이식시켜 인간 NKX2-5, HAND1, TBX5 또는 그의 조합을 발현하는 키메라 비-인간 동물을 생성하는 단계를 포함하는, 인간 NKX2-5, HAND1, 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

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

청구항 2

제1항에 있어서, 돌연변이가 NKX2-5 유전자, HANDI 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, HANDI, TBX5 또는 그의 조합을 발현하며 비-인간 동물 NKX2-5, HANDI, 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, HANDI, TBX5 또는 그의 조합을 발현하며 내인성 돼지 NKX2-5, HANDI, 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, HANDI, TBX5 또는 그의 조합 널(null) 비-인간 동물 세포를 생성하는 단계로서, 여기서 비-인간 NKX2-5 유전자, HANDI 유전자, TBX5 유전자 또는 그의 조합 유전자의 양쪽 카피는 기능적 NKX2-5 단백질, HANDI 단백질, TBX5 단백질 또는 그의 조합의 생산을 방지하는 돌연변이를 보유하는 것인 단계;

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

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

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

를 포함하는, 인간 NKX2-5 유전자, HANDI 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

우선권 주장

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

[0001]

[0002]

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

배경 기술

[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 치료법은 심장 이식이지만, 이식을 위한 기관 부족으로 인해 비교적 적은 환자가 상기 구멍 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/HAND1/TBX5 녹아웃 돼지 또는 다른 동물, 예컨대 암소 또는 염소의 개발을 기술한다.

[0005] 유전자 편집 기술 사용으로 NKX2-5/HAND1/TBX5 널(null) 돼지 배아가 생성되어 왔고, 본 발명자들은 인간 줄기 세포를 사용하여 인간-동물 키메라를 생산하여 왔다. NKX2-5/HAND1/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, 게놈이 NKX2-5 유전자, HAND1 유전자, TBX5 유전자 또는 그의 조합의 양쪽 대립유전자에 돌연변이를 보유하여 비-인간 동물 세포, 상실배 또는 배반포에는 기능적 NKX2-5 단백질, HAND1 단백질, TBX5 단백질 또는 그의 조합이 결여된 것인 비-인간 동물 세포, 상실배 또는 배반포를 제공한다. 한 실시양태에서, 돌연변이는 NKX2-5 유전자, HAND1 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, HAND1, TBX5 또는 그의 조합을 발현하며 비-인간 동물 NKX2-5, HAND1, 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, HAND1, TBX5 또는 그의 조합을 발현하며 내인성 돼지 NKX2-5, HAND1, 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, HAND1, TBX5 또는 그의 조합 널 비-인간 동물 세포를 생성하는 단계로서, 여기서 비-인간 NKX2-5 유전자, HAND1 유전자, TBX5 유전자 또는 그의 조합 유전자의 양쪽 카피는 기능적 NKX2-5 단백질, HAND1 단백질, TBX5 단백질 또는 그의 조합의 생산을 방지하는 돌연변이를 보유하는 것인 단계; b) a)의 상기 NKX2-5, HAND1, TBX5 또는 그의 조합 널 비-인간 세포로부터의 핵을 제핵 비-인간 난모세포 내로 융합시키는 것 및 상기 난모세포를 활성화시켜 NKX2-5, HAND1, TBX5 또는 그의 조합 널 비-인간 상실배 또는 배반포를 형성하도록 분열시키는 것을 포함하는 체세포 핵 이식에 의해 NKX2-5, HAND1, TBX5 또는 그의 조합 널 비-인간 상실배 또는 배반포를 창출하는 단계; c) 인간 줄기 세포를 b)의 비-인간 NKX2-5, HAND1, TBX5 또는 그의 조합 널 상실배 또는 배반포 내로 도입시키는 단계; 및 d) c)로부터의 상기 상실배 또는 배반포를 가임인 대리모 비-인간 동물 내로 이식시켜 인간 NKX2-5, HAND1, TBX5 또는 그의 조합을 발현하는 키메라 비-인간 동물을 생성하는 단계를 포함하는, 인간 NKX2-5 유전자, HAND1 유전자, TBX5 유전자 또는 그의 조합을 발현하는 키메라 비-인간 동물을 생산하는 방법을 제공한다.

[0010] 또 다른 실시양태는 a) NKX2-5, HAND1, 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, HAND1, TBX5 또는 그의 조합 널 돼지 세포로부터의 핵을 제핵 돼지 난모세포 내로 융합시키는 것 및 상기 난모세포를 활성화시켜 NKX2-5, HAND1, TBX5 또는 그의 조합 널 돼지 상실배 또는 배반포를 형성하도록 분열시키는 것을 포함하는 체세포 핵 이식에 의해 NKX2-5, HAND1, TBX5 또는 그의 조합 널 돼지 상실배 또는 배반포를 창출하는 단계; c) 돼지 줄기 세포를 b)의 돼지 NKX2-5, HAND1, 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 체대혈 줄기 세포(UCBSC)이다. 또 다른 실시양태에서, 유도된 만능성 세포는 섬유모세포 세포로부터 형성된다.

[0013] 한 실시양태는, 게놈이 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 체대혈 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 넘 아웃시키거나, 또는 약화시키도록 상기 동물의 게놈을 편집하고, 배반포기 또는 접합기에 상기 동물에 공여

자 줄기 세포를 집중하여 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), 루핑된 심장 (E9.5) 및 4개 챔버로 된 심장 (E10.5)의 형성.

도 2는 Nkx2-5 및 (dHand로도 또한 공지된) HandII 이중 녹아웃에는 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 녹아웃을 도시한 것이다. a) 각 유전자에 대한 코딩 서열의 개략도를 제시한 것으로; 색 교차부는 엑손 경계부를 나타내고, (하기) 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 돌연변이를 분석하였다.

도 4는 Nkx2-5/HANDII/TBX5 삼중 녹아웃 돼지 배아가 무심장증을 갖는다는 것을 도시한 것이다. 삼중 녹아웃 돼지 배아에는 심장이 결여되고, 본질적으로 E18.0에서 (심장을 표시하는) Gata4 면역조직화화학적으로 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 한배새끼에서 CPC로 유도된다. (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, Mlc-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 녹아웃을 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 녹아웃 배아 (b). 삽도는 요막의 확대도를 보여주는 것이다. 돌연변이체에서의 혈관 열기 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 μm (a, b), 200 μm (a, b 중 삽도), 100 μm (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 μM EdU로 표지하고, 주사하였다. 배반포를 분열 세포를 표지하기 위해 1시간 동안 10 μM 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 의학에 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 그러한 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 초과, 즉, 적어도 하나의 대상을 지칭한다. 예로서, "한 요소"란, 하나의 요소 또는 하나 초과의 요소를 의미한다.
- [0027] "및/또는"이라는 용어는 상기 용어와 연관된 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, 패널 고리 상의 하나 이상의 치환기란, 1 내지 5개, 또는 패널 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 초과, 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 다 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 중점을 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 제한한다는 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 피그, 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 증배엽 전구체)이다. 한 실시양태에서, 줄기, 선조 또는 전구체 세포는 포유동물 세포이다. 한 실시양태에서, 줄기 세포로는 유도된 만능성 줄기 세포, 체대혈 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 수입된다. "내피 세포"라는 어구는 최종적으로 분화된 세포 유형 뿐만 아니라, 최종적으로 분화된 것이 아닌, 내피 계통으로 수입된 세포도 포함한다.
- [0043] "분화 인자"란, 세포 인자, 바람직하게, 계통 수입을 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 서브유닛 서열 유사성을 지칭한다. 2개 분자 중 둘 다에서 서브유닛 위치가 동일한 단량체 서브유닛으로 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 서브유닛으로 이루어진 중합체 중의 5개의 위치)이 상동성을 띠다면, 이때 2개 서열은 50% 상동성이고, 위치의 90%, 예컨대 10개 중 9개가 매칭되거나, 상동성을 띠다면, 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: 겹 패널티 = 5; 겹 연장 패널티 = 2; 미스매치 패널티 = 3; 매치 보상 = 1; 기대 값 10.0; 및 워드 크기 = 11을 사용하여 (NCBI 웹사이트에서 "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 겹이 있는 정렬을 수득하기 위해 문헌 [Altschul et al. (1997, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402)]에 기술된 바와 같이 겹드 BLAST(Gapped BLAST)가 사용될 수 있다. 대안적으로, PSI-Blast 또는 PHI-Blast는 분자 사이의 먼 관계 (상기 문헌 동일) 및 공통 패턴을 공유하는 분자 사이의 관계를 검출하는

반복 검색을 수행하는데 사용될 수 있다. BLAST, 갭드 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 동일성은 갭을 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 염기 (아데닌, 구아닌, 티민, 시토신, 및 우라실) 이외의 다른 염기로 구성된 핵산을 포함한다. 본원에서는 폴리뉴클레오타이드 서열을 기술하는데 관용적 표기법이 사용된다: 단일 가닥 폴리뉴클레오타이드 서열의 좌측 단부가 5'-단부이고; 이중 가닥 폴리뉴클레오타이드 서열의 좌측 방향은 5'-방향으로 지칭된다. 5'에서 3'으로의, 초기 RNA 전사체에서의 뉴클레오타이드 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 게놈 또는 합성 방법에 의해 획득되는지 여부와 상관 없이, 원하는 특정 유전자 또는 유전자 단편을 코딩하는 DNA 및 RNA 서열을 포함한다.

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

[0061] "올리고뉴클레오타이드"라는 용어는 전형적으로 짧은 폴리뉴클레오타이드, 일반적으로는 약 50개 이하의 뉴클레오타이드를 지칭한다. 뉴클레오타이드 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 게놈 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 게놈에 접근하게 된다. 이중 가닥 파

단 (DSB)을 유도하고, 임의적으로, 세포가 수복 기전을 이용하여 반응하게 되는 그 반응 대상인 카르고/미리 선택된 유전자를 삽입함으로써 게놈을 편집하는데 TALEN이 사용될 수 있다. 이러한 방식으로, 예를 들어, 질환을 유발하는 게놈 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), 리콤 비나제 융합 분자, 합성 돼지 인공 염색체, 메가뉴클레아제, 아연 핑거 또는 (예컨대, 원하는 표적 유전자를 넘 아웃시키기 위한) 유전자 편집을 위한 rAAV 기반 시스템의 사용에 의해 수행될 수 있다. 추가로, 넘아웃 목적으로, 유전자 (예컨대, 간접 RNA (shRNA, siRNA, dsRNA, RISC, miRNA)의 불활성화를 위해 또는 유전자를 발현 시키기 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 '탈프로그래밍된' 상태가 되게 남겨 둔다. 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 재프로그래밍된다. 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, 다화에 걸친 유사 분열 후, 상기 단일 세포는 원래의 유기체 (즉, 클론)와 동일한 게놈을 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 넘아웃 (약어: KO)은 유기체의 대립유전자 둘 다를 작동불가능하게 만드는 (유기체를 "넘 아웃시키는") 유전적 기술이다. 이는 또한 넘아웃 유기체 또는 간단하게 넘아웃으로도 알려져 있다. 상기 용어는 또한 유전자를 "넘 아웃시키는 것"에서와 같이 상기와 같은 유기체를 창출하는 프로세스를 지칭한다. 본 기술은 본질적으로 유전자 넘아웃과 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. 증폭된 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 세포로부터

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 항체쇄의 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 펩티드와 실질적으로 동일한 구조 및 기능을 갖는 펩티드를 코딩하며; 예컨대, 다만 상기 펩티드 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 펩티드를 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. 뉴클레오타이드 서열이 참조 뉴클레오타이드 서열과 실질적으로 유사한지 여부를 결정하는데 적합한 핵산 하이브리드화 조건은 하기와 같다: 50℃에서 7% 소듐 도데실 술페이트 SDS, 0.5 M NaPO₄, 1 mM EDTA, 50℃에서 2X 표준 염수 시트레이트 (SSC), 0.1% SDS 중에서 세척; 바람직하게, 50℃에서 7% (SDS), 0.5 M NaPO₄, 1 mM EDTA, 50℃에서 1X SSC, 0.1% SDS 중에서 세척; 바람직하게, 50℃에서 7% SDS, 0.5 M NaPO₄, 1 mM EDTA, 50℃에서 0.5X SSC, 0.1% SDS 중에서 세척; 및 더욱 바람직하게, 50℃에서 7% SDS, 0.5 M NaPO₄, 1 mM EDTA, 65℃에서 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] "백터"는 단리된 핵산을 포함하고, 단리된 핵산을 세포 내부로 전달하는데 사용될 수 있는 물질의 조성물이다. 선형 폴리뉴클레오타이드, 이온성 또는 양쪽성 화합물과 회합되어 있는 폴리뉴클레오타이드, 플라스미드, 및 바이러스를 포함하나, 이에 제한되지 않는, 다수의 백터가 관련 기술분야에 공지되어 있다. 따라서, "백터"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 백터의 예로는 아데노바이러스 백터, 아데노-연관 바이러스 백터, 레트로바이러스 백터, 재조합 바이러스 백터 등을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 비-바이러스 백터의 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 현행의 임상 실무 패러다임을 전환 시키게 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 주사받은 배반포를 마우스 대리모 내로 이식하면 래트 세포로 구성된 기능적 췌장을 갖는 마우스 키메라가 생성된다. 상기 돌연변이체 숙주는 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 현행의 임상 실무 패러다임을 전환 시키게 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 넥아웃 (KO) 돼지의 기관 생산을 위한 생성된 인간-돼지 키메라로의 생성**
- [0091] 부위 특이적 뉴클레아제의 사용으로 큰 동물 계통에서의 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 불활성화시키는 TALEN 기반 플랫폼을 사용함으로써 가축에서 각각 50% 및 20% 비율의 고도로 효율적인 이형접합성 및 이중-대립유전자성 넥아웃 (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 넥아웃 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 낙아우 섬유모세포 클론을 사용하여 ETV2 널 배아를 생성하였고, 이는 대리모 암태지 내로 이식되었다. 클로닝 효율은 29%였으며, 평균 성공률이 20%인 것보다 더 높았다. 배아를 수확하였고, E18.0에서 분석하였다 (도 8). 상기 단계에서, Wt 배아는 요막에 잘 발생된 혈관 열기를 가지며 혈관화되었다 (도 8a, c). 그에 반해, ETV2 KO에서의 성장은 유의적으로 지연되었고 (도 7b), 이들 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 초과 의 세포 유형에서 인간화될 수 있는 키메라 기관의 성장을 지원할 수 있다는 것을 입증한다.

[0094] Nkx2-5, HandII 및 Tbx5

[0095] Nkx2-5, HandII 및 Tbx5를 돌연변이시켜 심장 근육 계통 결손 돼지 배아 (Nkx2-5/HandII/Tbx5 널 돼지 배아)를 생성하였다. Nkx2-5/HandII/Tbx5에 대한 다중의 유전자 편집을 수행함으로써 만능성 능력을 갖는 인간 세포를 사용하여 심장 세포로 재증식되는 허용 niches를 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 시리즈 번호 62/247,092; 62/247096; 및 62/247,122가 본원에서 참조로 포함된다.

[0097] 하기 실시예는 본 발명의 특성의 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		
	지명적 단계	심장의 형태학적 특징	하향-조절된 전사 인자
Nkx2-5	E9.5	심장 판은 형성되나, 심장은 고리형성되지 않음. 심방 및 심실의 경계 없음.	Hand1, Meis2C
Tbx5	E10.5	좌심실 및 동방 구조 (원시 심방 및 유입로)의 형성저하증. 심장은 고리형성되지 않음.	Nkx2-5, Gata4
Hand2	E10.5	우심실 형성저하증 및 대동맥궁 결함.	Gata4
Nkx2-5+Hand2	E8.5-9.5	완전한 심실 이발생증 동반한 단일의 심장 챔버.	Hand1

[0101]

[0102] Nkx2-5는 초파리(*Drosophila*) 호메오도메인 단백질인 틴맨(Tinman) (Csx)의 척추동물 동족체이다. 틴맨 돌연변이 결과 상기 파리에서는 심장 형성이 이루어지지 않게 된다 (35). Nkx2-5는 심장 계통에서 발현되는 가장 초기의 전사 인자 중 하나이다. Nkx2-5의 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 Tbx5이고, 심장 유전자 발현을 전사활성화시킨다 (36). 마우스에서의 Tbx5의 전체적인 결실은 심장 형태 발생을 동요시키고 (중증 심방 및 심실 형성저하증), E10.5까지 배아 치명성을 띠게 된다 (25). 심지어 반수체기능부전 마우스 (Tbx5^{+/-})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, 종종 우심실 형성저하증 및 대동맥궁 결함을 갖는다 (23). 추가로, Nkx2-5 및 HandII 둘 다 결합된 마우스는 심실 무발생을 보이며, 오직 단일의 심방 챔버만을 갖는다 (도 2) (26).

[0103] 돼지 NKX2-5, HANDII 및 TBX5 유전자의 다중 녹아웃

[0104] 심장 선조 세포에서의 Nkx2-5 전사 조절 캐스케이드를 정의하기 위해, 조작된 녹아웃 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 매핑시켜 Nkx2-5 널 CPC에서의 EYFP 발현을 유도하였다. FACS를 사용하여 단계 (연령)가 매칭되는 개별 배아로부터의 Wt 및 Nkx2-5 널 CPC를 분리시키고, RNA를 분리시키고, 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 역제에서의 Nkx2-5의 역할을 밝혀냈다 (도 5f). 본 연구에서는 또한 Nkx2-5, HandII 및 Tbx5를 유도한 초기 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 녹아웃 (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 녹아웃을 조작하였다). 다중의 이중-대립유전자성 유전자 편집을 위한 상기 기술을 확인하기 위해 TALEN 쌍을 사용하였고, 이들 각각을 통해 20% 초과 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 펩티드를 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 암태지 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 세포괴 (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, 아포토시스 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 배반포강 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 필싱하였다. 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, 자궁 내로의 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/HAND1/TBX5 돌연변이체 돼지 배아를 구제할 것이다. hiPSC는 NKX2-5/HAND1/TBX5 돌연변이체 조산 배아에서 모든 심장 세포에 대한 선조가 될 것이다.

[0116] TALEN 매개 기술을 사용하여 (27, 28), 생존가능하고, 내피 계통이 결여된 ETV2 돌연변이체 돼지 배아를 생성하였다. TALEN 매개 기술을 사용하여 NKX2-5/HAND1/TBX5 돌연변이체 섬유모세포를 생성함으로써, 및 데이터를 통해 상기 돌연변이체 돼지 배아에는 심장이 결여된다는 것을 입증한다. 데이터는 인간 줄기 세포 (인간 체내 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 타결터 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 머신(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℃에서 5% CO2하에 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))를 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 μ L 팁에서 전기천공시켰다: 입력 전압: 1800V; 펄스 폭: 20 ms; 펄스 수: 1. 관심의 특이적인 유전자(들)를 위한 0.1-4 μ g의 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 플레이트하였다.

[0123] **희석 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 웰 디쉬 및 복제 96 웰 디쉬의 웰로 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 웰 디쉬의 웰로부터 수집하고, 10-30%를 50 μ L의 1X PCR 화합성 용해 완충제: 200 μ 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 15분 동안인 프로그램을 사용하여 열 순환기에서 용해물을 프로세싱하였다.

[0127] **유전자-편집 분석**

[0128] 1 μ L의 세포 용해물과 함께 아큐스타트(AccuStart)TM Taq DNA 폴리머라제 하이파이 (퀀타 바이오사이언시스(Quanta Biosciences))를 사용하여 제조사의 권고사항에 따라 의도 부위에 플랭킹된 PCR을 수행하였다. 상기 기술된 바와 같은 PCR 생성물 10 μ 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 폴리악릴아미드 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 오르토크로, 15개의 파라로그를 가지며, 이는 1개의 양상불 단백질 패밀리의 구성원이다.

[0139] 패지 NKX2-5 게놈 서열 ID: CU928102

.....gtccccctcctccggctggtccgcctctctctgccccttgccccgca
TTACCTGCCGCTGGCCACATCCCAGAGCTGGAAGCGGGTGCGCGGGCGCGCAGCGGGCA
CCATGCAGGGAGGCTGCCAGGGACCGTGGGCAGCGCCGCTCTCTGCCGCCACCTGGCGC
TGTGAGACGCGCGCTGCCACCAATGTTCCCGAGCCCGCGCTCAGCCCCACGCCGTTCTCG
GTCAAAGACATCTTGAACCTGGAGCAACAGCAGCGCAGCCTGGCCGCCGGGAGCTCTCC
GCGCGCTTGGAGGCCACCCCTGGCGCCCGCTCTCTGCATGCTGGCCGCCCTCAAGCCCCGAG
GCCTACGCGGGGCCGAGGCCGAGCGCCCGGCTCTCCGAGCTGCGCGCCGAGCTGGGC
CCCGCGCCCTACCCAGCCAAGTGGCGCCCTCTCTCAGCCGCCCGCCCTTCTACCCG
CGTGCTTAAGGCGACCCCGACCCGCCAAGGACCTCGAGCCGATAAGAAAG
 gtgaggaggaaacacaagcttcttc.....tctgcctctctgttccccccgcag
AGCTGTGCGCGCTGCAGAAGCGGCTGGAGCTGGAGAAGCCAGAGGCGGACAGCGCCGAGA
GACCTCGGGCGCGACGACGAAGGAAGCCGCGCTGCTCTTTTCGAGGCACAGGTCTACG
AGCTGGAGCGACGCTTCAAGCAGCAGCGGTACCTGTGCGCTCCCGAGCGTGACCAAGTTGG
CCAGCGTGTGAAGCTCACGTCCACGCAGGTCAAGATCTGGTTCCAGAACCGGCGCTACA
AGTGCAGCGGCAACGGCAGGACCAGACTCTGGAGCTAGTGGGGCTGCCCCCGCCCCGC

[0140]

CGCCGCCGCCCGCAGSATCGCGGTGCCAGTGTGGTGGCGGATGGCAAGCCTTGCCTCG
GGGACTCCGCGCCCTACGCGCCAGCCTACGGCGTGGGCTCAACGCCCTACGGCTATAACG
CCTACCCCGCCTACCCGGTTACGGTGGCGCGGCTGCAGCCCTGGCTACAGCTGCACCG
CTGCGTACCCAGCGGGCGGCCCGCGCAGTCGGCTACGGCGCCGCCAATAACAACCT
TCGTGAACCTTCGGCGTCGGGGACTTAAACGCGGTGCAGAGCCCGGGGATTCCGCAGGGCA
ACTCGGGAGTGTCCACGCTGCACGGTATCCGAGCCTGGTAGGGAAGGGGCTGTCTGGGG
CACCTCTAAAGAGGGGCACTAACTATCGGGGAGAGGGAGGGCTCCCGATACGATCCTGAG
TCCCTCAGATGTACATTGACTCCACAGGAGGCTCGGAGCTTTTCCGTCCGGTGGCGC
TTTATCCCCACGCGCGGGAGAGTTCTGTGGCAGAGGTTACGCAGCTTGGGGTGAGTGATCC
CGCAGCCCGGTGCCTTAGCCGTGCCCCGGGAGTGCCCTCCAAGCGCCACGGGCATCCC
CAATCGGCTGACACCGGCCAGTTGGGACCGGGAGCCCCAGCCCAGGCGTGCCAGGCTTAA
GATGGGGCCGCTTTCCCGATCTGGGCCCGGTGCCCGGGCCCTTGCTGCCTTGCCGC
TGCCCTCCCCACACCCGTAATTTATGTTTTTACTTGTCTGTGAAGAAATGAGAATCTCTT
TCCCATTAAGAGAGTGCGCTGA

tccgcctgtgtgcttctttcagcttgctgtgcttcagaaactgaaatttt..... (SEQ ID NO:1)

[0141]

[0142] 코드:

[0143] • 엑손/인트론

[0144] • 번역된 서열

[0145] • 플랭킹 서열

[0146] • 인트론 서열

[0147] • UTR

[0148] 돼지 NKX2-5 mRNA 서열: ID ENSST00000018494

ATGTTCCCCAGCCCCGCGCTACGCCCCACGCCGTTCTCG
 GTCAAAGACATCTTGAACCTGGAGCAACAGCAGCGCAGCCTGGCCGCGGGGAGCTCTCC
 GCGCGCTTGGAGGCCACCTGGCGCCCGCCTCCTGCATGCTGGCCGCTTCAAGCCCGAG
 GCCTACGCGGGGCGGAGGCCGCGCAGCGCCCGCCTCTCCGAGCTGCGCGCCGAGCTGGGC
 CCGCGCCCTCACCAGCCAAGTGGCGGCCCTCCTTCTCAGCGCCCCCGCTTCTACCCG
 CGTGCCATATGGCGACCCCGACCCGCCAAGGACCCCTCGAGCCGATAAGAAAG
 AGCTGTGCGCGCTGCAGAAAGCGGTGGAGCTGGAGAAGCCAGAGGCGGACAGCGCCGAGA
 GACCTCGGGCGCGCAGCAGGAAGGAAGCCGCGGTGCTCTTTTCGAGGCACAGGTCTACG
 AGCTGGAGCGACGCTTCAAGCAGCAGCGGTACCTGTGCGGCTCCCGAGCGTGACCAGTTGG
 CCAGCGTGTGAAGCTCACGTCCACGCAGGTCAAGATCTGGTTCAGAACCGGCGCTACA
 AGTGCAAGCGGCAACGGCAGGACCAGACTCTGGAGCTAGTGGGGCTGCCCCGCCCCCGC
 CGCCGCGGCGCCGAGGATCGCGGTGCCAGTGTGGTGGCGGATGGCAAGCCTTGCTCG
 GGGACTCCGCGCCCTACGCGCCAGCCTACGGCGTGGGCTCAACGCCCTACGCTATAACG
 CCTACCCCGCCTACCCGGTTACGGTGGCGCGGCTGCAGCCCTGGCTACAGCTGCACCG
 CTGCGTACCCAGCGGGGCGCCCCCGCGCAGTGGCTACGGCGCCGCCAATAACAAC
 TCGTGAACCTTCGCGCTCGGGGACTTAAACGCGGTGCAGAGCCCGGGGATTCGCGAGGGCA
 ACTCGGGAGTGTCCACGCTGCACGGTATCCGAGCCTGGTAG (SEQ ID NO:2)

[0149]

[0150] 돼지 NKX2-5 단백질 서열: F1SJY9-1

10	20	30	40	50
MFPSPALTPT	PFSVKDILNL	EQQQRSLAAG	ELSALEATL	APASCMIAAF
60	70	80	90	100
KPEAYAGPEA	AAPGLSELRA	ELGPAPSPAK	CAPSFSAAPA	FYPAYGDPD
110	120	130	140	150
PAKDPRADRK	ELCALQKAVE	LEKPEADSAE	RPRARRRRRP	RVLFSQAQVY
160	170	180	190	200
ELERRFKQQR	YLSAPERDQL	ASVLKLTSTQ	VKIWFQNRRY	KCKRQRQDQT
210	220	230	240	250
LELVGLPPPP	PPPARRIAVP	VLVRDGKPC	GDSAPYAPAY	GVGLNAYGYN
260	270	280	290	300
AYPAYPGYGG	AACSPGYSCT	AAYPAGPPPA	QSATAAANN	FNVPFVGDLN
310	320			

AVQSPGIPQG NSGVSTLHGI RAW (SEQ ID NO:3)

[0151]

[0152] 돼지 유전자: HAND2 ENSST00000009703 (양상불)

[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 양상불 단백질 패밀리의 구성원이다.

[0158] 돼지 HAND2 게놈 서열 ID: CU468996

[0159] 돼지 HAND2-201 mRNA ID: ENSST00000010638 (양상불) XM_005670479 (NCBI, 예측)

[0160] 298..767 / 유전자="LOC100153751" /표준_명칭="Hand2" /db_xref="UniSTS:238134" 기원

```

1 atggagatct tgcctgggaaa atccgcttgc tccctcaccg gcgtccagtc cgggagaaca
61 gccgcgcgcg ccgtcaccga ggagccccc cggccgctgc gcaacagccc tccaagcccc
121 agccgcgcgc ccgtcgcgag acgagaggag agcggaaacac gttactcgtc gctaaagtca
181 cattccagga ccaaaacaaac aacaacaaa aatttcatta aaacaataag cgcccaagaa
241 ccagatccag gctggttggg ggaagagatc ggccacccc agatgtcgc ccgcgactac
301 agcatggccc tgcctacacg tccggagtag gccagcgggt ccgcagcctt ggaccactcc
361 cattacgggg ggtgcccgc ggccgcggg ccccggggc tgggggggc gcgcccgtg
421 aagcgccggg gcacagccaa ccgcaaggag cggcgccagg ctcagagcat caacagcgcc
481 ttccgcgagc tgcgcgagtg tatccccaat gtgcccgcg acaccaaact ctccaagatc
541 aagacgctgc gctggccac cagctacatc gcctacctca tggacctgct ggccaaggac
601 gaccagaacg gcgagggcga ggccctttaag gcggaatca agaagacaga tgtgaaagaa
661 gagaaaagga agaaggagct gaatgaaatc ttgaaaagca cagtgcagcag caacgacaag
721 aaaaccaaag gccggacggg ctggccgcag catgtctgg cctggagct caagcagtga
781 ggtggagaaa gaggaggtgg aggtggtgga agaggaggag gagagcgca gccaggccct
841 ggagccgcat gcagaccag gactccggg cagctcctgc gactccgt ctgaggactt
901 cctgcatttg gatcatcgg tttatttatg tgcaatgtgc ctccctctct ttgccccct
961 ttgaggcatc cgtccccac cccccctcc aaaaaagtgg atatttgaa aaaagcatc
1021 catattttta tatgaaggag acactccgc gtggttaagg atccgctgt cgtctttag
1081 attctctgtt tgtgaatgtt tctcttggc tgtgtagaca ccagcgttgc tccctccca
1141 cctatccagc cccttacaga taaagacagc tgataatagt gtattttaga agtgtatctt
1201 taatacctgg ccttttgata taaatattcc tggggattat aaagttttat ttcaaagcag
1261 aaaacggggc cgctaacatt tccgttggg tgggtatcta gtgctgccgt ttcactctgt
1321 tggttcccta tttgaagatg tttccaacag ctcttgttt tgtgacttc cgtcctctaa
1381 aactaagtgg aatttaatta atattgaagg tgaacggtt gtaagtaac aataaacac
1441 tgtgtgtttt 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="MEILLGKSACSPHGVQSRRTAAAVTQEPFRPLRNSPFPSPRRL
RGAREESGTRYSLKSHSRKTTTTTKNFIKTISAQEPRSGWLGEIGHPEMSPPDYSM
ALSYSPYASGAASLDHSHYGVPPGAGFPGLGGPRPVKRRGTANKERRRTQSINSA
FAELRECIPNVFADTKLSKIKTLRLATSYIAYLMDLLAKDDQNGEAEAFKAEIKKTDV
KEEKRRKELNEILKSTVSSNDKKTGRTGWPQHVALELKQ" (SEQ ID NO:5)

```

[0164]

[0165] 유니프롯 ID: F1RJ02-1

```

10 20 30 40 50
GWLGEIGHPEMSPPDYSMA LSYSPYASG AASLDHSHYGVPPGAGFPGL
60 70 80 90 100
LGGPRPVKRR GTANKERRR TQSINSAFAE LRECIPNVA DTKLSKIKTL
110 120 130 140 150
RLATSYIAYL MDLLAKDDQN GEAEAFKAEI KKTVDVKEKR KKELENEILKS
160 170
TVSSNDKKTG RTGWPQHVW ALELKQ (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 양상블 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 tcactgcag ctccaggcgg ggtggcctcc tccatcctcc
acccctcaa

61 cccctgcacc gggtacagag ctctcttctg gcaagtttct ccccgagaga
gaagaggaag

121 ggagagcagg acccagagcg gtcacagggc cctgggctca ccatggccga
cggagacgag 181 ggctttggcc tggtcacac acccctggaa ccagattcaa
aggatctacc ctgtgactca 241 aaacccgaga gtgggctagg ggcccccagc
aagtccccgt cgtccccga gccgccttc 301 acccagcagg gcatggaag
gatcaagggtg tttctccatg aaagagaact gtggctgaaa 361 tttcacgaag
tgggcacaga aatgatcata accaaggctg gcaggcggat gtttccagt 421
tacaagtga aggtgactgg ccttaatccc aaaaccaagt acattctcct tatggacatc
481 gttcctgcgc atgaccacag atacaagttc gccgataata aatggtctgt
gacaggcaaaa 541 gcggagcctg ccatgccggg ccgctctac gtgcaccggg
actgcgggc cactggagcg 601 cattggatgc ggcagctctt cctctccag
aaatcaagc tcaacaacaa ccacctggac 661 ccgtttgggc acattattct
aaattccatg cacaataacc agcccagatt acacatcgtg 721 aaagcggacg
aaaataatgg atttggctca aaaaatactg cattctgtac ccacgtcttt 781
cctgagacag cgtttattgc agtgacttcc taccagaacc acaagatcac ccaattaaag
841 atcgagaata atcccttgc caaaggatcc cggggcagcg atgacatgga
actgcacagg 901 atgtcaagga tgcaaaagtaa agaataatcc gtggttccca
ggagcacagt gagacagaaa 961 gtggcctcca accacagtc cttcagcagt
gagcctcgtg ctctctccac ctcatccaac 1021 ttggggctcc agtatcagtg
tgagaatgggt gtgtccggcc cctcccagga cctcctgccc 1081 ccacctaac
cgtaccact tccccaggag cacagccaaa tttaccattg caccaagagg 1141
aaagatgaag aatgttccac cacagagcat cctataaga agcctacat ggagacgta
1201 cccagtgaag aggacccctt ctaccagcc ggctacccc agcagcaggg
tctgggtgcc 1261 tctaccgga cagagtcagc ccagcggcag gctcgcagt
acgcagctc cgcaccgcc 1321 agtgagccgg tgccagcct ggaggacatt
agctgcaaca cgtggcccg catgccttc 1381 tacagcagct gcacagtcac
caccgtgcag cccatggaca ggtacccta ccagcacttc 1441 tctgctcact
tcacctggg gccctggtc ccccgctgg gtggcatggc caaccacggc 1501
tcccgcagt tgggggagg aatgttccag caccagacct ccgtggcca ccagcctgtg
1561 gtcaggcagt gtgggctca gactggcctc cagtccccgg gcagccttca
agcgtccgag 1621 ttcctgtact ctcatggcgt gccaaaggac ctgtccccgc
atcagtacca ctctgctgtg 1681 caccgggtcg gcatggctcc agagtggagt
gacaacagct aaagcgaggc ctgctcttc 1741 actgacgttt ccagagggag
gggagagagg gagagagaca gtcgcagaga gaacccaag 1801 aacgagatgt
cgcatttcac tccatgttca cgtctgact tgagaagccc accctggaca 1861
ctgatgtaat cagttagctt aaaccacaat tcaaaaaatg tgactttgtt ttgtctcaa
1921 acttaaaaaa tcgacaagag gcgatgagtc ccaaccccc ctacccgcc
cccaccatcc 1981 accaccacca cagtcacaa ctggccacat tcacacgacc
tccagatgcc ctccgggatt 2041 ccttcttttg gtctccagaa agtcttgct
catggagtgt tttatccaa aacatagatg 2101 gagtcattec ctgtcttggt
gttactgtg acattgtta (SEQ ID NO:7)

```

[0177]

[0178] 폐지 TBX5 단백질 ID: FIRKD2 (양상불, 예측)

[0179] >tr|FIRKD2|FIRKD2_폐지 특징규명되지 않은 단백질 OS=멧돼지 GN=TBX5 PE=4 SV=2

```

MADGDEGFGLAHTPLEPDSKDLPCDSKPESGLGAPSKSPSSPQAAFTQQGMEGIKVFLE
RELWLKFHEVGTETMIITKAGRRMFPSYKVKVTGLNPKTKYILLMDIVPADDHRYKFADNK
WSVTGKAEPAMPGRLYVHPDSPATGAHWMRQLVVSFQKLKLTNNHLDPFGHIIILNSMHKYQ
PRLHIVKADENNGFGSKNTAFCTHVPETAFIAVTSYQNHKITQLKIENNPFAGFRGSD
DMELHRMSRMQSKEYPVVFRSTVRQKVASNHSPFSSEPRALSTSSNLGSQYQCENGVSGP
SQDLLPPNPYPPLPQEHQSIIYHCTKRKADEECSTTEHPYKKPYMETSPSEEDPFYRAGYP
QQQLGLGASYRTESAQRQACMYASSAPPSEPVPSLEDISCNTWPSMPSYSSCTVTTVQPM
DRLPYQHFSAHFTSGPLVPRLAGMANHGSFQLGEGMFQHQTSVAHQPVVRQCGPQTGLQSP
GSLQASEFLYSHGVPRTLSLPHQYHSAVHGVGMVFEWSDNS (SEQ ID NO:8)

```

[0180]

- [0181] /db_xref="유전자ID:100522280" (NCBI 엔트리, 예측)
- /번역="MADGDEGFGLAHTPLEPDSKDLPCDSKPESGLGAPSKSPSSPQA
AFTQQGMEGIKVFLLHERELWLKFHEVGTMIITKAGRMMFPSYKVKVTGLNPK
TKYIL
LMDIVPADDHRYKFADNKWSVTGKAEPAMPGRLYVHPDSPAAGAHWMRQLV
SFQKLKL
TNNHLDPPFGHILNSMHKYQPRHLIVKADENNGFGSKNTAFCTHVPETAFIAVT
SYQ
NHKITQLKIENNPFAKGFGRGSDDMELHRMSRMQSKEYPVVPRSTVRQKVASNH
SPFSS
EPRALSTSSNLGSQYQCENGVSQPSQDLLPPPNPYPLPQEHSTQYHCTKRKDEEC
STT
EHPYKKPYMETSPSEEDPFYRAGYPQQQGLGASYRTESAQRQACMYASSAPPS
EPVPS
LEDISCNTWPSMPSYSSCTVTTVQPMRLPYQHFSAHFTSGPLVPRLAGMANH
GSPQL
GEGMFQHQTSVAHQPVVRQCGPQTGLQSPGSLQASEFLYSHGVPRTLSPHQYH
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 선행 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
- "MFPSPALTPFVSKDILNLEQQQRSLAAAGELSARLEATLAPS
SCMLAAFKPEAYAGPEAAAPGLPELRAELGRAPSPAKCASFPAAPAFYPRAYSDDPD
AKDPRAEKKELCALQKAVELEKTEADNAERPRARRRRKPRVLF5QAQVYELERRFKQQ
RYLSAPERDQLASVLKLTSTQVQKIWFQNRNRYKCKRQRQDTLELVGLPPPPPPARRI
AVPVLVRDGKPCLGDSAPYAPAYGVGLNPGYGNAYPAYPGYGGAACSPGYSCAAAYPA
GPSPAQPATAAANNFVNFVGVGLNAVQSPGIPQSN5GVSTLHGIRAW" (SEQ ID NO:10)
- [0190]

[0191] 인간 NKX2-5 mRNA 서열

```

1 gacgggtgcg cgggcgggcg gcggcaccat gcagggaagc tggcaggggc
cgtgggcagc

61 gccgctttct gccgccacc tggcgctgtg agactggcgc tggcaccatg
ttccccagcc 121 ctgctctcac gccacgccc ttctcagtc aagacatct
aaacctggaa cagcagcagc 181 gcagcctggc tgcgcgcgga gagctctctg
cccgccctgga ggcgaccctg gcgcctctct 241 cctgcctgct ggcgccttc
aagccagagg cctacgctgg gcccgaggcg gctgcgcggg 301 gccctccaga
gctgcgcgca gagctgggccc gcgcgccttc accggccaag tgtgcgtctg 361
cctttccgcg cgcgcccgcc ttctatccac gtgcctacag cgaccccgac ccagccaagg
421 accctagagc cgaagaagaaa gagctgtgcg cgtgcagaa ggcggtggag
ctggagaaga 481 cagaggcgga caacgcggag cggccccggg cgcgacggcg
gaggaagccg cgcgtgctct 541 tctcgcaggc gcaggtctat gagctggagc
ggcgcttcaa gcagcagcgg tacctgtcgg 601 cccccgaacg cgaccagctg
gccagcgtgc tgaactccac gtccacgcag gtcaagatct 661 ggttccagaa
ccggcgctac aagtgcagc gccagcggca ggaccagact ctggagctgg 721
tggggtctgc ccgcgcgcg ccgcgcgcctg ccgcagagat cgcggtgcca gtgctggtgc
781 gcgatggcaa gccatgccta ggggactcgg cgcctacgc gctgcctac
ggcgtgggccc 841 tcaatcccta cggttataac gcctaccccg cctatccggg
ttacggcgcc gcggcctgca 901 gccctggcta cagctgcat gccgcttacc
ccgcgcggcc ttccccagcg cagccggcca 961 ctgcgcgcgc caacaacaac
ttcgtgaact tcggcgtcgg ggaacttgaat gcggttcaga 1021 gccccgggat
tccgcagagc aactcgggag tctccacgct gcctggtatc cgagcctggt 1081
aggggaaggga ccgcgctggc gcgacccctga ccgatccac ctcaacagct cctgactct
1141 cggggggaga aggggctccc aacatgaccc tgagtccctt ggattttgca
ttcactcctg 1201 cggagacctt ggaacttttt ctgtccacg cgcgtttgtt
cttgcgcacg ggagagtttg 1261 tggcggcgat tatgcagcgt gcaatgagtg
atcctgcagc ctgggtgtctt agctgtcccc 1321 ccaggagtgc cctccgagag
tccatgggca cccccggttg gaactgggac tgagctcggg 1381 cagcagggc
ctgagatctg gccgccatt ccgcgagcca ggcgcggcg ccggggcctt 1441
tgctatctcg ccgtgcgcg ccacgcacc caccgtatt tatgttttta cctattgctg
1501 taagaaatga cgatccctt cccattaaag agagtgcgtt gaaaaaaaa
aaaaaaaaa 1561 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1621 aaaaaaaaaa aa // (SEQ ID NO:11)

```

[0192]

[0193] 호모 사피엔스 심장 및 신경 능선 유도체 발현 2 (HAND2) mRNA, 완전 cds

[0194] 진뱅크: FJ226608.1

[0195] 인간 HAND2 유전자 정보

[0196] 유전자좌 FJ226608 2351 bp mRNA 선행 PRI 15-APR-2009

[0197] 정의 호모 사피엔스 심장 및 신경 능선 유도체 발현 2 (HAND2) mRNA, 완전 cds. 수탁 FJ226608 VERSION FJ226608.1 GI:209170693

[0198] 인간 HAND2 mRNA 정보

[0199] 2234..2239 /조절_부류="폴리A_신호_서열" /유전자="HAND2" 기원

```

1 agctgtacat ggagatcttg ctgggaaaat ccgcttgctc ccttcacgtc
gtccagccca

61 ggagaaccac cgcgcgcacc ccggagcttc ctgggccacc ggcagagacc
ctccgagagc

121 ccgagccgcg gtcttcgagc tccaaggctc attcagggcc ccagatcctt
gccccgaaaag 181 gagaggatct gagaaaatgg atgcactgag acctctctga
aaacccctccg agagagcgcg 241 agaggagcga ggacacgtta ctgcagcta
aaatcacatt taaggaccaa aacaacaaca 301 accaaaaatt tcattaaaac
aataagcgcc caagaaccca gatcgggctg gtggggggag 361 gggaagaggg
gggaagggga gggtcgacg gaggtagctt tgcagtgagc agtcgacccc 421
gccccccccc ggcacagctg gaccggctcc tccagccgcg gctcagactc gcccctggat
481 tccggggttag ctccgggtgc aggaccgcgg ccggggcttg gattcccgag
actccgcgta 541 ccagcctcgc gggagccccc gcacctttgt atgagcacga
gaggattctg cctccgcgca 601 gcagcccggg aagcaggagc cgaagcgcg
gcccgtggagc aagggcgga ccggagcgcg 661 cggcgcgcg gcgcaggggc
gcacgggtgc aggaccagct cgcgcgcgcc catggggagc 721 cggcgcgcg
agcgtgctg aggcggggcc gctgggccc ggggggggac ggggccccgg 781
ctgcagcagc cccctctgcg gctgcggggc gggcccgggc gcccgggggc tgggggggtg
841 ggggtggggg aggacgcga ggcgtgaggc agggggcccg gccgagggcg
cggcggggct 901 gcgcgcagc tggggcgct ggaggggcgc ggagggcgaa
atgagtctgg taggtggtt 961 tccccaccac ccggtgggtg accacgagg
ctaccgctt gccgcgcgc ccgcgcgcgc 1021 tgcgcgcgc gccgccagc
gctgcagcca tgaggagaa cctactctcc atggctggct 1081 catcgccac
ccgagatgt cgcgcgcga ctacagcatg gccctgtct acagcccca 1141
gtatgccagc ggcgcgcgc gctggacca ctccattac gggggggtgc cgcggggcgc
1201 cgggcccccg ggcctgggg ggcgcgcgc ggtgaagcgc cgaaggaccg
ccaaaccgca 1261 ggagcgcgcc aggaactcga gcatcaacag cgccttcgcc
gaactgcgcg agtgcacccc 1321 caacgtaccc gccgaccca aactctccaa
aatcaagacc ctgcgcctgg ccaccagcta 1381 catcgccctac ctcatggac
tgctggccaa ggcagaccag aatggcgagg cggaggcctt 1441 caaggcagag
atcaagaaga ccgacgtgaa agaggagaag aggaagaagg agctgaacga 1501
aatcttgaaa agcacagtga gcagcaacga caagaaaacc aaaggccgga cggcctggcc
1561 gcagcacgtc tgggcctgg agctcaagca gtgaggagga ggagaaggag
gaggaggaga 1621 gcgcgagtga gcaggggcca aggcgccga tgcagacca
ggactccgga aaagccgtcc 1681 gcgctccgct ctgaggactc ctgcatctg
gaatcatccg gtttatttat gtgcaatttc 1741 ctccctctct ctttgacccc
ctttgaggca tctgtctccc gtctccccc ccaaaaaaaaa 1801 agtggatatt
tgaaagaaaag cattccatat ttaatacga agaggacact ccgctgtggt 1861
aagggatccc gtcgtctcat agattctgtg tgcgtgaatg ttccctcttg gctgtgtaga
1921 caccagcgtt gccccccgc aacctactca acccttcca gataaagaca
gtgggcacta 1981 gtgcgtttgt gaagtgtatc ttaataactt ggcctttgga
tataaatatt cctgggtatt 2041 ataaagtatt atttcaagc agaaaacagg
gcccctaaca tttccgttg ggtcggtatc 2101 tagtgcctac cattcatctg
tggtcgcttc ctctttgaag atgtttccaa cagccacttg 2161 ttttgtgcac
ttccgtcttc taaaactaaa tggaaattta ttaatttga aggtgtaaac 2221
gttgtaagta ttaataaac cactgtgttt tttttttaca aaaacctaa tcttttaag
2281 gctgatactt caaaagagtt ttgaaaacaa agctgttata ctgttttgc
taatatattaa 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="MSLVGGFPHHPVVHHEGYPFAAAAAAAAAASRCSHEENPYFH
GWLIGHPEMSPPDYSMALSYSPEYASGAAGLDHSHYGGVPPGAGPPGLGGPRPVKRRG
TANRKERRRTQSINSAFAELRECIPNVPADTKLSKIKTLRLATSYIAYLMDLLAKDDQ
NGEAEAFKAEIKKTDVKEEKKKELNEILKSTVSSNDKTKRGTPQHWALELKQ" (SEQ ID
NO:13)

```

[0203]

[0204] 호모 사피엔스 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 선행 PRI 15-JUL-2006

[0208] 정의 호모 사피엔스 T-박스 5, mRNA (cDNA 클론 MGC:35581 IMAGE:5204163), 완전 cds. 수탁 BC027942 VERSION BC027942.1 GI:20379838

[0209] 인간 TBX5 mRNA 정보:

[0210] 기원

```

1 ttcagagaga gagagagagg gagagagagt gagagagact gactcttacc
tcgaatccgg      61 gaactttaat cctgaaagct gcgtcagaa aggacttcga
ccattcactg ggcttccaac

121 tttccctccc tgggggtgta aaggaggagc ggggcactga gattatatgg
ttgccgggtgc      181 tcttgagggc tattttgtgt tctttggcgc ttgccaactg
ggaagtattt agggagagca      241 agcgcacagc agaggagggtg tgtgttgag
gtgggcagtc gccgcggagg ctccagcggg      301 aggtgcgccc tagtaggcag
cagtagccgc tattctgggt aagcagtaaa cccgcataa      361 acccggagc
caccatgctt gctccccgc ctccacggcg gcttccctgc taggagcagc      421
agaggatgtg gtgaatgcac cggcttcacc gaacgagagc agaaccctgc gcgggcacag
481 ggccctgggc gcaccatggc cgacgcagac gagggctttg gcttggcgca
cagcgccttg      541 gagcctgacg caaaagacct gccctgcgat tcgaaacccg
agagcgcgct cggggccccc      601 agcaagtccc cgtcgtcccc gcaggccgcc
ttcaccacagc agggcatgga gggaaatcaaa      661 gtgtttctcc atgaaagaga
actgtggcta aaattccacg aagtgggcac ggaatgac      721 ataaccaagg
ctggaagcgc gatgtttccc agttacaaag tgaagggtgac gggcctaat      781
cccaaaacga agtacattct tctcatggac attgtacctg ccgacgatca cagatacaaa
841 ttccagata ataatgtgtc tgtgacgggc aaagctgagc ccgcacatgcc
tggccgcctg      901 tacgtgcacc cagactcccc cggcaccggg gcgcattgga
tgaggcagct cgtctccttc      961 cagaaactca agctcaccaa caaccacctg
gaccattttg ggcattattat tctaaattcc      1021 atgcacaaat accagcctag
attcacatc gtgaaagcgc atgaaaataa tggattttgg      1081 tcaaaaaata
cagcgttctg cactcacgtc tttctgaga ctgcgtttat agcagtgaact      1141
tctaccaga accacaagat cagcaatta aagattgaga ataatccctt tgccaaagga
1201 tttcggggca gtgatgacat ggagctgcac agaattgtcaa gaatgcaaag
taaagaatat      1261 ccgctggctc ccaggagcac cgtgaggcaa aaagtggcct
ccaaccacag tcctttcagc      1321 agcagagtct gagctctctc cactctatcc

```

[0211]

```

aatttgggggt cccaatacca gtgtgagaat      1381 ggtgtttccg gccctccca
ggacctctctg cctccaccca acccatacc actgccccag      1441 gagcatagcc
aaattttacca ttgtaccaag aggaaagagg aagaatgttc caccacagac      1501
catccctata agaagcccta catggagaca tcaccacagtg aagaagatct cttctaccgc
1561 tctagctato cacagcagca gggcctgggt gctctctaca gacagagtc
ggcacagcgg      1621 caagcttgca tgtatgccag ctctgcgccc ccagcgcagc
ctgtgccacg cctagaggac      1681 atcagctgca acacgtggcc aagcatgcct
tcttacagca gctgcaccgt caccaccgtg      1741 cagcccatgg acaggctacc
ctaccagcac tctctcgctc acttccacct ggggccccgt      1801 gtccctcgcc
tggctggcat ggccaacct ggctccccac agctggggaga gggaaatgttc      1861
cagcaccaga cctccgtggc ccaccagcct gtggtcaggc agtgtggggc tcagactggc
1921 ctgcagtccc ctggcacccct tcagcccccct gagtctctct actctcatgg
cgtgccaaag      1981 actctatccc ctcatcagta ccactctgtg caggagttg
gcatgggtgcc agagtggagc      2041 gacaatagct aaagtggagg ctgcttcaca
acagacattt cctagagaaa gagagagaga      2101 gaggagaaaag agagagagg
agagagacag tagccaagag aaccccacag acaagatttt      2161 tcatttcacc
caatgtttac actctgcctc aaggtcgctg gatgtgata taatcagtag      2221
cttgaacca caattttaaa aatgtgactt tctgtttttg tctcaaaact taaaaaaca
2281 aacacaaaaa gatgagtcct acccccccact accaccacac ccatcaacca
gccacattca      2341 cgctactccc cagatctctt ccccatctcc tttttttggg
ctctagaaaag tcttgccctc      2401 ttgagtggtt ttccttagtg ctagtttggg
gtctgtccct gtcttggtgt taatgttgac      2461 attgttatat aataaatgat
aatatatttt tttctttcaa ttttcttaat gggaccocagt      2521 cctttatttg
gggggaggtc tgaggcaagt atatttcaaa atatgtactt gcgggattcc      2581
tctcaagtaa accatccctg aaacctaaat tcacgtttcc ccttgactaa gaaaagcacc
2641 tacctctgcc atgtgatgtt tctgaaaagc ctctgtatgt ccccatattg
tttggttttg      2701 tctgccttc toaatatca cgtgctcagt tttgcctcta
cttaaccatg gagtccagat      2761 aacactgacg ctccctggca tcttatctta
ctcagcccta ccattctgcc agctctgtct      2821 ttccagctgt ctgtcgctaa
aacgtggcct atagcttccc ttccggaaaag cttgctttga      2881 aaaacttaaa
aagccccgt ttacatgtag gcaggactgt gataacagtg caagctctgt      2941
gttgacaaga gttgtggaca aaaagccaaa ataatattc ttcctgatta aaaaaatttt
3001 ttttgaaaaa aacaaggcca gcccacact tccaaacct caccaccaac
aacccaaact      3061 gcatgtcaag caaatgcac aattcctaca gaagaggcaa
gacacagtc ccaatgat      3121 ctgcgcaaaag aaaccacgcc cacaccatg
ccgacacaaa actgtgttta ctgaaagccg      3181 aaaacagtat taaaaaaagt
gtgtaagtaa agtgtttagg taggttctt cagatgtaat      3241 attttactgg
tactatttat ttataaatag gaattctaat taagtaataa catgaaatga      3301
aacccagcat aggagctggc caagagcttt taattttatt gatactcaaa accaagtgtg
3361 tgtttttttg tttttttttg tttttttctt ctttogaatg tgctttgctt
tttttgatta      3421 aaaagaattt ttttttctt ttttataaac agaccctaatt
aaagagaaca ggttaagatg      3481 tgaggctgag tgtgtttaag tacgtgagag
agtgtgagtg tgtttgtaag tgagtgtccc      3541 tatgcgatta tgtctcttta
cgttgctaag gggggagggg gaggattaag tactcgtgcc      3601 ttatatttgt
gtgccaatta atgcctaata aataccatgt gcttaacaaa gtaaaaaaaa      3661
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa
3721 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa (SEQ ID NO:14)

```

[0212]

[0213] 인간 TBX5 단백질 정보

[0214] /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="MADADEGFLAHTPLEDAKDLPDCKPESALGAPSKSPSSPQA
AFTQQGMEGIKVFLLHERELWLFHEVGTEMIITKAGRRMFPSYKVKVTGLNPKTKYIL
LMDIVPADDHRYKFADNKWSVTGKAEPAMPGRLYVHPDSPATGAHWMRQLVSFQKLL
TNNHLDPFHIIILNSMHKYQPRHLIVKADENNGFGSKNTAFCTHVPETAFIAVTSYQ
NHKITQLKIENNPFAGKFRGSDDMELHRMSRMQSKEYPVVPRSTVRQKVASNHSPFSS
ESRALSTSSNLGSQYQCENGVSQPSQDLLPPNPYPPLPQEHSQLYHCTKRKEEECSST
DHPYKKPYMETSPSEEDSFYRSPYQQGLGASYRTESAQRQACMYASSAPPSEVPVS
LEDISCNTWPSMPSYSCTVTTVQPMMDRLPYQHSAHFTSGPLVPRLAGMANHGSPL
GEGMFQHQTSVAHQPVVRQCGPQTGLQSPGTLQPPEFLYSHGVPRTLSPHYHSHVHGV
GMVPEWSDNS" (SEQ ID NO:15)

[0215]

[0216] 참고문헌

1. Garry, DJ, Martin, CM. Circ Res. 2004;95(9):852-4.
2. Hoffman, JI. 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. PMID: 2630085.
9. Caprioli, A, et al. Circulation. 2011;123(15):1633-41. PMID: 3110259.
10. Rasmussen, TL, et al. Development. 2011;138(21):4801-12. PMID: 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. PMID: 3651838.
13. Rasmussen, TL, et al. PLoS One. 2012;7(11):e50103. PMID: 3501484.
14. Behrens, et al. Stem Cells and Development. 2013;22(15):2211-20. PMID: 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. PMID: 3795927.
18. Chan, SS, et al. Cell Stem Cell. 2013;12(5):587-601. PMID: 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. PMID: 4142794.
21. Shi, X, et al. Dev Biol. 2014;389(2):208-18. PMID: 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. PMID: 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. PMID: 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. PMID: 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. PMID: 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. PMID: 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. PMID: 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.
 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.

[0218]

[0219]

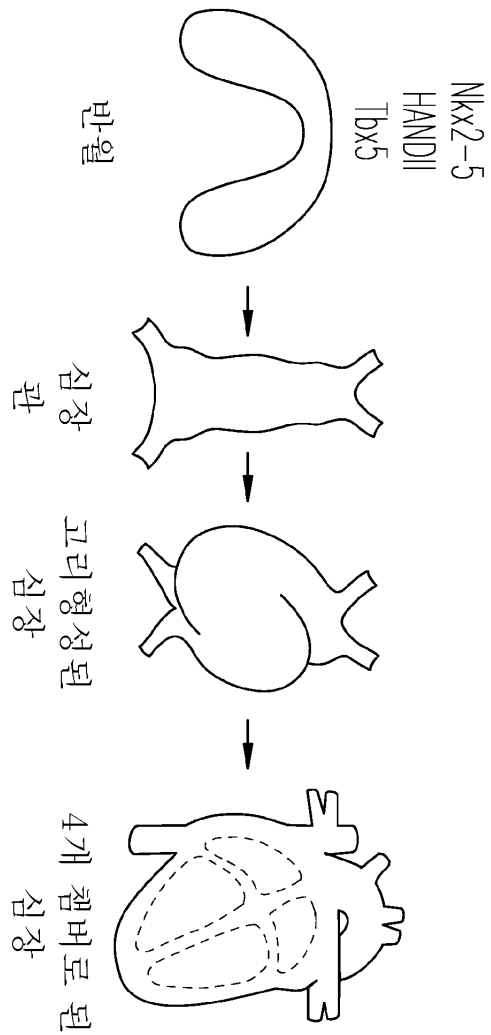
[0220]

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.

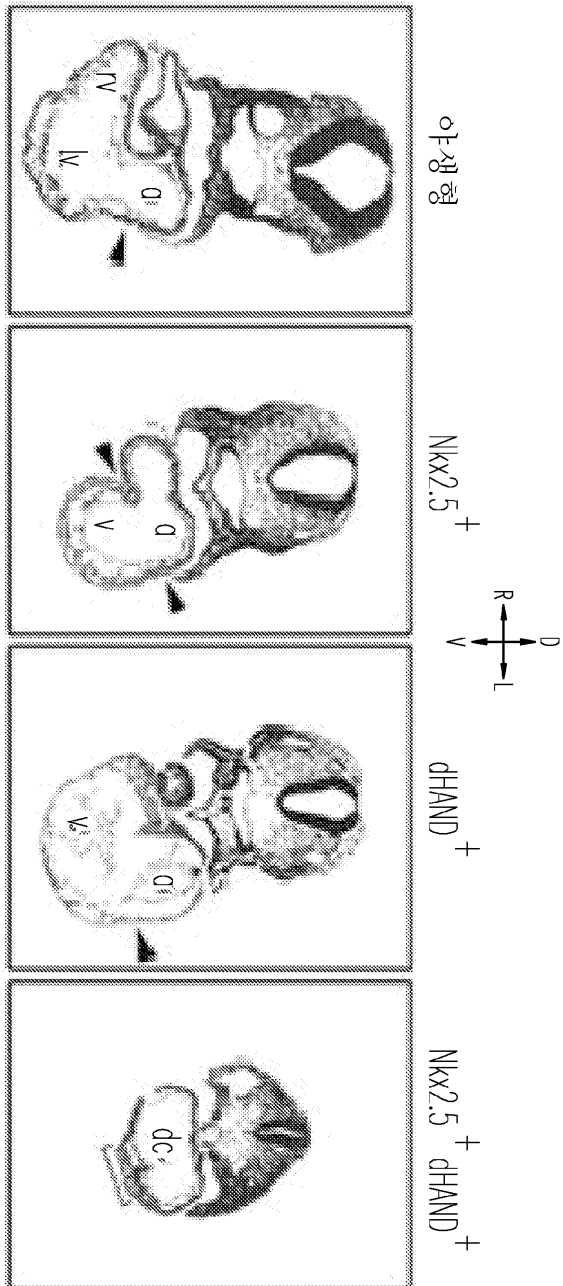
참조로 포함된 용어 정의가 본원에서 정의된 용어와 상충하는 경우, 본 명세서가 조정하여야 한다.

도면

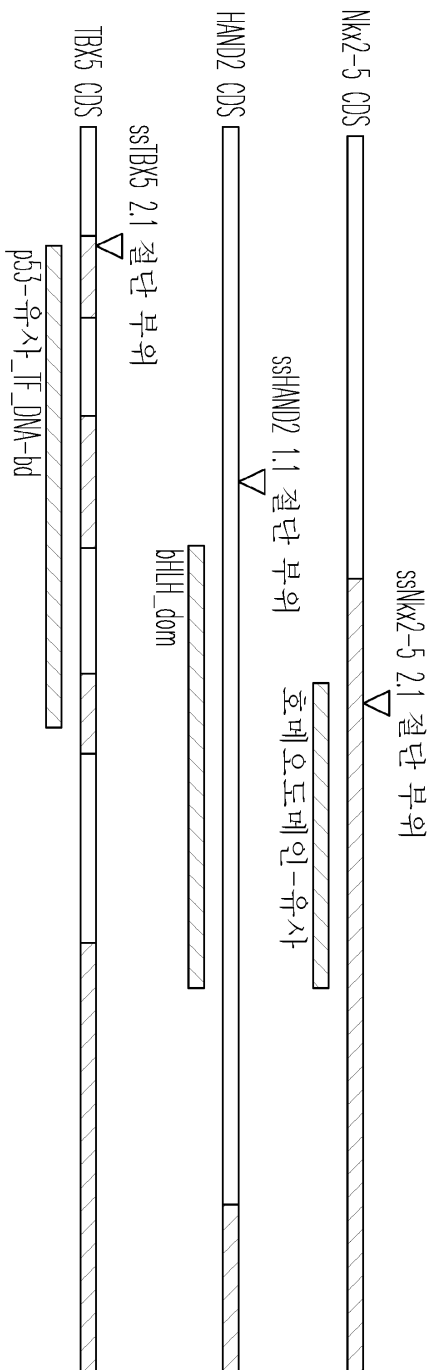
도면1



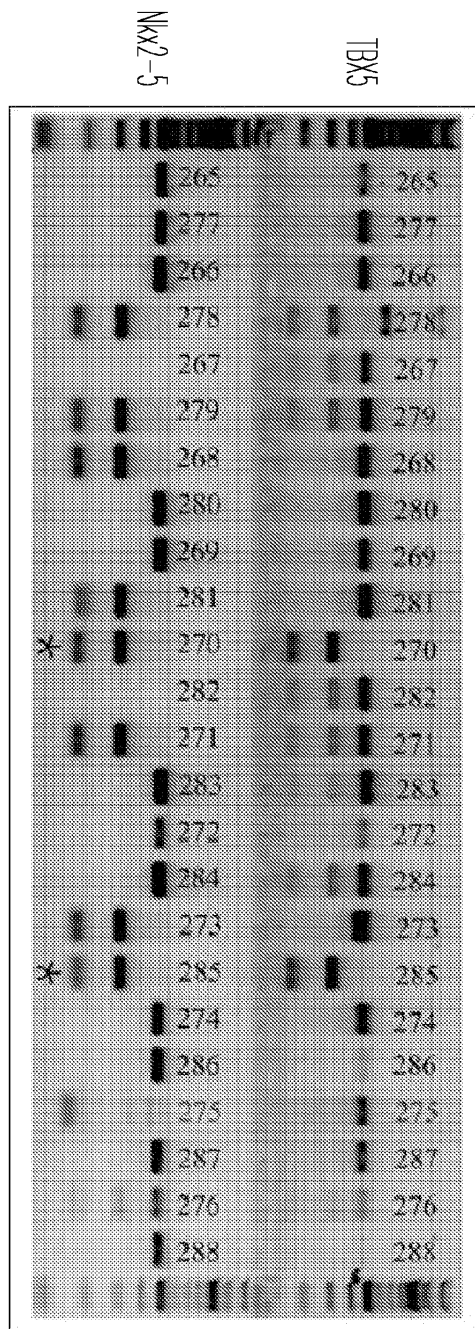
도면2



도면3a



도면3b



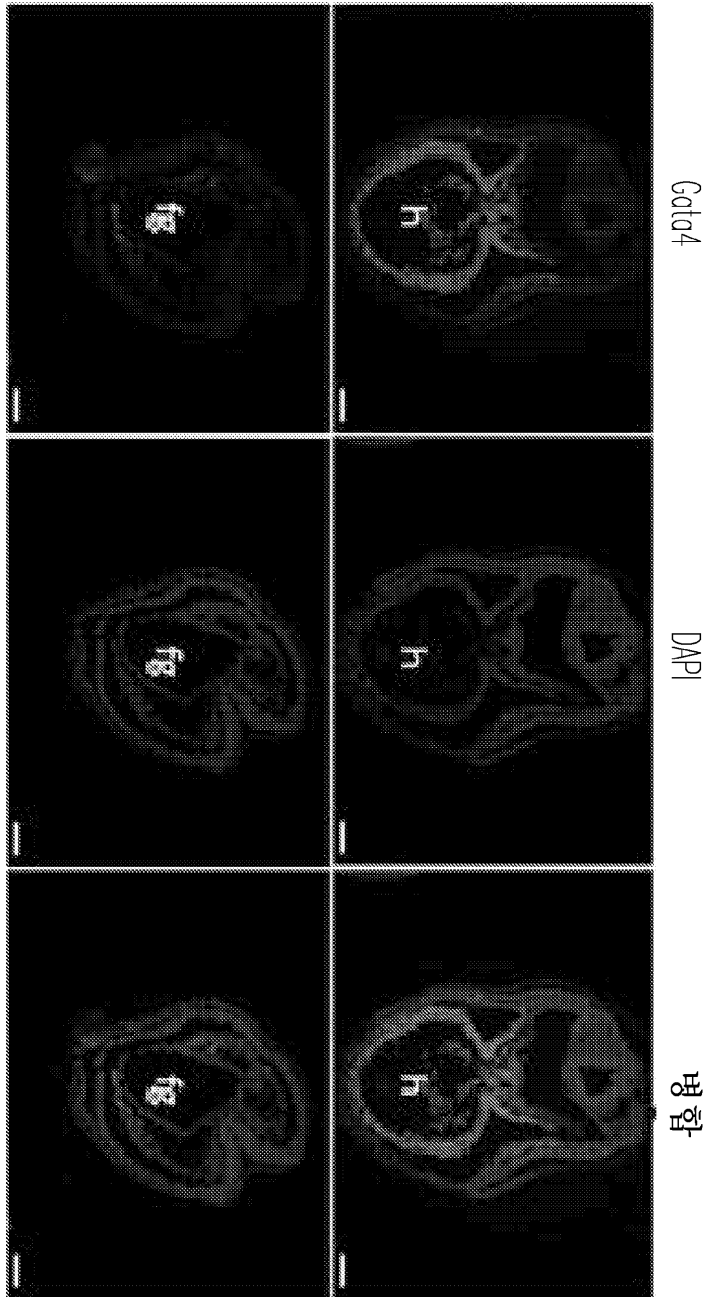
도면3c

TALEN 쌍	동형 접합성	Nkx2-5 및 TBX5		삼중 유전자 돌연변이체의 수 (전체 중 %)
	KO의 수 (전체 중 %)	이중 KO의 수 (전체 중 %)		
ssNkx2-5.2.1	102 (21%)			
ssHand2.1.1	N/A	33 (7%)		4 (1%)
ssTBX5.2.1	65 (14%)			

도면4

Nkx2.5/HAND1/Bbx5 KO

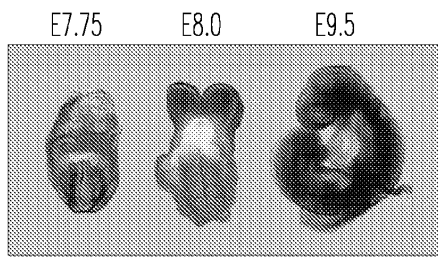
야생형



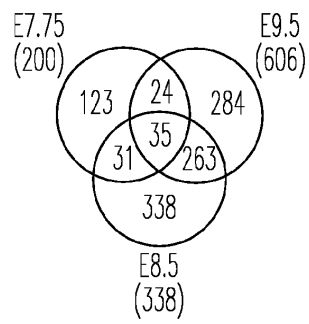
도면5a

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

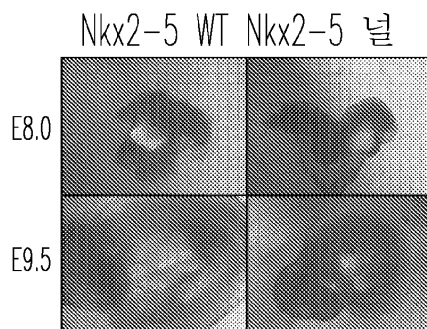
도면5b



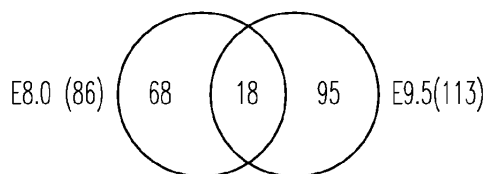
도면5c



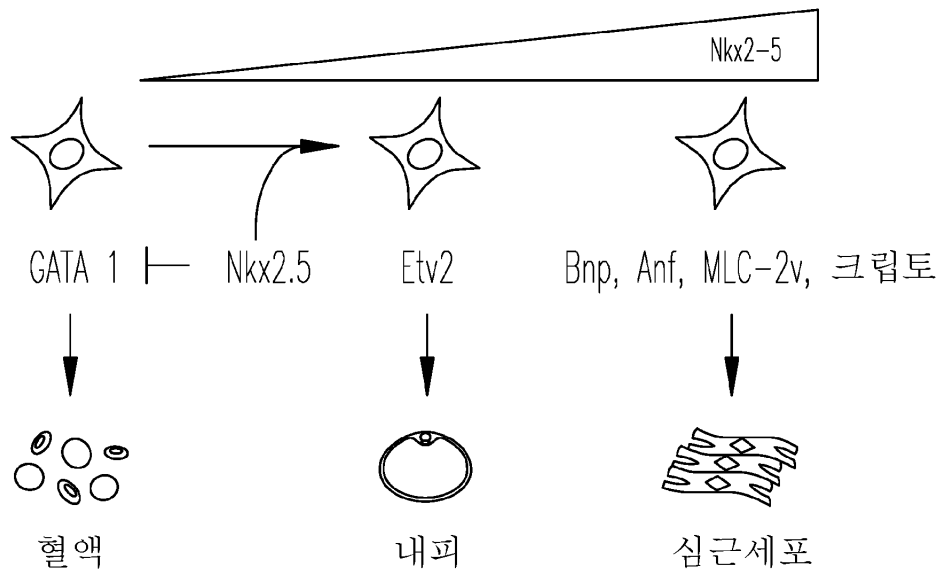
도면5d



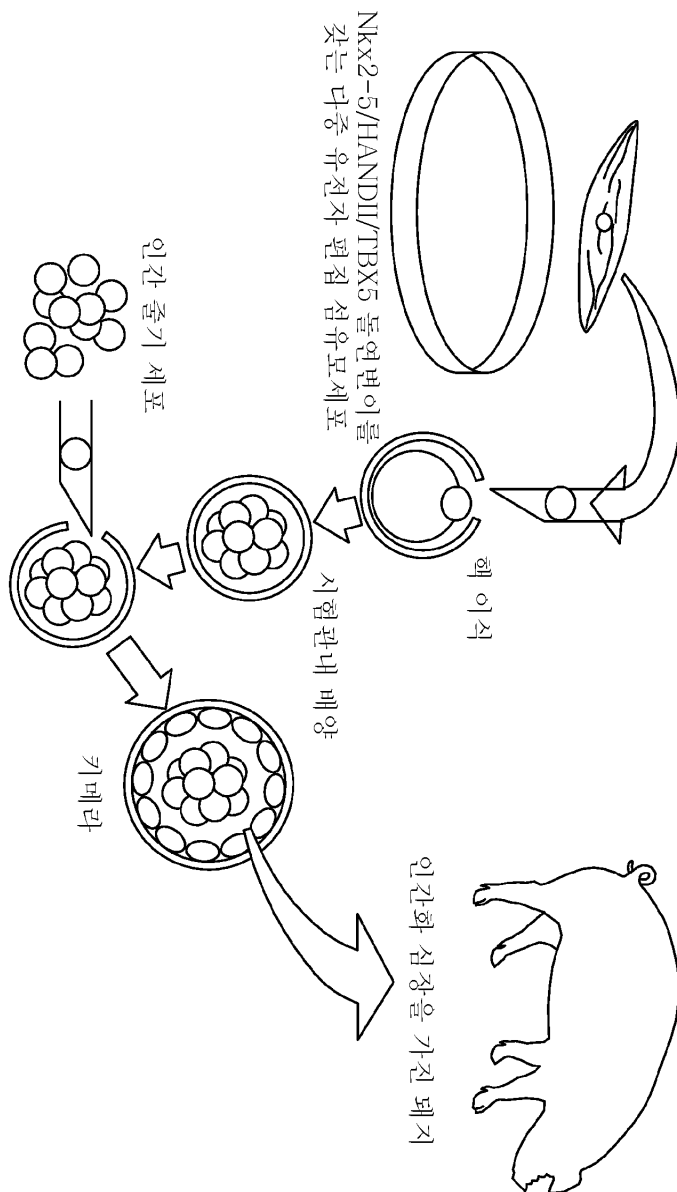
도면5e



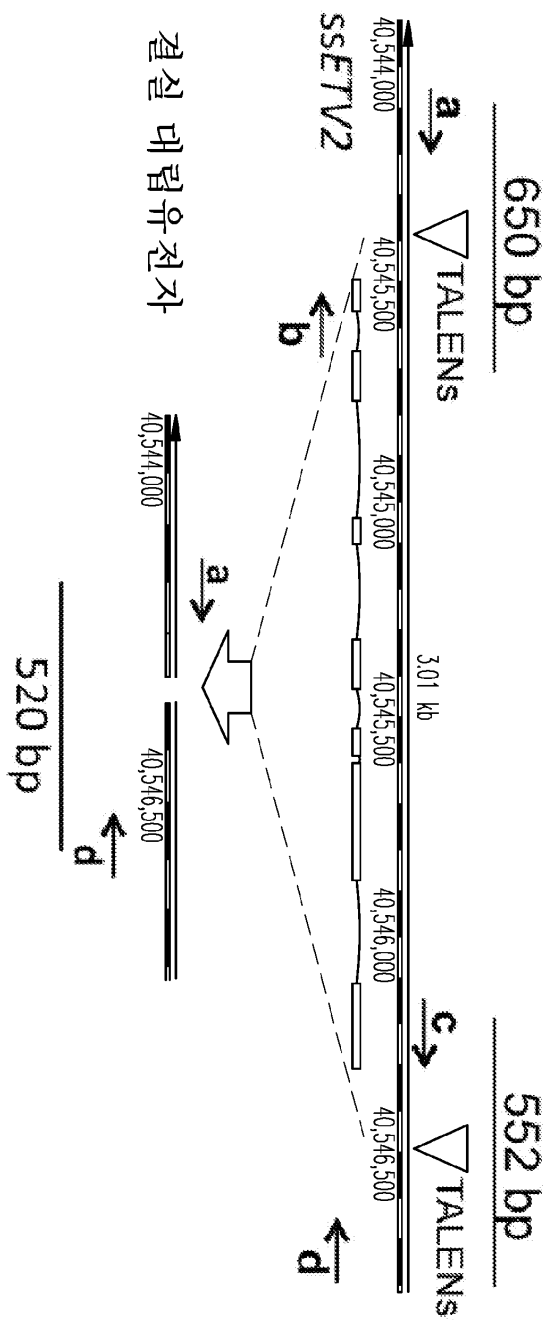
도면5f



도면6



도면7a



도면7b

	a-b	a-d	c-d
283	289	289	
291	291	291	
290	290	290	
302	302	302	
291	291	291	
303	303	303	
292	292	292	
304	304	304	
303	303	303	
298	298	298	
294	294	294	
296	296	296	
295	295	295	
297	297	297	
296	296	296	
308	308	308	
297	297	297	
309	309	309	
298	298	298	
310	310	310	
299	299	299	
311	311	311	
300	300	300	
312	312	312	
313	313	313	
325	325	325	
314	314	314	
328	328	328	
315	315	315	
327	327	327	
316	316	316	
328	328	328	
317	317	317	
329	329	329	
318	318	318	
330	330	330	
319	319	319	
331	331	331	
320	320	320	
332	332	332	
321	321	321	
333	333	333	
322	322	322	
334	334	334	
323	323	323	
335	335	335	
324	324	324	
336	336	336	

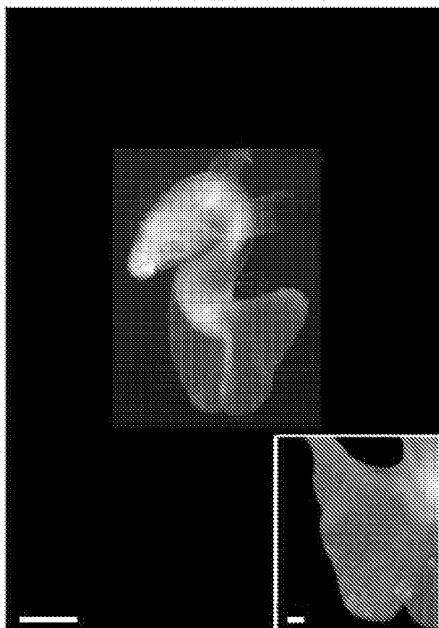
도면8a

E18 야생형

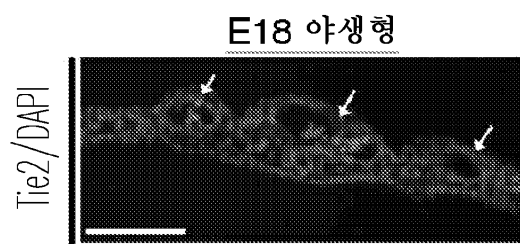


도면8b

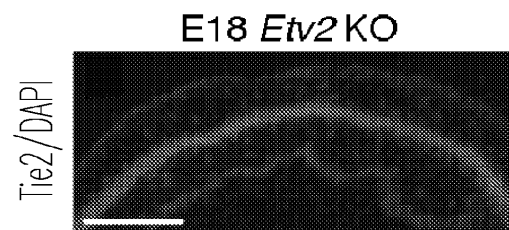
E18 *Etv2* KO



도면8c

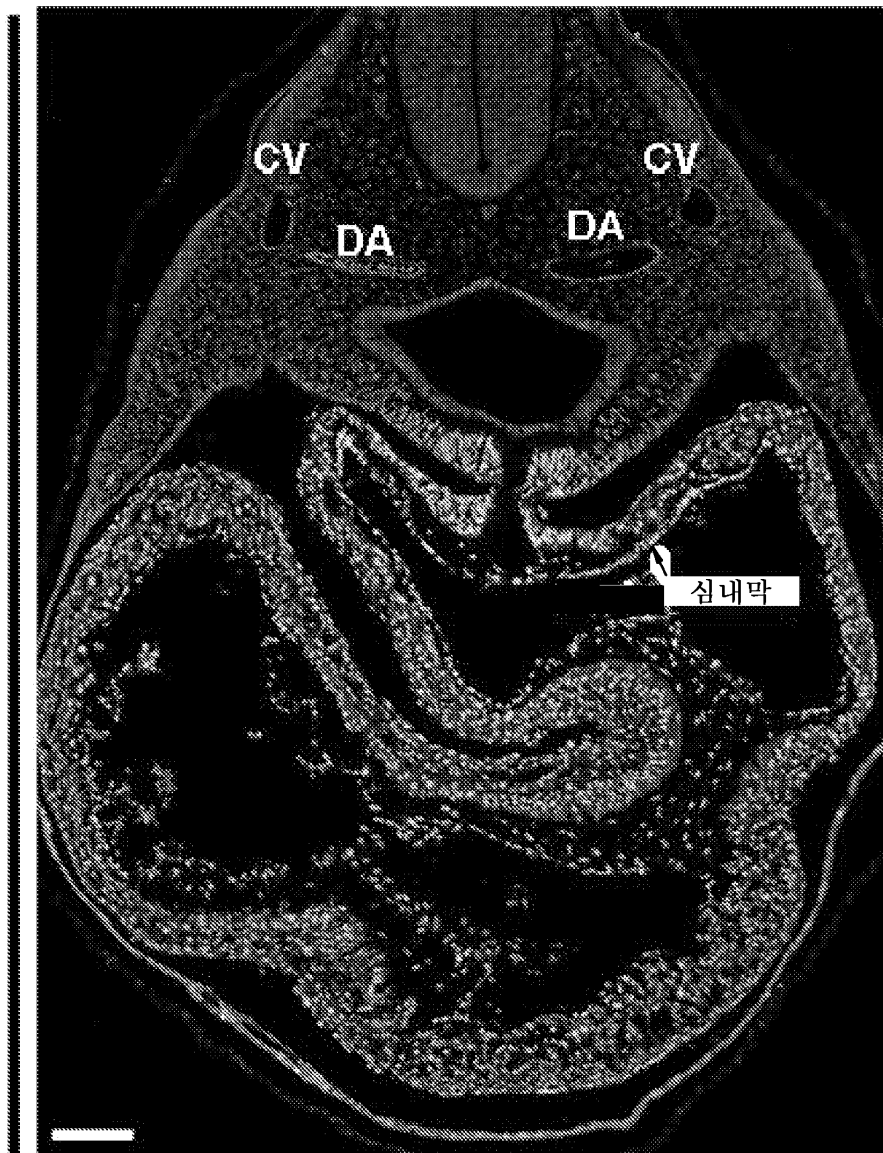


도면8d



도면8e

Tie2/GATA4/DAPI

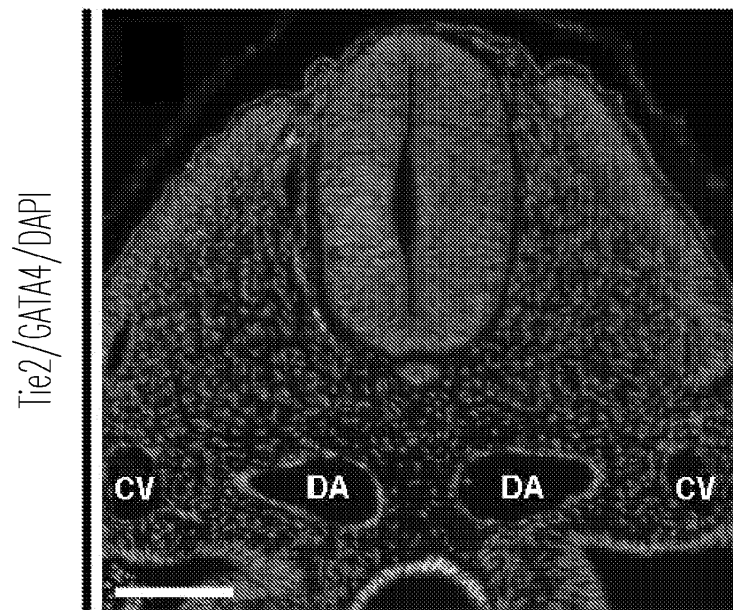


도면8f

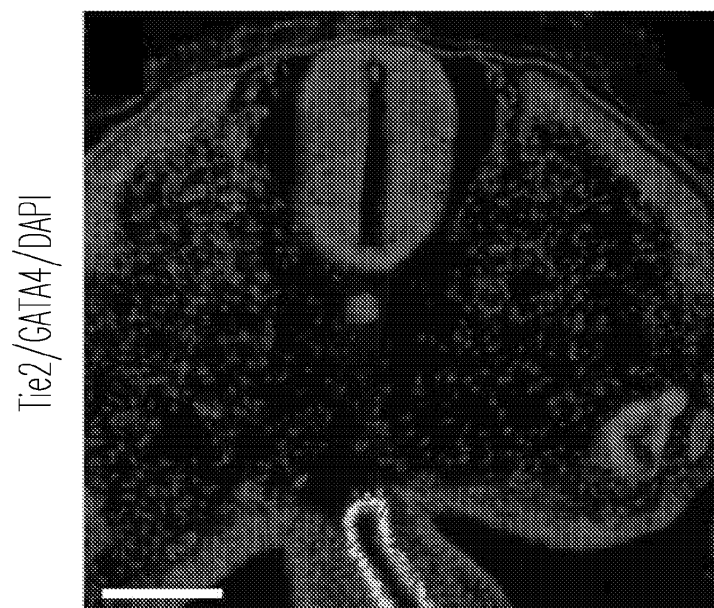
Tie2/CATA4/DAPI



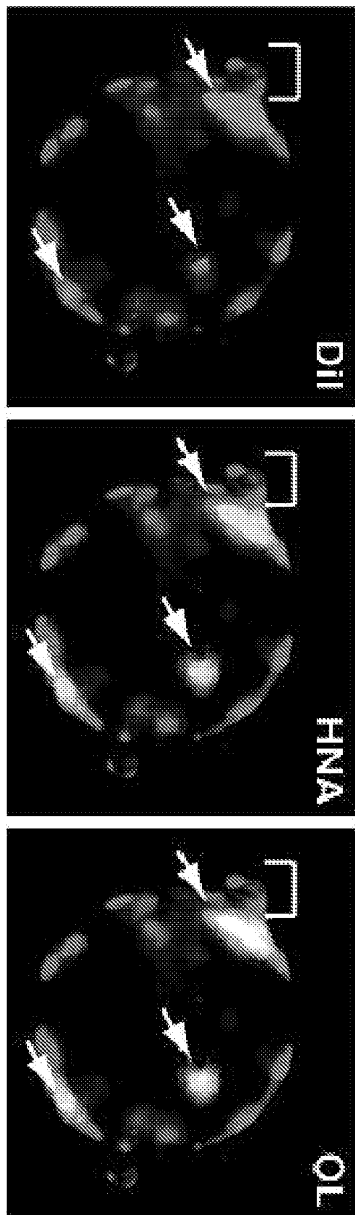
도면8g



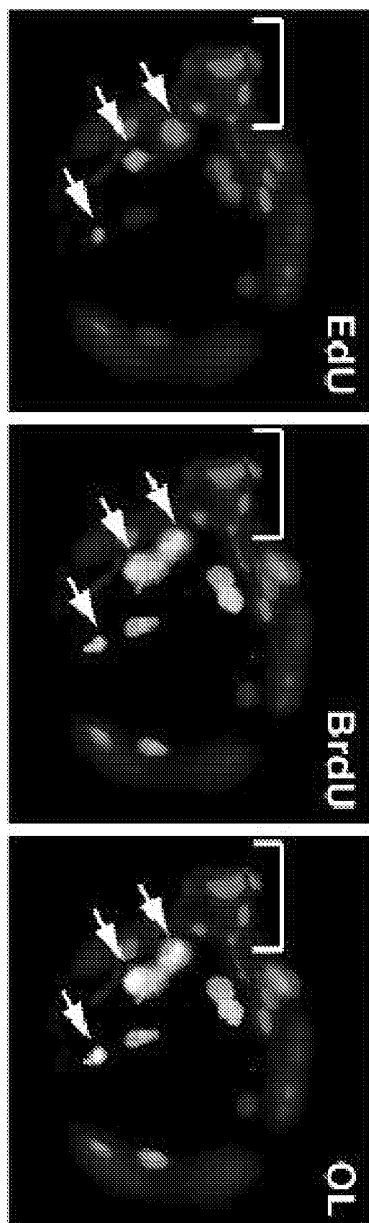
도면8h



도면9a



도면9b



서열 목록

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

<141> 2016-06-30

<150> US 62/187,040

<151> 2015-06-30

<160> 15

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 1725

<212> DNA

<213> *Sus scrofa*

<400> 1

gtccccctcc tccggcctgg tcccgcctct cctgccccctt gcgccccgca ttacctgccg 60

cctggccaca tcccagctg gaaggcgggt gcgcgggcgc gcagcgggca ccatgcaggg 120

aggctgccag ggaccgtggg cagcgccgct ctctgccgcc cacctggcgc tgtgagacgc 180

gcgctgccac catgttcccc agccccgcgc tcacgcccac gccgttctcg gtcaaagaca 240

tcttgaacct ggagcaacag cagcgcagcc tggccgccgg ggagctctcc gcgcgcttgg 300

aggccacctt ggccccgcgc tcttgcctgc tggccgcctt caagcccag gcctacgcgg 360

ggccggaggc cgcagcgccc ggcctctccg agctgcgcgc cgagctgggc cccgcgccct 420

caccagccaa gtgcgcgccc tctttctcag ccgccccgc cttctaccg cgtgcctatg 480

gcgacccga ccccgccaag gacctcgag ccgataagaa aggtgaggag gaaacacaag 540

cttcttctct gcctctctgt tccccccgc agagctgtgc gcgctgcaga aggcggtgga 600

gctggagaag ccagaggcgg acagcgccga gagacctcgg gcgcgacgac gaaggaagcc 660

gcgcgtgctc ttttcgagg cacaggtcta cgagctggag cgacgcttca agcagcagcg 720

gtacctgtcg gctcccgagc gtgaccagtt ggccagcgtg ctgaagctca cgtccacgca 780

ggtcaagatc tggttccaga accggcgcta caagtgaag cggcaacggc aggaccagac 840

tctggagcta gtggggctgc ccccgcccc gccgcgccg gcccgcagga tcgcggtgcc 900

agtgctggtg cgcatggca agccttgctt cggggactcc gcgcctacg cgccagccta 960

cggcgtgggc ctcaacgctt acggctataa cgcctacccc gcctaccgg gttacggtgg 1020

cgcgccctgc agccttggtt acagctgcac cgtgcgtac ccagccgggc cgccccggc 1080

gcagtcggct acggccgccg ccaataacaa cttcgtgaac ttcggcgtcg gggacttaaa 1140

cgcggtgcag agccccggga ttccgcaggg caactcggga gtgtccacgc tgcacggtat 1200

ccgagcctgg tagggaaggg gcctgtctgg ggcacctcta aagaggggca ctaactatcg 1260

gggagaggga gggctcccga tacgatcctg agtccctcag atgtcacatt gactcccacg 1320

gaggcctcgg agctttttcc gtccggtgcg cctttatccc cacgcgcggg agagttcgtg 1380

gcagaggtta cgcagcttgg ggtgagtgat cccgcagccc ggtgccttag ccgtcgcgcc 1440

gggagtgccc tccaagcgcc cacgggcac ccaatcggc tgacaccggc cagttgggac 1500

cgggagcccc agcccaggcg tgccaggctt aagatggggc cgcctttccc cgatcctggg 1560

cccggtgccc ggggcccctg ctgccttgcc gctgccctcc ccacaccgt atttatgttt 1620

ttacttgttt ctgtaagaaa tgagaatctc ctcccataa aagagagtgc gctgatccgc 1680

ctgtgtgctt ctttcagctt gctgtgcttc agaaactgaa atttt 1725

<210> 2

<211> 972

<212> DNA

<213> Sus scrofa

<400> 2

atgttcccca gcccgcgct cacgcccacg ccgttctcgg tcaaagacat ctgaaacctg 60

gagcaacagc agcgcagcct ggccgccggg gagctctccg cgcgcttgga ggccaccctg 120

gcgcccgcct cctgcatgct ggccgccttc aagcccagg cctacgcggg gccggaggcc 180

gcagcgcccc gcctctccga gctgcgcgcc gagctgggcc ccgcgccctc accagccaag 240

tgcgcgccct ctttctcagc cgccccgcc ttctaccgc gtgcctatgg cgaccccgac 300

ccgccaagg accctcgagc cgataagaaa gagctgtgcg cgctgcagaa ggcggtggag 360

ctggagaagc cagaggcgga cagcgccgag agacctcggg cgcgacgacg aaggaagccg 420

cgcgtgctct tttcgaggc acaggtctac gagctggagc gacgcttcaa gcagcagcgg 480

tacctgtcgg ctcccgagcg tgaccagttg gccagcgtgc tgaagctcac gtccacgcag 540

gtcaagatct ggttccagaa ccggcgctac aagtgcagc ggcaacggca ggaccagact 600

ctggagctag tggggctgcc cccgccccg ccgccgccg cccgcaggat cgcggtgcca 660

gtgctggtgc gcgatggcaa gccttgccctc ggggactccg cgcctacgc gccagcctac 720

ggcgtgggcc tcaacgccta cggtataac gcctacccg cctacccggg ttacggtggc 780

gcggcctgca gccctggcta cagctgcacc gctgcgtacc cagccgggcc gccccggcg 840

cagtcggcta cggccgccgc caataacaac ttctgaact tcggcgtcgg ggacttaaac 900

gcggtgcaga gcccggggat tccgcagggc aactcgggag tgtccacgt gcacggtatc 960

cgagcctggt ag 972

<210> 3

<211> 323

<212> PRT

<213> Sus scrofa

<400> 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 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 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 Gly Ala Ala Cys Ser Pro Gly Tyr Ser Cys Thr Ala Ala
260 265 270

Tyr Pro Ala Gly Pro 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 tgctgggaaa atccgcttgc tcccctcacg gcgtccagtc ccggagaaca	60
gccgccgccg ccgtcaccca ggagccccc cggccgctgc gcaacagccc tccaagcccc	120
agccgccgcc ttgcgggagc acgagaggag agcggaacac gttactcgct gctaaagtca	180
cattccagga ccaaaacaac aacaacaaa aatttcatta aaacaataag cgccaagaa	240
cccagatcag gctgggttggg ggaagagatc ggccaccccg agatgtcgcc ccccgactac	300
agcatggccc tgtcctacag tccggagtac gccagcgggtg ccgccagcct ggaccactcc	360
cattacgggg ggggtccgcc gggcgccggg cccccgggccc tgggggggccc gcgcccgggtg	420
aagcgccggg gcacagccaa ccgcaaggag cggcgcagga ctcagagcat caacagcgcc	480
ttgcgggagc tgcgcgagtg tatccccaat gtccccgcg acacaaaact ctccaagatc	540
aagacgctgc gcctggccac cagctacatc gcctacctca tggacctgct ggccaaggac	600
gaccagaacg gcgaggcgga ggcctttaag gcggaaatca agaagacaga tgtgaaagaa	660
gagaaaaagga agaaggagct gaatgaaatc ttgaaaagca cagtgcagcag caacgacaag	720
aaaaccaaag gccggacggg ctggccgcag catgtctggg cctggagct caagcagtga	780

ggtggagaaa gaggaggtgg aggtggtgga agaggaggag gagagcgca gccaggccct 840
 ggagccggat gcagaccag gactccgggg cgagctctgc gcactccgct ctgaggactt 900
 cctgcatttg gatcatccgg tttatttatg tgcaatgtgc ctcctctctt ttgccccct 960
 ttgaggcatc cgctccccac caccctcc aaaaaagtgg atatttgaag aaaagcattc 1020
 catattttaa tatgaagagg acactccgc gtgtaaggg atcccgctgt cgtctttag 1080
 attctctgtt tgtgaatgtt tcctcttggc tgtgtagaca ccagcgttgc tccctccca 1140

cctatccagc cccttacaga taaagacagc tgataatagt gtatttgtga agtgtatctt 1200
 taatactgg cctttggata taaatattcc tggggattat aaagttttat ttcaaagcag 1260
 aaaacggggc cgtaacatt tccgttgggg tcggtatcta gtgctgccgt ttcattcttg 1320
 tggttcccta ttgaagatg tttcaacag ctcttgttt tgtgcacttc cgtcctctaa 1380
 aactaagtg aatttaatta atattgaagg tgtaacgtt gtaagtaac aataaaccac 1440
 tgtgtgtttt tttttttt 1458

<210> 5

<211> 259

<212> PRT

<213> Sus scrofa

<400

> 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 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 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 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 tcaactcgag ctccaggcgg ggtggcctcc tccatcctcc accccctcaa	60
cccctgcacc gggtacagag ctctcttctg gcaagtttct ccccgagaga gaagaggaag	120
ggagagcagg acccagagcg gtcacagggc cctgggctca ccatggccga cggagacgag	180
ggctttggcc tggtcacac acccctggaa ccagattcaa aggatctacc ctgtgactca	240
aaacccgaga gtgggctagg ggccccagc aagtccccgt cgtccccga ggccgccttc	300
accagcagg gcatggaagg gatcaagggtg tttctccatg aaagagaact gtggctgaaa	360
tttcacgaag tgggcacaga aatgatcata accaaggctg gcaggcggat gtttccagt	420
tacaaagtga aggtgactgg ccttaatccc aaaaccaagt acattctcct tatggacatc	480
gttctgccc atgaccacag atacaagttc gccgataata aatggtctgt gacaggcaaa	540
gcggagcctg ccatgccggg ccgcctctac gtgcaccggg actcgccggc cactggagcg	600
cattggatgc ggcagctcgt ctcttccag aaactcaagc tcaccaacaa ccacctggac	660
ccgtttgggc acattattct aaattccatg cacaaatacc agcccagatt acacatcgtg	720
aaagcggacg aaaataatgg atttggtcga aaaaatactg cattctgtac ccacgtcttt	780

cctgagacag cgtttattgc agtgacttcc taccagaacc acaagatcac ccaattaaag 840
atcgagaata atccctttgc caaaggattc cggggcagcg atgacatgga actgcacagg 900
atgtcaagga tgcaaagtaa agaatatccc gtggttccca ggagcacagt gagacagaaa 960
gtggcctcca accacagtc cttcagcagt gagcctcgtg ctctctccac ctcattcaac 1020
ttgggggtccc agtatcagtg tgagaatggt gtgtccggcc cctcccagga cctcctgccc 1080
ccacctaaacc cgtaccact tccccaggag cacagccaaa ttaccattg caccaagagg 1140

aaagatgaag aatgttccac cacagagcat ccctataaga agccctacat ggagacgtca 1200
cccagtgagg aggaccctt ctaccgagcc ggctaccccc agcagcaggg tctgggtgcc 1260
tcctaccgga cagagtcagc ccagcggcag gctgcatgt acgccagctc cgcaccgccc 1320
agtgagccgg tgcccagcct ggaggacatt agctgcaaca cgtggcccag catgccttcc 1380
tacagcagct gcacagtcac caccgtgcag cccatggaca ggctacccta ccagcacttc 1440
tctgtcact tcacctggg gccctgtgtc ccccggtgtg ctggcatggc caaccacggc 1500
tccccgcagt tgggggaggg aatgttccag caccagacct ccgtggcca ccagcctgtg 1560

gtcaggcagt gtggcctca gactggcctc cagtccccgg gcagccttca agcgtccgag 1620
ttcctgtact ctcatggcgt gccaaaggacc ctgtccccgc atcagtacca ctctgtgtg 1680
cacggggtcg gcatggttcc agagtggagt gacaacagct aaagcgaggc ctgtccttc 1740
actgacgttt ccagagggag gggagagagg gagagagaca gtcgcagaga gaacccaag 1800
aacgagatgt cgcatttcac tccatgttca cgtctgcact tgagaagccc accctggaca 1860
ctgatgtaat cagtagcttg aaaccacaat tcaaaaaatg tgactttgtt ttgtctcaa 1920
acttaaaaaa tcgacaagag gcgatgagtc ccaaccccc ctacccgcc cccaccatcc 1980

accaccacca cagtcacaa ctggccacat tcacagacc tccagatgcc ctccgggatt 2040
ccttcttttg gtctccagaa agtcttgct catggagtgt tttatccaa aacatagatg 2100
gagtcattcc ctgtcttggg gttactgttg 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

<210> 9

<211> 519

<212> PRT

<213> *Sus scrofa*

<400> 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

225 230 235 240

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 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 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
 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 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 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 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 cgggcgggcg gcggcaccat gcagggaagc tgccaggggc cgtgggcagc 60

gccgctttct gccgccacc tggcgtgtg agactggcgc tgccaccatg ttccccagcc 120

ctgctctcac gccacgccc ttctcagtca aagacatcct aaacctggaa cagcagcagc 180

gcagcctggc tgccgccgga gagctctctg cccgcctgga ggcgaccctg gcgcctcct 240

cctgcatgct ggccgccttc aagccagagg cctacgtgg gcccgaggcg gctgcgccgg 300
 gcctcccaga gctgcgcga gagctgggcc gcgcgccttc accggccaag tgtgcgtctg 360
 cctttcccg cgcggccgctt tctatccac gtgcctacag cgaccccgac ccagccaagg 420
 accctagagc cgaagaagaa gagctgtgcg cgtgcagaa ggcggtggag ctggagaaga 480

 cagaggcgga caacgcggag cggccccggg cgcgacggcg gaggaagccg cgcgtgctct 540
 tctcgaggc gcaggtctat gagctggagc ggcgcttcaa gcagcagcgg tacctgtcgg 600
 cccccgaac cgaccagctg gccagcgtgc tgaactcac gtccacgcag gtcaagatct 660
 ggttccagaa cggcgctac aagtcaagc ggacgcggca ggaccagact ctggagctgg 720
 tggggtgccc cccgcccgcg ccgcccctg cccgcaggat cgcggtgcca gtgctggtgc 780
 gcgatggcaa gccatgccta ggggactcgg cgcctacgc gcctgcctac ggcggtggcc 840
 tcaatcccta cggttataac gcctaccccg cctatccggg ttacggcggc gcggcctgca 900

 gccctggcta cagctgact gccgcttacc cgcggggcc tccccagcg cagccggcca 960
 ctgccccgc caacaacaac ttcgtgaact tcggcgtcgg ggacttgaat gcggttcaga 1020
 gccccgggat tccgcagagc aactcgggag tgtccacgt gcatggatc cgagcctggt 1080
 aggggaaggga cccgcgtggc gcgacctga ccgatccac ctcaacagct cctgactct 1140
 cggggggaga aggggtccc aacatgacc tgagtccct ggattttgca ttcactcctg 1200
 cggagaccta ggaactttt ctgtcccac gcggtttgt cttgcgcac ggagagtttg 1260
 tggcgcgat tatgcagcgt gcaatgagt atcctgcagc ctggtgtctt agctgtcccc 1320

 ccaggagtgc cctccgagag tccatgggca cccccgttg gaactgggac tgagctcggg 1380
 cacgcagggc ctgagatctg gccgccatt ccgcagacca gggccggcg cccgggcctt 1440
 tgctatctcg ccgtcggccg cccacgcacc caccgtatt tatgtttta cctattgctg 1500
 taagaaatga cgatccctt cccattaaag agagtgcgtt gaaaaaaaa aaaaaaaaa 1560
 aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa 1620
 aaaaaaaaa aa 1632

 <210> 12
 <211> 2351
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <400> 12
 agctgtacat ggagatcttg ctgggaaaat ccgcttgctc ccctcacgtc gtccagccca 60
 ggagaaccac cgccgtcacc ccggagcttc ctggccacc gcgcagagcc ctccgagagc 120

ccgagccgcg gtcttcgagc tccaaggctc attcagggcc ccagatcctt gccccgaaag 180
 gagaggatct gagaaaaatg atgcactgag acctctctga aaacctccg agagagcgcg 240
 agaggagcga ggacacgtta ctgcgagcta aaatcacatt taaggaccaa aacaacaaca 300
 accaaaaatt tcattaaaac aataagcgcc caagaacca gatcgggctg gtggggggag 360
 gggaagaggc gggaagggga gggtcgcacg gaggtagctt tgcagtgagc agtcgacccc 420

 gccgcccccc ggacacagctg gaccggctcc tccagccgcg gctcagactc gcccctggat 480
 tccgggttag cticgggtgcc aggaccgcgg cccgggcttg gattcccag actccgcgta 540
 ccagcctcgc gggagccccg gcacctttgt atgagcacga gaggattctg cctccgcgca 600
 gcagcccgccg aagcaggagc cgaagcgccg gccgtggagc aaggcgggaa ccggaggcgg 660
 cggcgccggc gccaggggc gcacgggtgcc aggaccagct cgccgcgccc catggggagc 720
 cggcgccgcg agcgtctgtg aggcggggccc ggctggccag gcggggggac gggggccggg 780
 ctgcagcagc cccctctcgc gctgccgggc gggccccggc gccgggggc tgggggtgg 840

 ggggtggggg aggacgccga gcgctgaggc agggggcccgg gccgaggcg cgccggggct 900
 gcgcgcagc tggggcgct ggaggggcgc ggagggcgaa atgagtctgg taggtggttt 960
 tccccaccac ccggtgggtg accacagggg ctaccggttt gccccgcgcg ccgccgcagc 1020
 tgccgccgc gccgccagcc gctgcagcca tggaggagaac ccctacttcc atggctggct 1080
 catcgccac ccgagatgt cgcccccg ctacagcatg gcctgtcct acagccccga 1140
 glatgccagc ggccgccgc gcctggacca ctccattac ggggggggtgc cgccggcgcc 1200
 cgggcccccg ggctggggg ggccgcgccc ggtgaagcgc cgaggcaccg ccaaccgcaa 1260

 ggagcggcgc aggactcaga gcatcaacag cgcttcgcc gaactgcgcg agtgcattcc 1320
 caacgtacc gccgacacca aactctcaa aatcaagacc ctgcgcctgg ccaccagcta 1380
 catcgctac ctcatggacc tgctggccaa ggacgaccag aatggcgagg cggaggcctt 1440
 caaggcagag atcaagaaga ccgacgtgaa agaggagaag aggaagaagg agctgaacga 1500
 aatcttgaag agcacagtga gcagcaacga caagaaaacc aaaggccgga cgggctggcc 1560
 gcagcacgtc tgggcccctg agctcaagca gtgaggagga ggagaaggag gaggaggaga 1620
 gcgcgagtga gcaggggcca aggcgccaga tgcagacca ggactccgga aaagccgtcc 1680

 gcgctccgct ctgaggactc cttgcatttg gaatcatccg gtttatttat gtgcaatttc 1740
 ctccccctct ctttgacccc ctttgaggca tctgctcccc gtctccccct ccaaaaaaaa 1800
 agtggatatt tgaagaaaag cattccatat ttaatacga agaggacact cccgtgtggt 1860
 aagggatccc gtcgtctcat agattctgtg tgcgtgaatg ttcctcttg gctgtgtaga 1920
 caccagcgtt gcccccgcc aacctactca acccttcca gataaagaca gtgggcacta 1980

gtgcgtttgt gaagtgtatc ttttaatactt ggccttttga tataaatatt cctgggtatt 2040
ataaagtttt atttcaaagc agaaaacagg gccgctaaca tttccgttgg ggtcggatc 2100

tagtgetatc cattcatctg tggtegttcc ctctttgaag atgtttccaa cagccacttg 2160
ttttgtgcac ttccgtcctc taaaactaaa tggaaattaa ttaatatga aggtgtaaac 2220
gttghtaagta ttcaataaac cactgtgttt tttttttaca aaaaccttaa tcttttaatg 2280
gctgatacct caaaagagtt ttgaaaacaa agctgttata cttgttttcg taatatattaa 2340
aatattcaga a 2351

<210> 13

<211> 217

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 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 Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala 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 Glu Ala Glu Ala Phe Lys Ala Glu Ile Lys Lys Thr Asp Val
 165 170 175
 Lys Glu Glu Lys Arg Lys 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

<210> 14

<211> 3748

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 14

ttcagagaga gagagagagg gagagagagt gagagagact gactcttacc tcgaatccgg	60
gaactttaat cctgaaagct gcgctcagaa aggacttcga ccattcactg ggcttccaac	120
tttccctccc tgggggtgta aaggaggagc ggggcactga gattatatgg ttgccggtgc	180
tcttggaggc tatttttgtt tctttggcgc ttgccaaactg ggaagtatgt agggagagca	240
agcgcacagc agaggaggtg tgtgttggag gtgggcagtc gccgcggagg ctccagcggg	300
aggtgcgccc tagtaggcag cagtagccgc tattctgggt aagcagtaaa ccccgcataa	360
accccgagc caccatgcct gctccccgc ctcaccgccg gcttccctgc taggagcagc	420
agaggatgtg gtgaatgcac cggttcacc gaacgagagc agaaccttgc gcgggcacag	480
ggccctgggc gcacatggc gcacgcagac gagggctttg gcctggcgca cacgcctctg	540
gagcctgacg caaaagacct gccctgcgat tcgaaaccg agagcgcgct cggggccccc	600
agcaagtccc cgtcgtcccc gcaggccgcc ttcaccagc agggcatgga gggaatcaaa	660
gtgtttctcc atgaaagaga actgtggcta aaattccacg aagtgggcac ggaaatgatc	720
ataaccaagg ctggaaggcg gatgtttccc agttacaaag tgaaggtgac gggccttaat	780
cccaaaacga agtacattct tctcatggac attgtacctg ccgacgatca cagatacaaa	840
ttcgagata ataatggtc tgtgacgggc aaagctgagc ccgccatgcc tggccgcctg	900
tacgtgcacc cagactcccc gcgcaccggg gcgcattgga tgaggcagct cgtctccttc	960
cagaaactca agctcacaa caaccacctg gacccatttg ggcatattat tctaaattcc	1020
atgcacaaat accagcctag attacacatc gtgaaagcgg atgaaaataa tggatttggc	1080

tcaaaaaata cagcgttctg cactcacgtc tttcctgaga ctgcgtttat agcagtgact	1140
tcctaccaga accacaagat cagcaatta aagattgaga ataatccctt tgccaaagga	1200
tttcggggca gtgatgacat ggagctgcac agaattgtcaa gaatgcaaag taaagaatat	1260
cccggtgtcc ccaggagcac cgtgaggcaa aaagtggcct ccaaccacag tcctttcagc	1320
agcgagtctc gagctctctc cacctcatcc aatttggggt cccaatacca gtgtgagaat	1380
ggtgtttccg gccctccca ggacctcctg cctccacca acccataccc actgccccag	1440
gagcatagcc aaatttacca ttgtaccaag aggaaagagg aagaatgttc caccacagac	1500
catcctata agaagcccta catggagaca tcaccagtg aagaagattc cttctaccgc	1560
tctagctatc cacagcagca gggcctgggt gcctcctaca ggacagagtc ggcacagcgg	1620
caagcttgca tgtatgccag ctctgcgccc ccagcgcagc ctgtgccag cctagaggac	1680
atcagctgca acacgtggcc aagcatgcct tcctacagca gctgcaccgt caccaccgtg	1740
cagcccatgg acaggctacc ctaccagcac ttctccgctc acttcacctc ggggccctg	1800
gtccctcggc tggttgcat ggccaacat ggctccccac agctgggaga gggaatgttc	1860
cagcaccaga cctccgtggc ccaccagcct gtggtcaggc agtgtgggcc tcagactggc	1920
ctgcagtccc ctggcacctc tcagccccct gagttcctct actctcatgg cgtgccaagg	1980
actctatccc ctcatcagta ccactctgtg cacggagtgt gcatggtgcc agagtggagc	2040
gacaatagct aaagtgaggc ctgcttcaca acagacattt cctagagaaa gagagagaga	2100
gaggagaaag agagagaagg agagagacag tagccaagag aacccacag acaagatttt	2160
tcatttcacc caatgttcac atctgcactc aaggctcgtg gatgctgac taatcagtag	2220
cttgaaacca caattttaaa aatgtgactt tctgttttg tctcaaaact taaaaaaca	2280
aacacaaaaa gatgagtccc acccccact accaccacac ccatcaacca gccacattca	2340
cgctactccc cagatctctt ccccattcc ttcttttggg ctctagaaag tcttgccctca	2400
ttgagtgttt ttccctagtg cgtagtggga gtctgtccct gtcttggtgt taatgttgac	2460
attgttatat aataaatgat aatatattt tttctttcaa tttcttaat gggaccagct	2520
cccttatattg gggggaggtc tgaggcaagt atatttcaaa atatgtactt gcgggattcc	2580
cttcaagtaa accatccctg aaacctaaat tcacgtttcc ccttgactaa gaaaagcacc	2640
tacctctgcc atgtgatgtt tctgaaaagc ctctgtatgt cccatttgc ttgtgtttg	2700
tcctgccttc tccaatatca cgtgtcagc tttgcctcta cttacccatg gagtccagat	2760
aacactgacg ctccctggca tcttatctta ctacgcccta ccatcttgcc agctctgtct	2820

ttccagctgt ctgtcgctaa aacgtggcct atagcttccc ttccggaaag ctgtctttga 2880

aaaacttaaa aagccccctg ttacatgtag gcaggactgt gataacagtg caagctctgt 2940

gttgacaaga gttgtggaca aaaagccaaa ataatatttc ttctgatta aaaaaatit 3000

ttttgaaaa aacaaggcca gcccacact tccaaacctc catcaccaac aaccctaaact 3060

ggatgtcaag caaatgcac aattcctaca gaagaggcaa gacacagtca ccaatgatat 3120

ctcgccaaag aaaccacgcc cacaccaatg ccgacacaaa actgtgttta ctgaaagccg 3180

aaaacagtat taaaaaagt gtgtaagtaa agtgttatgg tagggttctt cagatgtaat 3240

atittactgg tactatttat ttataaatag gaattctaata taagtaataa catgaaatga 3300

aaccagcat aggagctggc caagagcttt taattttatt gatactcaa accaagtttg 3360

tgtttttttg ttttttttg ttttttctt ctttcgaatg tgctttgctt tttttgatta 3420

aaaagaatit ttttttctt ttttataaac agaccctaata aaagagaaca gggtaagatg 3480

tgaggctgag tgtgtttaag tacgtgagag agtgtgagtg tgtttgtaag tgagtgtccc 3540

tatgcgatta tgtctcttta cgttgctaag gggggagggt gaggattaag tactcgtgcc 3600

ttatatitgt gtgccaatta atgcctaata aataccatgt gcttaacaa gtaaaaaaaaa 3660

aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 3720

aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 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 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