

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 716 735**

51 Int. Cl.:

A01K 67/027 (2006.01)

C07K 14/705 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

C12N 15/85 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.11.2015 PCT/US2015/062614**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.06.2016 WO16089692**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.11.2015 E 15813960 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.01.2019 EP 3086637**

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

30 Prioridad:

05.12.2014 US 201462087992 P

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

14.06.2019

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 716 735 T3

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

DESCRIPCIÓN

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

5 Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

Esta solicitud reivindica el beneficio de la solicitud de patente provisional de los Estados Unidos núm. 62/087,992, presentada el 05 de diciembre de 2014.

10 Listado de secuencias

Un listado de secuencias en el archivo de texto ASCII, denominado 32584_10108WO01_SequenceListing.txt de 96,0 KB y creado el 23 de noviembre de 2015, se presentó a la Oficina de Patentes y Marcas de los Estados Unidos por medio de EFS-Web.

15 Antecedentes de la invención

La terapia contra el cáncer puede dividirse en cuatro categorías principales: quimio/radioterapia, terapia hormonal, terapia dirigida, e inmunoterapia. Aunque en la investigación y el desarrollo de la medicina se ha dedicado un gran interés a la terapia dirigida y se han realizado avances significativos, el cáncer es aún un desafío importante para los pacientes y para el campo de la salud en todo el mundo. Este desafío importante se debe, en parte, a la capacidad de las células cancerosas de evadir los mecanismos de control de los sistemas inmunitarios innato y adaptativo, lo que es, parcialmente, el resultado de la inhibición de la eliminación fagocítica. Actualmente, no existe un sistema in vivo para determinar de manera óptima el potencial terapéutico de nuevas terapias contra el cáncer que se diseñan para activar la eliminación fagocítica de células cancerosas y determinar los aspectos moleculares de cómo las células cancerosas proporcionan señales inhibitorias a los macrófagos y las células fagocíticas. Un sistema de este tipo proporciona una fuente para ensayos en fagocitosis y funciones de macrófagos in vivo, e identificación de nuevas terapias contra el cáncer que se dirigen a proporcionar un ambiente antitumoral al promover señales profagocíticas al sistema inmunitario.

30 El documento WO2007/033221 se refiere a los métodos y composiciones para la inhibición de las respuestas inmunitarias. El documento WO2013/063556 se refiere a un IL-6 humanizado y receptor de IL-6.

35 Sumario

La presente invención se basa en el reconocimiento de que es conveniente diseñar animales no humanos para permitir sistemas mejorados para la identificación y el desarrollo de nuevas terapias contra el cáncer. La presente invención se basa también en el reconocimiento de que es conveniente diseñar animales no humanos que permitan un mejor injerto de células madre hematopoyéticas humanas. Además, la presente invención se basa también en el reconocimiento de que los animales no humanos que tienen un gen de CD47 humanizado y/o que de cualquier otra manera expresan, contienen, o producen un polipéptido de CD47 humano o humanizado son convenientes, por ejemplo para usar en la identificación y desarrollo de productos terapéuticos para el cáncer que superen la toxicidad sistémica asociada con el bloqueo de CD47 y superen la inhibición mediada por CD47, de la fagocitosis de células tumorales, y proporcionar un sistema in vivo más eficaz para el injerto de células madre hematopoyéticas humanas que proporcione un aumento en la homeostasis de un mayor número de tipos de células humanas.

50 La invención proporciona un roedor cuyo genoma comprende un gen de CD47 humanizado, en donde el gen de CD47 humanizado comprende el exón 1 de un gen de CD47 endógeno de roedor, los exones 2-7 de un gen de CD47 humano, y los exones corriente abajo del exón 7 del gen de CD47 endógeno de roedor, en donde el gen de CD47 humanizado se une operativamente a un promotor de CD47 endógeno de roedor.

55 La invención también proporciona una célula o tejido aislado de roedor cuyo genoma comprende un gen de CD47 humanizado, en donde el gen de CD47 humanizado comprende el exón 1 de un gen de CD47 endógeno de roedor, los exones 2-7 de un gen de CD47 humano, y los exones corriente abajo del exón 7 del gen de CD47 endógeno de roedor, en donde el gen de CD47 humanizado se une operativamente a un promotor de CD47 endógeno de roedor, y opcionalmente la célula o tejido de roedor es una célula de ratón o tejido de ratón, o una célula de rata o tejido de rata.

60 La invención proporciona adicionalmente un embrión de roedor generado a partir de la célula madre embrionaria de la invención.

65 La invención adicionalmente proporciona un método para proporcionar un roedor cuyo genoma comprende un gen de CD47 que codifica una porción extracelular de un polipéptido de CD47 humano unido a una porción intracelular de un polipéptido de CD47 endógeno, el método que comprende modificar el genoma de un roedor de manera que comprenda un gen de CD47 humanizado, en donde el gen de CD47 humanizado comprende el exón 1 de un gen de CD47 endógeno de roedor, los exones 2-7 de un gen de CD47 humano, y los exones corriente abajo del exón 7 del

gen de CD47 endógeno de roedor, en donde el gen de CD47 humanizado se une operativamente a un promotor de CD47 endógeno de roedor, se proporciona así dicho roedor.

La invención también proporciona un método para evaluar el injerto de células humanas, en donde dicho método comprende evaluar el injerto de células humanas en un roedor de la invención, en donde opcionalmente las células humanas son células madre hematopoyéticas.

La invención además proporciona un método para evaluar la eficacia terapéutica de un fármaco dirigido a células humanas, el método que comprende: administrar un candidato a fármaco a un roedor de la invención al cual una o más células humanas se han transplantado; y monitorear las células humanas en el roedor para determinar la eficacia terapéutica del candidato a fármaco.

Se describe en la presente un animal no humano que tiene un genoma que comprende un gen de CD47 que incluye material genético de dos especies diferentes (por ejemplo, un ser humano y uno no humano). El gen de CD47 de los animales no humanos como se describe en la presente descripción puede codificar un polipéptido de CD47 que contiene porciones humanas y no humanas, en donde las porciones humanas y no humanas se unen entre sí y forman un polipéptido de CD47 funcional.

Un animal no humano descrito en la presente puede comprender un gen de CD47 que comprende una porción endógena y una porción humana, en donde las porciones endógena y humana se unen operativamente a un promotor endógeno.

Una porción endógena puede comprender el exón 1 y los exones corriente abajo del exón 7 de un gen de CD47 endógeno. El exón 1 y los exones corriente abajo del exón 7 de un gen de CD47 endógeno pueden ser al menos 50 %, al menos 55 %, al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, o al menos 98 % idénticos al correspondiente exón 1 y los exones corriente abajo del exón 7 de un gen de CD47 de ratón que aparece en la Tabla 3. El exón 1 y los exones corriente abajo del exón 7 de un gen de CD47 endógeno pueden ser idénticos al correspondiente exón 1 y los exones corriente abajo del exón 7 de un gen de CD47 de ratón que aparece en la Tabla 3.

Una porción humana puede codificar los aminoácidos 16-292 de un polipéptido de CD47 humano. Una porción humana puede codificar los aminoácidos 19-292 de un polipéptido de CD47 humano. Una porción humana puede codificar los aminoácidos 19-141 de un polipéptido de CD47 humano. Una porción humana puede codificar los aminoácidos 19-127 de un polipéptido de CD47 humano. Una porción humana puede comprender los exones 2-7 de un gen de CD47 humano.

Los exones 2-7 de un gen de CD47 humano pueden ser al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, o al menos 98 % idéntico a los correspondientes exones 2-7 de un gen de CD47 humano que aparece en la Tabla 3. Los exones 2-7 de un gen de CD47 humano pueden ser idénticos a los correspondientes exones 2-7 de un gen de CD47 humano que aparece en la Tabla 3.

Un animal no humano descrito en la presente invención puede expresar un polipéptido de CD47 que comprende una porción extracelular de un polipéptido de CD47 humano y una porción intracelular de un polipéptido de CD47 endógeno. Un polipéptido de CD47 puede comprender una porción transmembrana de un polipéptido de CD47 humano. Un polipéptido de CD47 puede comprender una porción transmembrana de un polipéptido de CD47 no humano. Un polipéptido de CD47 puede traducirse en una célula de un animal no humano con un péptido señal no humano. Un péptido señal no humano puede ser un péptido señal de un roedor (por ejemplo, un ratón o una rata).

Un polipéptido de CD47 descrito en la presente descripción puede expresarse a partir de un gen de CD47 endógeno no humano.

Una porción intracelular de un polipéptido de CD47 endógeno puede comprender una cola intracitoplasmática que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 50 %, al menos 55 %, al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, o al menos 98 % idéntica a una cola intracitoplasmática de un polipéptido de CD47 de ratón que aparece en la Tabla 3. Una porción intracelular del polipéptido de CD47 endógeno puede comprender una cola intracitoplasmática que tiene una secuencia de aminoácidos que es idéntica a una cola intracitoplasmática de un polipéptido de CD47 de ratón que aparece en la Tabla 3.

Una porción extracelular de un polipéptido de CD47 humano puede comprender los aminoácidos correspondientes a los residuos 19-141 de un polipéptido de CD47 humano. Una porción extracelular de un polipéptido de CD47 humano puede comprender los aminoácidos correspondientes a los residuos 19-127 de un polipéptido de CD47 humano. La porción extracelular de un polipéptido de CD47 humano puede comprender una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, o al menos 98 % idéntica a una correspondiente secuencia de aminoácidos de una porción extracelular de un polipéptido de CD47 humano que aparece en la Tabla 3. Una porción extracelular de un polipéptido CD47 humano puede comprender una secuencia de aminoácidos que es

idéntica a una secuencia de aminoácidos correspondiente de una porción extracelular de un polipéptido de CD47 humano que aparece en la Tabla 3.

En la presente descripción se describe además un polipéptido de CD47 codificado por el gen CD47 de un animal no humano como se describe en el presente documento. Un polipéptido de CD47 codificado puede comprender una secuencia de aminoácidos que es al menos 50 %, al menos 55 %, al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, o al menos 98 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 17, sec. con núm. de ident.: 18, sec. con núm. de ident.: 19, o sec. con núm. de ident.: 20. Un polipéptido de CD47 codificado puede comprender una secuencia de aminoácidos que es idéntica a la sec. con núm. de ident.: 17, sec. con núm. de ident.: 18, sec. con núm. de ident.: 19, o sec. con núm. de ident.: 20.

Un gen de CD47 humanizado que comprende uno o más exones de un gen de CD47 no humano unido operativamente a uno o más exones de un gen de CD47 humano. Un gen de CD47 humanizado de la presente invención comprende exones no humanos que codifican una porción intracelular de un polipéptido de CD47 y exones humanos que codifican una porción extracelular de un polipéptido de CD47 humano. Un gen de CD47 humanizado puede comprender además exones humanos que codifican una porción transmembrana de un polipéptido de CD47 humano. Un gen de CD47 humanizado de la presente invención comprende exones no humanos que codifican un péptido señal, en su totalidad o en parte, y una porción intracelular de un polipéptido de CD47, y exones humanos que codifican una porción extracelular y opcionalmente una porción transmembrana de un polipéptido de CD47.

En la presente se describe además una célula o tejido aislado a partir de un animal no humano como se describe en la presente. Se describe una célula o tejido aislado que comprende un gen de CD47 como se describe en la presente descripción. Una célula puede seleccionarse de una célula dendrítica, un linfocito (por ejemplo, una célula B o T), un macrófago y un monocito. Un tejido puede seleccionarse de tejido adiposo, vejiga, cerebro, mama, médula ósea, ojo, corazón, intestino, riñón, hígado, pulmón, ganglio linfático, músculo, páncreas, plasma, suero, piel, bazo, estómago, timo, testículo, ovario, y una combinación de estos.

En la presente descripción se describe además una célula madre embrionaria no humana cuyo genoma comprende un gen de CD47 como se describe en el presente documento. Una célula madre embrionaria no humana puede ser una célula madre embrionaria de ratón y es de una cepa 129, una cepa C57BL/6 o una cepa BALB/c. Una célula madre embrionaria no humana puede ser una célula madre embrionaria de ratón y es de una mezcla de las cepas 129 y C57BL/6.

En la presente se describe además el uso de una célula madre embrionaria no humana como se describe en la presente para producir un animal no humano. Una célula madre embrionaria no humana puede ser una célula madre embrionaria de ratón y puede usarse para producir un ratón que comprende un gen de CD47 como se describe en la presente descripción. Una célula madre embrionaria no humana puede ser una célula madre embrionaria de rata y puede usarse para producir una rata que comprende un gen de CD47 como se describe en la presente descripción.

En la presente descripción se describe además un embrión no humano que comprende, se produce, se obtiene, o se genera a partir de una célula madre embrionaria no humana que comprende un gen de CD47 como se describe en el presente documento. Un embrión no humano puede ser un embrión de roedor. Un embrión de roedor puede ser un embrión de ratón. Un embrión de roedor puede ser un embrión de rata.

Se describe además en la presente un método para producir un animal no humano que expresa un polipéptido de CD47 a partir de un gen de CD47 endógeno, en donde el polipéptido de CD47 comprende una secuencia humana, el método comprende insertar un fragmento genómico en un gen de CD47 endógeno en una célula madre embrionaria no humana, dicho fragmento genómico comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de CD47 humano en su totalidad o en parte; obtener una célula madre embrionaria no humana que comprende un gen de CD47 endógeno que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de CD47 humano en su totalidad o en parte; y crear un animal no humano mediante el uso de la célula madre embrionaria no humana que comprende dicha secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de CD47 humano en su totalidad o en parte.

Una secuencia humana puede comprender los aminoácidos correspondientes a los residuos 19-141 (o 19-292) de un polipéptido de CD47 humano. Una secuencia humana puede comprender los aminoácidos correspondientes a los residuos 19-127 de un polipéptido de CD47 humano.

Una secuencia de nucleótidos puede comprender los exones 2-7 de un gen de CD47 humano. Una secuencia de nucleótidos puede comprender uno o más marcadores de selección. Una secuencia de nucleótidos puede comprender uno o más sitios de recombinación sitio específico.

El método puede comprender además una etapa de insertar un fragmento genómico en un gen de SIRPα endógeno de una célula madre embrionaria no humana, dicho fragmento genómico comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de SIRPα humano en su totalidad o en parte (por ejemplo, codifica una porción extracelular de un polipéptido de SIRPα humano). Un fragmento genómico puede comprender una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de SIRPα humano en su totalidad o en parte (por ejemplo, codifica una porción extracelular de

un polipéptido de SIRP α humano) se inserta en un gen de SIRP α endógeno de la célula madre embrionaria no humana antes de una inserción en un gen de CD47 endógeno.

El método comprende además cruzar un animal no humano que comprende un gen de CD47 endógeno que incluye una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de CD47 humano, en su totalidad o en parte, con un segundo animal no humano, dicho segundo animal no humano tiene un genoma que comprende un gen de SIRP α que codifica un polipéptido de SIRP α que comprende una porción extracelular de un polipéptido de SIRP α humano (por ejemplo, los aminoácidos correspondientes a los residuos 28-362 de un polipéptido de SIRP α humano) y una porción intracelular de un polipéptido de SIRP α endógeno.

Se describe además en la presente un método para proporcionar un animal no humano cuyo genoma comprende un gen de CD47 que codifica una porción extracelular de un polipéptido de CD47 humano unido a una porción intracelular de un polipéptido de CD47 endógeno, el método comprende modificar el genoma de un animal no humano de manera que comprenda un gen de CD47 que codifica la porción extracelular de un polipéptido de CD47 humano unido a la porción intracelular de un polipéptido de CD47 endógeno para proporcionar de esta manera dicho animal no humano. Un gen de CD47 puede codificar un polipéptido de CD47 que comprende una porción extracelular y una porción transmembrana de un polipéptido de CD47 humano unido a una porción intracelular de un polipéptido de CD47 endógeno no humano. Un gen de CD47 puede codificar un polipéptido de CD47 que comprende una porción extracelular y una porción transmembrana de un polipéptido de CD47 humano unido a una porción intracelular de un polipéptido de CD47 endógeno no humano.

La modificación del genoma de un animal no humano puede realizarse en una célula madre embrionaria no humana. La célula madre embrionaria no humana puede ser una célula madre embrionaria de roedor; una célula madre embrionaria de ratón; o una célula madre embrionaria de rata.

El método puede comprender además modificar el genoma del animal no humano de manera que comprenda un gen de SIRP α que codifica la porción extracelular de un polipéptido de SIRP α humano (por ejemplo, los aminoácidos correspondientes a los residuos 28-362 de un polipéptido SIRP α humano) unido a la porción intracelular de un polipéptido SIRP α endógeno. La modificación del genoma del animal no humano de manera que comprenda un gen de SIRP α que codifica la porción extracelular de un polipéptido de SIRP α humano (por ejemplo, los aminoácidos correspondientes a los residuos 28-362 de un polipéptido de SIRP α humano) unida a la porción intracelular de un polipéptido de SIRP α endógeno, puede realizarse antes de modificar el genoma del animal no humano de manera que comprenda un gen de CD47 que codifica la porción extracelular y opcionalmente una porción transmembrana de un polipéptido de CD47 humano unida a la porción intracelular de un polipéptido de CD47 endógeno.

El método puede comprender además cruzar un animal no humano cuyo genoma comprende un gen de CD47 que codifica una porción extracelular de un polipéptido de CD47 humano unida a una porción intracelular de un polipéptido de CD47 endógeno con un segundo animal no humano, dicho segundo animal no humano tiene un genoma que comprende un gen de SIRP α que codifica un polipéptido de SIRP α que comprende una porción extracelular de un polipéptido de SIRP α humano (por ejemplo, los aminoácidos correspondientes a los residuos 28-362 de un polipéptido de SIRP α humano) y una porción intracelular de un polipéptido de SIRP α endógeno.

En la presente descripción se describe además un animal no humano que puede obtenerse por los métodos según se describen en el presente documento.

Se describe además en la presente un método para injertar células humanas en un animal no humano, el método comprende las etapas de proporcionar un animal no humano cuyo genoma comprende un gen de CD47 que codifica la porción extracelular de un polipéptido de CD47 humano unida a la porción intracelular de un polipéptido de CD47 endógeno; y trasplantar una o más células humanas en dicho animal no humano. El método puede comprender además una etapa de ensayar el injerto de una o más células humanas en dicho animal no humano. Una etapa de ensayo puede comprender comparar el injerto de una o más células humanas con el injerto en uno o más animales no humanos de tipo silvestre o en uno o más animales no humanos cuyo genoma no comprende un gen de CD47 que codifica la porción extracelular de un polipéptido de CD47 humano unida a la porción intracelular de un polipéptido de CD47 endógeno.

Las células humanas pueden ser células madre hematopoyéticas. Las células humanas pueden trasplantarse por vía intravenosa. Las células humanas pueden trasplantarse por vía intraperitoneal. Las células humanas pueden trasplantarse por vía subcutánea.

Se describe además en la presente un método para evaluar la eficacia terapéutica de un fármaco dirigido a células humanas, el método comprende proporcionar un animal no humano cuyo genoma comprende un gen de CD47 que codifica una porción extracelular de un polipéptido de CD47 humano unida a una porción intracelular de un polipéptido de CD47 endógeno; trasplantar una o más células humanas en dicho animal no humano; administrar un candidato a fármaco a dicho animal no humano; y controlar las células humanas en el animal no humano para determinar la eficacia terapéutica del candidato a fármaco.

Las células humanas pueden ser células cancerosas y el candidato a fármaco puede ser un candidato a fármaco anticanceroso. Un candidato a fármaco puede ser un anticuerpo.

5 Un animal no humano puede comprender además células inmunitarias humanas. Un candidato a fármaco puede ser un anticuerpo biespecífico que se une a CD47 humano y un antígeno en células cancerosas humanas trasplantadas.

10 Se describe además en la presente un método que comprende proporcionar una o más células cuyo genoma incluye un gen de CD47 que codifica una porción extracelular de un polipéptido de CD47 humano unida a una porción intracelular de un polipéptido de CD47 endógeno; incubar una o más células con un sustrato marcado; y medir la fagocitosis del sustrato marcado por las una o más células. El sustrato puede estar marcado fluorescentemente. El sustrato puede estar marcado con un anticuerpo. El sustrato puede ser uno o más glóbulos rojos. El sustrato puede ser una o más células bacterianas. El sustrato puede ser uno o más células tumorales.

15 Se describe además en la presente un método que comprende proporcionar un animal no humano cuyo genoma incluye un gen de CD47 que codifica una porción extracelular de un polipéptido de CD47 humano unida a una porción intracelular de un polipéptido de CD47 endógeno; exponer el animal no humano a un antígeno; y medir la fagocitosis del antígeno por una o más células del animal no humano. La etapa de exposición puede comprender exponer el animal no humano a un antígeno que se marca de manera fluorescente. La etapa de exposición puede comprender exponer el animal no humano a una o más células que comprenden el antígeno. La etapa de exposición puede comprender exponer el animal no humano a una o más células humanas que comprenden el antígeno o a una o más células bacterianas que comprenden el antígeno. La etapa de exposición puede comprender exponer el animal no humano a una o más células que se han transformado con el antígeno de manera que el antígeno se expresa en la superficie de una o más células transformadas. La etapa de exposición puede comprender exponer el animal no humano a una o más células tumorales que comprenden el antígeno.

25 Se describen además en la presente métodos para la identificación o validación de un fármaco o vacuna, el método comprende las etapas de suministrar un fármaco o vacuna a un animal no humano cuyo genoma incluye un gen de CD47 que codifica una porción extracelular de un polipéptido de CD47 humano unida a una porción intracelular de un polipéptido de CD47 endógeno, y controlar una o más de las respuestas inmunitarias al fármaco o vacuna, el perfil de seguridad del fármaco o vacuna, o el efecto sobre una enfermedad o afección. El control del perfil de seguridad puede incluir la determinación de si el animal no humano exhibe un efecto secundario o reacción adversa como resultado del suministro del fármaco o vacuna. Un efecto secundario o reacción adversa puede seleccionarse de morbilidad, mortalidad, alteración del peso corporal, alteración del nivel de una o más enzimas (por ejemplo, hepáticas), alteración en el peso de uno o más órganos, pérdida de función (por ejemplo, sensorial, motora, de órganos, etcétera), aumento de la susceptibilidad a una o más enfermedades, alteraciones al genoma del animal no humano, aumento o disminución del consumo de alimentos y complicaciones de una o más enfermedades.

30 En la presente se describe además el uso de un animal no humano como se describe en la presente en el desarrollo de un fármaco o vacuna para usar en medicina, tal como su uso como un medicamento.

40 Se describe además en la presente el uso de un animal no humano como se describe en la presente descripción en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un cáncer o una neoplasia.

45 En la presente descripción se describe además el uso de un animal no humano descrito en el presente documento para evaluar la eficacia de un fármaco terapéutico que se dirige a células humanas. Un animal no humano descrito en el presente documento puede trasplantarse con células humanas, y puede administrarse al animal un candidato a fármaco que se dirige a tales células humanas. La eficacia del fármaco puede determinarse mediante el control de las células humanas en el animal no humano después de la administración del fármaco.

50 Se describe además en la presente un animal o célula no humanos como se describe en la presente para usar en el desarrollo y/o identificación de un fármaco (por ejemplo, un anticuerpo) para terapia o diagnóstico.

55 Se describe además en la presente un animal o célula no humanos como se describe en la presente para usar en el desarrollo y/o la identificación de un fármaco (por ejemplo, un anticuerpo) para el tratamiento, la prevención o la mejoría de un cáncer o una neoplasia.

60 Se describe además en la presente un método para evaluar la farmacocinética de un fármaco dirigido a CD47 humano, el método comprende las etapas de administrar el fármaco a un animal no humano como se describe en la presente, y realizar un ensayo para determinar una o más propiedades farmacocinéticas del fármaco dirigido a CD47 humano.

65 Se describe además en la presente un método para evaluar la toxicidad por acción en el objetivo de un fármaco dirigido a CD47 humano, el método comprende las etapas de administrar el fármaco a un animal no humano como se describe en la presente, y realizar un ensayo para determinar uno o más parámetros asociados con la toxicidad por acción en el objetivo de un fármaco.

Se describe además en la presente un método para evaluar la toxicidad por acción fuera del objetivo de un fármaco dirigido a CD47 humano, el método comprende las etapas de administrar el fármaco a un animal no humano como se describe en la presente, y realizar un ensayo para determinar uno o más parámetros asociados con la toxicidad por acción fuera del objetivo de un fármaco.

5 Un animal no humano como se describe en la presente descripción puede ser un roedor cuyo genoma incluye un gen de CD47 que codifica una porción extracelular de un polipéptido de CD47 humano unida a una porción intracelular de un polipéptido de CD47 endógeno; un roedor puede ser un ratón; un roedor puede ser una rata.

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

15 Un gen de CD47 descrito en la presente descripción puede incluir un gen de CD47 como se describe en la presente descripción. Un polipéptido de CD47 descrito en la presente descripción puede incluir un polipéptido de CD47 como se describe en la presente descripción.

20 Un animal no humano descrito en la presente descripción puede no expresar de manera detectable un polipéptido de CD47 no humano endógeno de longitud completa. Un animal no humano descritos en el presente documento pueden no expresar de manera detectable una porción extracelular de un polipéptido CD47 endógeno. Un animal no humano descrito en la presente descripción puede no expresar de manera detectable una porción extracelular de un polipéptido CD47 endógeno y un polipéptido de SIRP α endógeno.

25 Una porción extracelular de un polipéptido de CD47 humano puede comprender los aminoácidos correspondientes a los residuos 19-127 de un polipéptido de CD47 humano, como se describe en la presente.

Un dominio V inmunoglobulínico N-terminal de un polipéptido de CD47 humano puede comprender los aminoácidos correspondientes a los residuos 19-127 de un polipéptido de CD47 humano como se describe en la presente.

30 Los animales no humanos, las células, los tejidos, las células madre embrionarias y/o los embriones de la presente invención tienen un genoma que comprende además un gen de SIRP α que codifica un polipéptido de SIRP α que comprende una porción extracelular de un polipéptido de SIRP α humano (por ejemplo, los aminoácidos correspondientes a los residuos 28-362 de un polipéptido de SIRP α humano) y una porción intracelular de un polipéptido de SIRP α endógeno.

35 Un animal no humano como se describe en la presente puede ser un roedor, un ratón o una rata.

40 Como se usa en esta solicitud, los términos "alrededor de" y "aproximadamente" se usan como equivalentes. Cualquier número usado en esta solicitud con o sin alrededor de/aproximadamente pretende abarcar cualquiera de las fluctuaciones normales apreciadas por un experto en la técnica en cuestión.

45 Otras características, objetos y ventajas descritas en la presente descripción se hacen evidentes en la descripción detallada que sigue. Debe entenderse, sin embargo, que la descripción detallada, si bien indica modalidades como se describe en la presente, se proporciona solamente a modo de ilustración, no de limitación. Diversos cambios y modificaciones dentro del alcance de la invención resultarán evidentes para los expertos en la técnica a partir de la descripción detallada.

Breve descripción de las figuras

50 El archivo de la patente o solicitud contiene al menos un dibujo a color. Copias de esta patente o solicitud de publicación de patente con dibujos(s) a color se proporcionarán por la Oficina y previa solicitud y pago de la cuota necesaria.

Los dibujos incluidos en la presente descripción, que se componen de las siguientes Figuras, son solamente con propósitos de ilustración y no de limitación.

55 La Figura 1 muestra un diagrama, que no está a escala, de la organización genómica de los genes del grupo de diferenciación 47 (CD47) no humano (por ejemplo, de ratón) y humano. Los exones se enumeran debajo de cada exón.

60 La Figura 2 muestra un diagrama, que no está a escala, de un método ilustrativo para la humanización de un gen del grupo de diferenciación 47 (CD47) no humano.

La Figura 3 muestra un diagrama, que no está a escala, de la organización genómica de los genes del grupo de diferenciación 47 (CD47) de ratón y humano. Se indican las ubicaciones de las sondas usadas en un ensayo descrito en el Ejemplo 1.

65

La Figura 4 muestra un histograma ilustrativo de la expresión de CD47 en glóbulos rojos de ratones con CD47 humanizado, que se detectó por anticuerpos anti-CD47. Ac A, Ac B, Ac C, Ac D y Ac E: anticuerpos anti-CD47; hIgG4s: IgG4 humana de especificidad irrelevante con la región Fc modificada que tiene reducción de la función efectora; hlgG4: anticuerpo IgG4 humano de especificidad irrelevante.

La Figura 5 muestra hemaglutinación ilustrativa de los glóbulos rojos de ratón a partir de ratones de tipo silvestre (n=2) y con CD47 humanizado (n=2) mediante anticuerpos anti-CD47. WT: de tipo silvestre; HuCD47: CD47 humanizado; Ac A, Ac B, Ac C, Ac D y Ac E: anticuerpos anti-CD47; hIgG4s: IgG4 humana de especificidad irrelevante con región Fc modificada que tiene reducción de la función efectora; hlgG4: anticuerpo IgG4 humano de especificidad irrelevante.

La Figura 6 muestra perfiles farmacocinéticos ilustrativos de anticuerpos anti-CD47 en ratones con CD47 humanizado representados como concentración de anticuerpos (en µg/ml, eje y) en el tiempo (en días, eje x); Ac F, Ac G, Ac H y Ac I: anticuerpos anti-CD47; hlgG4s: anticuerpo IgG4 humano de especificidad irrelevante con región Fc modificada que tiene reducción de la función efectora.

La Figura 7 muestra perfiles farmacocinéticos ilustrativos de anticuerpos anti-CD47 en ratones con CD47/SIRPα humanizados (CD47^{hu/hu}SIRPα^{hu/hu}) representados como concentración de anticuerpos (en mcg/ml, eje y) en el tiempo (en días, eje x). Ac J, Ac F, Ac G y Ac I: anticuerpos anti-CD47; hlgG4s: anticuerpo IgG4 humano de especificidad irrelevante con región Fc modificada que tiene reducción de la función efectora.

La Figura 8 muestra perfiles farmacocinéticos ilustrativos de anticuerpos anti-CD47 en ratones con CD47/SIRPα humanizados (CD47^{hu/hu}SIRPα^{hu/hu}) representados como concentración de anticuerpos (en mcg/ml, eje y) en el tiempo (en días, eje x). Ac J, Ac F: anticuerpos anti-CD47; Ac Fs: Ac F con región Fc modificada que tiene reducción de la función efectora; Ac Fmono: versión monovalente del Ac F; hlgG4s: anticuerpo IgG4 humano de especificidad irrelevante con región Fc modificada que tiene reducción de la función efectora.

La Figura 9 muestra perfiles farmacocinéticos ilustrativos de anticuerpos anti-CD47 en ratones de tipo silvestre representados como concentración de anticuerpos (en mcg/ml, eje y) en el tiempo (en días, eje x). Los ratones que demostraron respuesta de anticuerpos de ratón anti-humano (MAHA) se excluyeron. Ac J, Ac F, Ac I y Ac G: anticuerpos anti-CD47; hlgG4s: anticuerpo IgG4 humano de especificidad irrelevante con región Fc modificada que tiene reducción de la función efectora (estrella: todos los puntos después de 15 días se excluyeron del grupo de tratamiento con hlgG4s debido a MAHA); Ac J F(ab')₂: F(ab')₂ fragmento de Ac J.

Definiciones

Esta invención no se limita a los métodos y condiciones experimentales particulares descritas en la presente descripción, ya que estos métodos y condiciones pueden variar. Además, debe entenderse que la terminología usada en la presente descripción es solamente para el propósito de describir modalidades particulares, y no pretende ser limitante, dado que el alcance de la presente invención se define en las reivindicaciones.

A menos que se defina de cualquier otra manera, todos los términos y frases usados en la presente descripción incluyen los significados que se atribuyen a los términos y frases en la técnica, a menos que se indique claramente lo contrario o resulte claramente evidente a partir del contexto en el cual se usa el término o frase. Aunque cualquiera de los métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente descripción puede usarse en la práctica o prueba de la presente invención, a continuación se describirán métodos y materiales particulares.

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

El término "biológicamente activo" como se usa en la presente descripción se refiere a una característica de cualquier agente que tenga actividad en un sistema biológico, in vitro o in vivo (por ejemplo, en un organismo). Por ejemplo, un agente que, cuando está presente en un organismo, tiene un efecto biológico dentro de ese organismo, se considera biológicamente activo. En casos particulares, cuando una proteína o polipéptido es biológicamente activo, una porción de esa proteína o polipéptido que comparte al menos una actividad biológica de la proteína o polipéptido puede denominarse típicamente una porción "biológicamente activa".

El término "comparable", como se usa en la presente, se refiere a dos o más agentes, entidades, situaciones, conjuntos de condiciones, etcétera, que pueden no ser idénticos entre sí pero que son suficientemente similares para permitir la comparación entre ellos de manera que puedan obtenerse conclusiones de manera razonable en base a las diferencias o las similitudes observadas. Los expertos en la técnica comprenderán, en contexto, el grado de identidad necesario en cualquier circunstancia determinada para dos o más de tales agentes, entidades, situaciones, conjuntos de condiciones, etcétera, para considerarse comparables.

El término "conservador" como se usa en la presente descripción para describir una sustitución de aminoácidos conservadora, se refiere a la sustitución de un residuo de aminoácido por otro residuo de aminoácido que tiene un grupo R de cadena lateral con propiedades químicas similares (por ejemplo, carga o hidrofobicidad). En general, una sustitución de aminoácido conservadora no cambiará sustancialmente las propiedades funcionales de interés de una proteína, por ejemplo, la capacidad de un receptor de unirse a un ligando. Los ejemplos de grupos de aminoácidos que tienen cadenas laterales con propiedades químicas similares incluyen: cadenas laterales alifáticas tales como glicina, alanina, valina, leucina, e isoleucina; cadenas laterales hidroxialifáticas tales como serina y treonina; cadenas laterales que contienen amida tales como asparagina y glutamina; cadenas laterales aromáticas tales como fenilalanina, tirosina, y triptófano; cadenas laterales básicas tales como lisina, arginina, e histidina; cadenas laterales ácidas tales como ácido aspártico y ácido glutámico; y, cadenas laterales que contienen azufre tales como cisteína y metionina. Los grupos de sustituciones conservadoras de aminoácidos incluyen, por ejemplo, valina/leucina/isoleucina, fenilalanina/tirosina, lisina/arginina, alanina/valina, glutamato/aspartato, y asparagina/glutamina. Una sustitución de aminoácido conservadora puede ser una sustitución de cualquier residuo nativo en una proteína con alanina, como se usa, por ejemplo, en la mutagénesis por barrido de alanina. Una sustitución conservadora puede ser una que tiene un valor positivo en la matriz de probabilidad logarítmica PAM250 descrita en Gonnet y otros (1992) Exhaustive Matching of the Entire Protein Sequence Database, Science 256:1443-45. La sustitución puede ser una sustitución moderadamente conservadora en donde la sustitución tiene un valor no negativo en la matriz de probabilidad logarítmica PAM250.

El término "control", como se usa en la presente descripción, se refiere al significado que se entiende en la técnica de un "control" que es un estándar contra el cual se comparan los resultados. Típicamente, los controles se usan para aumentar la integridad en los experimentos mediante el aislamiento de variables para llegar a una conclusión sobre tales variables. Un control puede ser una reacción o un ensayo que se realiza simultáneamente con una reacción o un ensayo de prueba para proporcionar un comparador. Como se usa en la presente descripción, un "control" puede referirse a un "animal de control". Un "animal de control" puede tener una modificación como se describe en la presente descripción, una modificación que es diferente a como se describe en la presente descripción, o puede no tener modificaciones (es decir, un animal de tipo silvestre). En un experimento, se aplica la "prueba" (es decir, la variable que se somete a prueba). En el segundo experimento, el "control," no se aplica la variable que se somete a prueba. Un control puede ser un control histórico (es decir, de una prueba o un ensayo realizados anteriormente, o una cantidad o resultado que se conoce previamente). Un control puede ser o comprender un registro impreso o guardado de cualquier otra manera. Un control puede ser un control positivo o un control negativo.

El término "interrupción" como se usa en la presente descripción puede referirse al resultado de un evento de recombinación homóloga con una molécula de ADN (por ejemplo, con una secuencia homóloga endógena tal como un gen o locus génico). Una interrupción puede lograr o representar una inserción, una delección, una sustitución, un reemplazo, una mutación con pérdida de sentido, o un desplazamiento del marco de una(s) secuencia(s) de ADN, o cualquier combinación de estos. Las inserciones pueden incluir la inserción de genes completos o fragmentos de genes, por ejemplo, exones, que pueden ser de un origen distinto al de la secuencia endógena (por ejemplo, una secuencia heteróloga). Una interrupción puede aumentar la expresión y/o actividad de un gen o un producto génico (por ejemplo, de una proteína codificada por un gen). Una interrupción puede disminuir la expresión y/o actividad de un gen o un producto génico. Una interrupción puede alterar la secuencia de un gen o un producto génico codificado (por ejemplo, una proteína codificada). Una interrupción puede truncar o fragmentar un gen o un producto génico codificado (por ejemplo, una proteína codificada). Una interrupción puede extender un gen o un producto génico codificado; en algunos de estos casos, una interrupción puede lograr el ensamblaje de una proteína de fusión. Una interrupción puede afectar el nivel pero no la actividad de un gen o un producto génico. Una interrupción puede afectar la actividad pero no el nivel de un gen o un producto génico. Una interrupción puede no tener un efecto significativo sobre el nivel de un gen o un producto génico. Una interrupción puede no tener un efecto significativo sobre la actividad de un gen o un producto génico. Una interrupción puede no tener un efecto significativo sobre el nivel o la actividad de un gen o un producto génico.

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

La frase "locus endógeno" o "gen endógeno", como se usa en la presente descripción, se refiere a un locus genético encontrado en un organismo original o de referencia antes de la introducción de una interrupción, delección, reemplazo, alteración, o modificación como se describe en la presente. El locus endógeno puede tener una secuencia que se encuentra en la naturaleza. El locus endógeno puede ser locus de tipo silvestre. El organismo de referencia puede ser un organismo de tipo silvestre. El organismo de referencia puede ser un organismo modificado genéticamente. El organismo de referencia puede ser un organismo criado en el laboratorio (ya sea de tipo silvestre o modificado genéticamente).

La frase "promotor endógeno" se refiere a un promotor que se asocia naturalmente, por ejemplo, en un organismo de tipo silvestre, con un gen endógeno.

El término "heterólogo", como se usa en la presente descripción, se refiere a un agente o entidad de una fuente diferente. Por ejemplo, cuando se usa en referencia a un polipéptido, un gen, o un producto génico presente en una célula u organismo particular, el término aclara que el polipéptido, gen, o producto génico en cuestión: 1) se modificó genéticamente por acción del hombre; 2) se introdujo en la célula u organismo (o un precursor de estos) a través de la acción del hombre (por ejemplo, por medio de ingeniería genética); y/o 3) no se produce o no está presente naturalmente en la célula u organismo relevante (por ejemplo, el tipo de célula o el tipo de organismo relevante).

El término "célula huésped", como se usa en la presente, se refiere a una célula en la que se ha introducido un ácido nucleico o una proteína heterólogos (por ejemplo, exógenos). Después de leer esta descripción los expertos entenderán que tales términos no se refieren solamente a la célula particular en cuestión, sino que se usan, además, para referirse a la progenie de tal una célula. Dado que pueden producirse determinadas modificaciones en las generaciones sucesivas debido a una mutación o influencias ambientales, dicha progenie, de hecho, puede no ser idéntica a la célula parental, pero aun así se incluye dentro del alcance del término "célula huésped" como se usa en la presente descripción. Una célula huésped puede ser o puede comprender una célula procarionota o eucariota. En general, una célula huésped es cualquier célula que sea adecuada para recibir y/o producir un ácido nucleico o una proteína heterólogos, independientemente del reino de la vida al que pertenece la célula. Las células ilustrativas incluyen las de organismos procarionotas y eucariotas (unicelulares o pluricelulares), células bacterianas (por ejemplo, cepas de *E. coli*, *Bacillus* spp., *Streptomyces* spp., etcétera), células de micobacterias, células fúngicas, células de levaduras (por ejemplo, *S. cerevisiae*, *S. pombe*, *P. pastoris*, *P. methanolica*, etcétera), células vegetales, células de insectos (por ejemplo, SF-9, SF-21, células de insectos infectadas con baculovirus, *Trichoplusia ni*, etcétera), células de animales no humanos, células humanas, o fusiones de células tales como, por ejemplo, hibridomas o cuadromas. La célula puede ser una célula humana, de mono, simio, hámster, rata, o ratón. La célula puede ser eucariota y puede seleccionarse de las siguientes células: CHO (por ejemplo, CHO K1, DXB-11 CHO, Veggie-CHO), COS (por ejemplo, COS-7), célula de retina, Vero, CV1, renal (por ejemplo, HEK293, 293 EBNA, MSR 293, MDCK, HaK, BHK), HeLa, HepG2, WI38, MRC 5, Colo205, HB 8065, HL-60, (por ejemplo, BHK21), Jurkat, Daudi, A431 (epidérmica), CV-1, U937, 3T3, célula L, célula C127, SP2/0, NS-0, MMT 060562, célula de Sertoli, célula BRL 3A, célula HT1080, célula de mieloma, célula tumoral, y una línea celular derivada de una célula mencionada anteriormente. La célula puede comprender uno o más genes virales, por ejemplo, una célula de la retina que expresa un gen viral (por ejemplo, una célula PER.C6™). Una célula huésped puede ser o puede comprender una célula aislada. Una célula huésped puede ser parte de un tejido, una célula huésped es parte de un organismo.

El término "humanizado" se usa en la presente descripción de acuerdo con el significado que se entiende en la técnica para referirse a ácidos nucleicos o proteínas cuyas estructuras (es decir, secuencias de nucleótidos o aminoácidos) incluyen porciones que se corresponden sustancial o idénticamente con estructuras de un gen o proteína particulares que se encuentran en la naturaleza en un animal no humano, e incluyen, además, porciones que se diferencian de la encontrada en el gen o proteína no humanos particulares en cuestión y en lugar de eso se corresponden de manera más cercana con estructuras comparables que se encuentran en un gen o proteína humanos correspondientes. Un gen "humanizado" puede ser uno que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos sustancialmente igual a la de un polipéptido humano (por ejemplo, una proteína humana o porción de esta - por ejemplo, una porción característica de esta). Para dar un ejemplo, en el caso de un receptor de membrana, un gen "humanizado" puede codificar un polipéptido que tiene una porción extracelular que tiene una secuencia de aminoácidos igual a la de una porción extracelular humana y la secuencia restante igual a la de un polipéptido no humano (por ejemplo, de ratón). Un gen humanizado puede comprender al menos una porción de una secuencia de ADN de un gen humano. Un gen humanizado puede comprender una secuencia de ADN completa de un gen humano. Una proteína humanizada puede comprender una secuencia que tiene una porción que aparece en una proteína humana. Una proteína humanizada puede comprender una secuencia completa de una proteína humana y se expresa a partir de un locus endógeno de un animal no humano que corresponde al homólogo o al ortólogo del gen humano.

El término "identidad" como se usa en la presente descripción en relación con una comparación de secuencias, se refiere a la identidad determinada mediante una serie de algoritmos diferentes conocidos en la técnica que pueden usarse para medir la identidad de secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos. Las identidades como se describe en la presente pueden determinarse con el uso de un alineamiento ClustalW v. 1.83 (lento) que emplea una penalización por apertura de brecha de 10,0, una penalización por extensión de brecha de 0,1, y usa una matriz de similitud de Gonnet (MACVECTOR™ 10.0.2, MacVector Inc., 2008).

El término "aislado", como se usa en la presente, se refiere a una sustancia y/o entidad que (1) se ha separado de al menos algunos de los componentes con los que se asociaba cuando se produjo inicialmente (en la naturaleza y/o en un entorno experimental), y/o (2) se ha diseñado, producido, preparado, y/o fabricado por la acción del hombre. Las sustancias y/o entidades aisladas pueden separarse de aproximadamente 10 %, aproximadamente 20 %, aproximadamente 30 %, aproximadamente 40 %, aproximadamente 50 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 70 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 91 %, aproximadamente 92 %, aproximadamente 93 %, aproximadamente 94 %, aproximadamente 95 %, aproximadamente 96 %, aproximadamente 97 %, aproximadamente 98 %, aproximadamente 99 %, o más de aproximadamente 99 % de los otros componentes

con los que se asociaron inicialmente. Los agentes aislados pueden ser alrededor de 80 %, alrededor de 85 %, alrededor de 90 %, alrededor de 91 %, alrededor de 92 %, alrededor de 93 %, alrededor de 94 %, alrededor de 95 %, alrededor de 96 %, alrededor de 97 %, alrededor de 98 %, alrededor de 99 %, o más de alrededor de 99 % puros. Como se usa en la presente, una sustancia es "pura" si está sustancialmente libre de otros componentes. Como
 5 entenderán los expertos en la técnica, una sustancia aún puede considerarse "aislada" o incluso "pura", después de combinarse con otros componentes determinados tales como, por ejemplo, uno o más vehículos o excipientes (por ejemplo, tampón, disolvente, agua, etcétera); en tales casos, el porcentaje de aislamiento o pureza de la sustancia se calcula sin incluir tales vehículos o excipientes. Solo para proporcionar un ejemplo, un polímero biológico tal como un polipéptido o un polinucleótido que se produce en la naturaleza puede considerarse "aislado" cuando, a) en virtud de
 10 su origen o fuente de obtención no se asocia con algunos o todos los componentes que lo acompañan en su estado nativo en la naturaleza; b) está sustancialmente libre de otros polipéptidos o ácidos nucleicos de la misma especie que la especie que lo produce en la naturaleza; o c) se expresa por o se encuentra de cualquier otra manera en asociación con componentes de una célula u otro sistema de expresión que no es de la especie que lo produce en la naturaleza. Así, por ejemplo, un polipéptido que se sintetiza químicamente o se sintetiza en un sistema celular diferente
 15 al que lo produce en la naturaleza puede considerarse un polipéptido "aislado". Alternativamente o adicionalmente, un polipéptido que se ha sometido a una o más técnicas de purificación puede considerarse un polipéptido "aislado" en la medida que se ha separado de otros componentes a) con los que se asocia en la naturaleza; y/o b) con los que se asociaba cuando se produjo inicialmente.

20 La frase "animal no humano" como se usa en la presente descripción se refiere a cualquier organismo vertebrado que no es un ser humano. Un animal no humano puede ser un ciclóstomo, un pez óseo, un pez cartilaginoso (por ejemplo, un tiburón o una raya), un anfibio, un reptil, un mamífero, o un ave. Un mamífero no humano puede ser un primate, una cabra, una oveja, un cerdo, un perro, una vaca, o un roedor. Un animal no humano puede ser un roedor tal como una rata o un ratón.

25 La frase "ácido nucleico", como se usa en la presente, en su sentido más amplio, se refiere a cualquier compuesto y/o sustancia que es una cadena oligonucleotídica o que puede incorporarse a esta. Un ácido nucleico puede ser un compuesto y/o sustancia que es una cadena oligonucleotídica o que puede incorporarse a esta por medio de un enlace fosfodiéster. Como resultará evidente a partir del contexto, "ácido nucleico" puede referirse a residuos de ácido
 30 nucleico individuales (por ejemplo, nucleótidos y/o nucleósidos); "ácido nucleico" puede referirse a una cadena oligonucleotídica que comprende residuos de ácido nucleico individuales. Un "ácido nucleico" puede ser o comprender ARN; un "ácido nucleico" puede ser o comprender ADN. Un ácido nucleico puede ser, o comprender, o consistir en uno o más residuos de ácido nucleico naturales. Un ácido nucleico puede ser, o comprender, o consistir en uno o más análogos de ácido nucleico naturales. Un análogo de ácido nucleico puede diferir de un ácido nucleico en el hecho de
 35 que no utiliza una cadena principal con enlaces fosfodiéster. Por ejemplo, un ácido nucleico puede ser, comprender, o consistir en uno o más "ácidos nucleicos peptídicos", que se conocen en la técnica y tienen enlaces peptídicos en lugar de enlaces fosfodiéster en la cadena principal. Alternativamente o adicionalmente, un ácido nucleico puede tener uno o más enlaces fosforotioato y/o 5'-N-fosforamidita en lugar de enlaces fosfodiéster. Un ácido nucleico puede ser, comprender, o consistir en uno o más nucleósidos naturales (por ejemplo, adenosina, timidina, guanosina, citidina,
 40 uridina, desoxiadenosina, desoxitimidina, desoxiguanosina, y desoxicitidina). Un ácido nucleico puede ser, comprender, o consistir en uno o más análogos de nucleósidos (por ejemplo, 2-aminoadenosina, 2-tiotimidina, inosina, pirrolo-pirimidina, 3-metil adenosina, 5-metilcitidina, C-5 propinil-citidina, C-5 propinil-uridina, 2-aminoadenosina, C5-bromouridina, C5-fluorouridina, C5-yodouridina, C5-propinil-uridina, C5-propinil-citidina, 2-aminoadenosina, 2-aminoadenosina, 7-deazaadenosina, 7-deazaguanosina, 8-oxoadenosina, 8-oxoguanosina, O(6)-metilguanina, 2-tiocitidina, bases metiladas, bases intercaladas, y combinaciones de estos). Un ácido nucleico puede comprender uno o más azúcares modificados (por ejemplo, 2'-fluororribosa, ribosa, 2'-desoxirribosa, arabinosa, y hexosa) en comparación con los de ácidos nucleicos naturales. Un ácido nucleico puede tener una secuencia de nucleótidos que codifica un producto génico funcional tal como un ARN o una proteína. Un "ácido nucleico" puede incluir uno o más intrones. Un "ácido nucleico" puede prepararse mediante uno o más de aislamiento a partir de una fuente natural, síntesis enzimática por polimerización basada en una plantilla complementaria (in vivo o in vitro), reproducción en una célula o sistema recombinante, y síntesis química. Un ácido nucleico puede ser de al menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000 o más residuos de longitud. Un "ácido nucleico" puede ser de una hebra; o un "ácido nucleico" puede ser
 55 de doble hebra. Un ácido nucleico puede tener una secuencia de nucleótidos que comprende al menos un elemento que codifica, o es el complemento de una secuencia que codifica, un polipéptido. Un ácido nucleico puede tener actividad enzimática.

60 La frase "unido operativamente", como se usa en la presente descripción, se refiere a una yuxtaposición en donde los componentes descritos se encuentran en una relación que les permite funcionar en su manera prevista. Una secuencia control "unida operativamente" a una secuencia codificante está ligada de manera que la expresión de la secuencia codificante se logra en condiciones compatibles con las secuencias control. Las secuencias "unidas operativamente" incluyen ambas, las secuencias de control de la expresión contiguas al gen de interés y las secuencias de control de la expresión que actúan en trans o a una distancia para controlar el gen de interés. El término "secuencia de control de la expresión", como se usa en la presente descripción, se refiere a secuencias de polinucleótidos, que son necesarias para efectuar la expresión y el procesamiento de las secuencias codificantes a las que se unen. Las

“secuencias de control de la expresión” incluyen: secuencias adecuadas de iniciación, de terminación, promotoras y potenciadoras de la transcripción; señales eficientes de procesamiento del ARN tales como señales de corte y empalme y de poliadenilación; secuencias que estabilizan el ARNm citoplasmático; secuencias que potencian la eficiencia de la traducción (es decir, la secuencia consenso Kozak); secuencias que potencian la estabilidad de las proteínas; y cuando convenga, secuencias que potencian la secreción de proteínas. La naturaleza de tales secuencias control difiere según el organismo huésped. Por ejemplo, en procariotas, tales secuencias control generalmente incluyen promotor, sitio de unión al ribosoma, y secuencias de terminación de la transcripción, mientras que en eucariotas, típicamente, tales secuencias control incluyen promotores y secuencias de terminación de la transcripción. El término "secuencias control" está destinado a incluir componentes cuya presencia es esencial para la expresión y el procesamiento, y puede incluir, además, componentes adicionales cuya presencia es ventajosa, por ejemplo, secuencias líder y secuencias de parejas de fusión.

El término "polipéptido", como se usa en la presente, se refiere a cualquier cadena polimérica de aminoácidos. Un polipéptido puede tener una secuencia de aminoácidos que se produce en la naturaleza. Un polipéptido puede tener una secuencia de aminoácidos que no se produce en la naturaleza, un polipéptido tiene una secuencia de aminoácidos que contiene porciones que se producen en la naturaleza separadas entre sí (es decir, a partir de dos o más organismos diferentes, por ejemplo, porciones humanas y no humanas). Un polipéptido puede tener una secuencia de aminoácidos que está modificada genéticamente en el hecho de que se diseña y/o se produce por la acción del hombre.

El término "recombinante", se usa para referirse a polipéptidos (p. ej., polipéptidos CD47 como se describen en la presente descripción) que se diseñan, se modifican, se preparan, se expresan, se crean o se aíslan por medios recombinantes, tales como polipéptidos que se expresan con el uso de un vector de expresión recombinante transfectedo en una célula huésped, polipéptidos aislados a partir de una biblioteca combinatoria, de polipéptidos humanos recombinantes (Hoogenboom H. R., (1997) *TIB Tech.* 15:62-70; Azzazy H., e Highsmith W. E., (2002) *Clin. Biochem.* 35:425-445; Gavilondo J. V., y Larrick J. W. (2002) *BioTechniques* 29:128-145; Hoogenboom H., y Chames P. (2000) *Immunology Today* 21:371-378), anticuerpos aislados a partir de un animal (p. ej., un ratón) que es transgénico para genes de inmunoglobulinas humanas (ver p. ej., Taylor, L. D., y otros (1992) *Nucl. Acids Res.* 20:6287-6295; Kellermann S-A., y Green L. L. (2002) *Current Opinion in Biotechnology* 13:593-597; Little M. y otros (2000) *Immunology Today* 21:364-370; Murphy, A.J., y otros (2014) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111(14):5153-5158) o polipéptidos que se preparan, se expresan, se crean o se aíslan por cualquier otro medio que involucre el corte y empalme entre elementos de secuencia seleccionados. Uno o más de tales elementos de secuencia seleccionados pueden encontrarse en la naturaleza. Uno o más de tales elementos de secuencia seleccionados pueden diseñarse *in silico*. Uno o más de tales elementos de secuencia seleccionados pueden ser el resultado de la mutagénesis (por ejemplo, *in vivo* o *in vitro*) de un elemento de secuencia conocido, por ejemplo, a partir de una fuente natural o sintética. Por ejemplo, un polipéptido recombinante puede estar compuesto por secuencias que se encuentran en el genoma de un organismo fuente de interés (por ejemplo, ser humano, ratón, etcétera). Un polipéptido recombinante puede tener una secuencia de aminoácidos que es el resultado de la mutagénesis (por ejemplo, *in vitro* o *in vivo*, por ejemplo en un animal no humano), de manera que las secuencias de aminoácidos de los polipéptidos recombinantes son secuencias que, aunque se originan de secuencias de polipéptidos y se relacionan con estas, pueden no existir naturalmente dentro del genoma de un animal no humano *in vivo*.

El término "reemplazo" se usa en la presente descripción para referirse a un proceso a través del cual una secuencia de ácido nucleico "reemplazada" (por ejemplo, un gen) que se encuentra en un locus del huésped (por ejemplo, en un genoma) se elimina de ese locus, y un ácido nucleico diferente, de "reemplazo" se coloca en su lugar. La secuencia de ácido nucleico reemplazada y las secuencias de ácidos nucleicos de reemplazo pueden ser comparables entre sí porque, por ejemplo, son homólogas entre sí y/o contienen elementos correspondientes (por ejemplo, elementos que codifican proteínas, elementos reguladores, etcétera). Una secuencia de ácido nucleico reemplazada puede incluir uno o más de un promotor, un potenciador, un sitio donante de corte y empalme, un sitio receptor de corte y empalme, un intrón, un exón, una región no traducida (UTR); una secuencia de ácido nucleico de reemplazo puede incluir una o más secuencias codificantes. Una secuencia de ácido nucleico de reemplazo puede ser un homólogo de la secuencia de ácido nucleico reemplazada. Una secuencia de ácido nucleico de reemplazo puede ser un ortólogo de la secuencia reemplazada. Una secuencia de ácido nucleico de reemplazo puede ser o puede comprender una secuencia de ácido nucleico humana. En algunos casos, que incluyen cuando la secuencia de ácido nucleico de reemplazo es o comprende una secuencia de ácido nucleico humana, la secuencia de ácido nucleico reemplazada puede ser o puede comprender una secuencia de roedor (por ejemplo, una secuencia de ratón o rata). La secuencia de ácido nucleico así colocada puede incluir una o más secuencias reguladoras que son parte de la secuencia de ácido nucleico fuente usada para obtener la secuencia así colocada (por ejemplo, promotores, potenciadores, regiones 5' o 3' no traducidas, etcétera). Por ejemplo, el reemplazo es una sustitución de una secuencia endógena con una secuencia heteróloga que da como resultado la producción de un producto génico a partir de la secuencia de ácido nucleico así colocada (que comprende la secuencia heteróloga), pero no la expresión de la secuencia endógena; el reemplazo es de una secuencia genómica endógena con una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína que tiene una función similar a la de la proteína codificada por la secuencia endógena (por ejemplo, la secuencia genómica endógena codifica una proteína CD47, y el fragmento de ADN codifica una o más proteínas CD47 humanas). Un gen endógeno o un fragmento de este se reemplaza con un gen humano correspondiente o un fragmento de este. Un gen humano correspondiente o un fragmento de este es un gen humano o un fragmento que es un ortólogo de, o es sustancialmente similar o igual en estructura y/o función, al gen endógeno o fragmento de este que se reemplaza.

La frase "proteína del grupo de diferenciación 47" o "proteína CD47", como se usa en la presente descripción, se refiere a una proteína de transmembrana que pasa varias veces a través de ella que pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas y tiene un dominio V inmunoglobulínico extracelular amino-terminal, cinco dominios de transmembrana y una cola intracelular carboxilo-terminal corta. CD47 se expresa en la superficie celular y participa en interacciones entre proteínas de la superficie de la membrana tales como, por ejemplo, integrinas, SIRP α y trombospondina 1 (TSP-1). CD47 se expresa en tejidos normales y se regula positivamente en varios tipos de cáncer humano. Se ha demostrado que CD47 participa en varios procesos celulares tales como, por ejemplo, apoptosis, proliferación, adhesión y migración. Se han identificado varias isoformas de CD47 de corte y empalme alternativos entre el ratón y el hombre. A modo de ilustración, las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de los genes de CD47 de ratón y humano se proporcionan en la Tabla 3. Después de leer esta descripción los expertos reconocerán que uno o más genes de CD47 endógenos en un genoma (o todos) pueden reemplazarse con uno o más genes de CD47 heterólogos (por ejemplo, variantes polimórficas, subtipos o mutantes, genes de otras especies, formas humanizadas, etcétera).

Una "célula que expresa CD47", como se usa en la presente descripción, se refiere a una célula que expresa una proteína CD47 de transmembrana. Una célula que expresa CD47 expresa una proteína CD47 de transmembrana en su superficie. Una proteína CD47 se expresa en la superficie de la célula en una cantidad suficiente para mediar las interacciones célula a célula por medio de la proteína CD47 de transmembrana expresada en la superficie de la célula. Las células que expresan CD47 ilustrativas incluyen neuronas, células inmunitarias, queratinocitos, y células circulantes. Las células que expresan CD47 regulan la interacción de las células inmunitarias y las células circulantes para regular diversos procesos celulares tales como adhesión, proliferación celular y/o apoptosis, angiogénesis e inflamación. Los animales no humanos de la presente invención demuestran la regulación de diversos procesos celulares (como se describe en la presente) por medio de proteínas CD47 humanizadas expresadas en la superficie de una o más células del animal no humano.

El término "referencia" se usa en la presente descripción para describir un agente, cohorte, individuo, población, muestra, secuencia o valor patrón o de control contra el cual se compara un agente, animal, cohorte, individuo, población, muestra, secuencia o valor de interés. Un agente, cohorte, individuo, población, muestra, secuencia o valor de referencia se somete a prueba y/o se determina sustancialmente de manera simultánea con la prueba o determinación del agente, cohorte, individuo, población, muestra, secuencia o valor de interés. Un agente, cohorte, individuo, población, muestra, secuencia o valor de referencia es una referencia histórica, materializada opcionalmente en un medio tangible. Una referencia puede referirse a un control. Como se usa en la presente descripción, una "referencia" puede referirse a un "animal de referencia". Un "animal de referencia" puede tener una modificación como se describe en la presente descripción, una modificación que es diferente a como se describe en la presente descripción o puede no tener modificaciones (es decir, un animal de tipo silvestre). Típicamente, como entenderán los expertos en la técnica, un agente, animal, cohorte, individuo, población, muestra, secuencia o valor de referencia se determina o caracteriza en condiciones comparables a las utilizadas para determinar o caracterizar el agente, animal (por ejemplo, un mamífero), cohorte, individuo, población, muestra, secuencia o valor de interés.

El término "sustancialmente" como se usa en la presente descripción se refiere a la condición cualitativa de exhibir una medida o grado total o casi total de una característica o propiedad de interés. Un experto en la técnica biológica comprenderá que los fenómenos biológicos y químicos rara vez, o nunca, llegan a completarse y/o proceden a completar o lograr o evitar un resultado absoluto. El término "sustancialmente" se usa, por tanto, en la presente para capturar la falta potencial de completamiento inherente en muchos fenómenos biológicos y químicos.

La frase "homología sustancial", como se usa en la presente descripción, se refiere a una comparación entre secuencias de aminoácidos o ácidos nucleicos. Como se apreciará por los expertos en la materia, generalmente se considera que dos secuencias son "sustancialmente homólogas" si contienen residuos homólogos en posiciones correspondientes. Los residuos homólogos pueden ser residuos idénticos. Alternativamente, los residuos homólogos pueden ser residuos no idénticos con características estructurales y/o funcionales adecuadamente similares. Por ejemplo, como se conoce bien por los expertos en la materia, determinados aminoácidos se clasifican típicamente como aminoácidos "hidrófobos" o "hidrófilos", y/o porque tienen cadenas laterales "polares" o "no polares". La sustitución de un aminoácido por otro del mismo tipo puede considerarse frecuentemente una sustitución "homóloga". Las clasificaciones de aminoácidos típicas se resumen en la Tabla 1 y 2.

TABLA 1

5	Alanina	Ala	A	No polar	Neutro	1,8
	Arginina	Arg	R	Polar	Positivo	-4,5
	Asparagina	Asn	N	Polar	Neutro	-3,5
	Ácido aspártico	Asp	D	Polar	Negativo	-3,5
10	Cisteína	Cys	C	No polar	Neutro	2,5
	Ácido glutámico	Glu	E	Polar	Negativo	-3,5
	Glutamina	Gln	Q	Polar	Neutro	-3,5
15	Glicina	Gly	G	No polar	Neutro	-0,4
	Histidina	His	H	Polar	Positivo	-3,2
	Isoleucina	Ile	I	No polar	Neutro	4,5
	Leucina	Leu	L	No polar	Neutro	3,8
20	Lisina	Lys	K	Polar	Positivo	-3,9
	Metionina	Met	M	No polar	Neutro	1,9
	Fenilalanina	Phe	F	No polar	Neutro	2,8
25	Prolina	Pro	P	No polar	Neutro	-1,6
	Serina	Ser	S	Polar	Neutro	-0,8
	Treonina	Thr	T	Polar	Neutro	-0,7
30	Triptófano	Trp	W	No polar	Neutro	-0,9
	Tirosina	Tyr	Y	Polar	Neutro	-1,3
	Valina	Val	V	No polar	Neutro	4,2

TABLA 2

40	Aminoácidos ambiguos	3-Letras	1-Letra
	Asparagina o ácido aspártico	Asx	B
	Glutamina o ácido glutámico	Glx	Z
	Leucina o Isoleucina	Xle	J
45	Aminoácido no especificado o desconocido	Xaa	X

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

La frase "identidad sustancial", como se usa en la presente descripción, se refiere a una comparación entre secuencias de aminoácidos o de ácidos nucleicos. Como apreciarán los expertos en la materia, dos secuencias generalmente se consideran "sustancialmente idénticas" si contienen residuos idénticos en las posiciones correspondientes. Como se

conoce bien en esta técnica, las secuencias de aminoácidos o ácidos nucleicos pueden compararse con el uso de cualquiera de una variedad de algoritmos, que incluyen los disponibles en programas informáticos comerciales tales como BLASTN para las secuencias de nucleótidos y BLASTP, gapped BLAST, y PSI-BLAST para las secuencias de aminoácidos. Tales programas ilustrativos se describen en Altschul y otros (1990) Basic local alignment search tool, J. Mol. Biol., 215(3): 403-410; Altschul y otros, Methods in Enzymology; Altschul y otros (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-3402; Baxevanis y otros (1998) Bioinformatics: A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins, Wiley; y Misener y otros, (eds.) (1999) Bioinformatics Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology, Vol. 132), Humana Press. Además de identificar secuencias idénticas, los programas mencionados anteriormente típicamente proporcionan una indicación del grado de identidad. Dos secuencias pueden considerarse sustancialmente idénticas si al menos 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más de sus residuos correspondientes son idénticos en un segmento relevante de residuos. El segmento relevante puede ser una secuencia completa. El segmento relevante puede ser de al menos 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, o más residuos.

La frase "vector de transformación" o "construcción de transformación", como se usa en la presente descripción, se refiere a una molécula polinucleotídica que comprende una región de transformación. Una región de transformación comprende una secuencia que es idéntica o sustancialmente idéntica a una secuencia en una célula, tejido o animal diana y proporciona la integración del constructo de transformación en una posición dentro del genoma de la célula, tejido o animal por medio de la recombinación homóloga. Se incluyen, además, las regiones de transformación que se dirigen hacia el objetivo con el uso de sitios de reconocimiento de recombinasas sitio específicas (por ejemplo, sitios loxP o Frt). Un constructo de transformación como se describe en la presente puede comprender además una secuencia de ácido nucleico o gen de interés particular, un marcador de selección, secuencias de control y/o reguladoras, y otras secuencias de ácidos nucleicos que permiten la recombinación mediada por la adición exógena de proteínas que ayudan o facilitan la recombinación que involucra a tales secuencias. Un constructo de transformación como se describe en la presente puede comprender además un gen de interés en su totalidad o en parte, en donde el gen de interés es un gen heterólogo que codifica una proteína en su totalidad o en parte que tiene una función similar a la de una proteína codificada por una secuencia endógena. Un constructo de transformación comprende, además, un gen humanizado de interés, en su totalidad o en parte, en donde el gen humanizado de interés codifica una proteína, en su totalidad o en parte, que tiene una función similar a la de una proteína codificada por la secuencia endógena.

El término "variante", como se usa en la presente, se refiere a una entidad que muestra una identidad estructural significativa con una entidad de referencia pero difiere estructuralmente de la entidad de referencia en la presencia o el nivel de una o más porciones químicas en comparación con la entidad de referencia. Una variante también puede diferir funcionalmente de su entidad de referencia. En general, el hecho de que una entidad particular se considere adecuadamente como una "variante" de una entidad de referencia se basa en su grado de identidad estructural con la entidad de referencia. Como apreciarán los expertos en la técnica, cualquier entidad de referencia biológica o química tiene determinados elementos estructurales característicos. Una "variante", por definición, es una entidad química definida que comparte uno o más de tales elementos estructurales característicos. Para proporcionar algunos ejemplos, una molécula pequeña puede tener un elemento estructural central característico (por ejemplo, un macrociclo central) y/o una o más porciones colgantes características de manera que una variante de la molécula pequeña es una que comparte el elemento estructural central y las porciones colgantes características pero se diferencia en otras porciones colgantes y/o en los tipos de enlaces presentes (simples vs. dobles, E vs. Z, etcétera) dentro del núcleo central, un polipéptido puede tener un elemento de secuencia característico que comprende una pluralidad de aminoácidos que tienen posiciones designadas relacionadas entre sí en el espacio lineal o tridimensional y/o que contribuyen a una función biológica particular, un ácido nucleico puede tener un elemento de secuencia característico que comprende una pluralidad de residuos de nucleótidos que tienen posiciones designadas con respecto a otras en el espacio lineal o tridimensional. Por ejemplo, una "variante de polipéptido" puede diferenciarse de un polipéptido de referencia como resultado de una o más diferencias en la secuencia de aminoácidos y/o una o más diferencias en las porciones químicas (por ejemplo, carbohidratos, lípidos, etcétera) unidas covalentemente a la cadena principal del polipéptido. Una variante de polipéptido puede mostrar una identidad de secuencia general con un polipéptido de referencia que es de al menos 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, o 99 %. Alternativamente o adicionalmente, una variante de polipéptido puede no compartir al menos un elemento de secuencia característico con un polipéptido de referencia. El polipéptido de referencia puede tener una o más actividades biológicas. Una variante de polipéptido puede compartir una o más de las actividades biológicas del polipéptido de referencia. Una variante de polipéptido puede carecer de una o más de las actividades biológicas del polipéptido de referencia. Una variante de polipéptido puede mostrar un nivel reducido de una o más actividades biológicas en comparación con el polipéptido de referencia. Un polipéptido de interés puede considerarse una "variante" de un polipéptido original o de referencia si el polipéptido de interés tiene una secuencia de aminoácidos que es idéntica a la del original excepto por un número pequeño de alteraciones de la secuencia en posiciones particulares. Típicamente, menos de 20 %, 15 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 % de los residuos en la variante están sustituidos en comparación con el original. Una variante puede tener 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, o 1 residuo sustituido en comparación con un original. Frecuentemente, una "variante" tiene un número muy pequeño (por ejemplo, menos de 5, 4, 3, 2, o 1) de residuos funcionales sustituidos (es decir, residuos que participan en una actividad biológica particular). Además, típicamente, una "variante" no tiene más de 5, 4, 3, 2, o 1 adiciones o deleciones, y frecuentemente no tiene adiciones o deleciones, en comparación con el original. Por otra parte, cualquiera de las

adiciones o deleciones son típicamente menores que aproximadamente 25, aproximadamente 20, aproximadamente 19, aproximadamente 18, aproximadamente 17, aproximadamente 16, aproximadamente 15, aproximadamente 14, aproximadamente 13, aproximadamente 10, aproximadamente 9, aproximadamente 8, aproximadamente 7, aproximadamente 6, y comúnmente son menores que aproximadamente 5, aproximadamente 4, aproximadamente 3, o aproximadamente 2 residuos. El polipéptido original o de referencia puede ser uno que se encuentra en la naturaleza. Como entenderán los expertos en la técnica, una pluralidad de variantes de un polipéptido de interés particular puede encontrarse comúnmente en la naturaleza, particularmente cuando el polipéptido de interés es un polipéptido agente infeccioso.

El término "vector", como se usa en la presente, se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al cual se asocia. Los vectores pueden ser capaces de replicarse de manera extracromosómica y/o expresar los ácidos nucleicos a los que se encuentran unidos en una célula huésped tal como una célula eucariota y/o procariota. Los vectores capaces de dirigir la expresión de genes unidos operativamente se denominan en la presente "vectores de expresión."

El término "de tipo silvestre", como se usa en la presente, tiene el significado que se entiende en la técnica que se refiere a una entidad que tiene una estructura y/o actividad como la que se encuentra en la naturaleza en un estado o contexto "normal" (a diferencia del mutante, enfermo, alterado, etcétera). Los expertos en la técnica apreciarán que los genes y polipéptidos de tipo silvestre existen frecuentemente en múltiples formas diferentes (por ejemplo, alelos).

Descripción detallada de determinadas modalidades

Se describen en la presente descripción, entre otras cosas, animales no humanos mejorados y/o modificados que tienen material genético humanizado que codifica un gen del grupo de diferenciación 47 (CD47) para determinar la eficacia terapéutica de antagonistas de CD47 (por ejemplo, un anticuerpo anti-CD47) para el tratamiento del cáncer, y ensayos en trasplante de injertos, activación y fagocitosis y transducción de señales. Se contempla que tales animales no humanos proporcionan una mejora en la determinación de la eficacia terapéutica de antagonistas de CD47 y su potencial para el bloqueo de CD47. Se contempla además que tales animales no humanos proporcionan un mejoramiento en el trasplante de injertos de células humanas. Por lo tanto, la presente descripción es particularmente útil para el desarrollo de terapias anti-CD47 para el tratamiento de diversos tipos de cáncer, así como para mantener células hematopoyéticas humanas en animales no humanos. Particularmente, la presente descripción abarca la humanización de un gen de CD47 murino que da como resultado la expresión de una proteína CD47 humanizada en la superficie de células del animal no humano. Tales proteínas CD47 humanizadas tienen la capacidad de proporcionar una fuente de células CD47⁺ humanas para determinar la eficacia de productos terapéuticos anti-CD47 para activar la fagocitosis de células tumorales. Además, tales proteínas CD47 humanizadas tienen la capacidad de reconocer células humanas injertadas por medio de la participación de otras proteínas de la superficie celular y los ligandos presentes en la superficie de las células humanas injertadas (por ejemplo, SIRPα). Los animales no humanos de la presente invención son capaces de activar la fagocitosis por medio del bloqueo de la señalización de CD47 a través de la proteína CD47 humanizada expresada en la superficie de las células del animal no humano. Los animales no humanos descritos en la presente pueden ser capaces de recibir células hematopoyéticas humanas trasplantadas; tales mamíferos no humanos pueden desarrollar y/o tener un sistema inmunitario que comprende células humanas. Las proteínas CD47 humanizadas tienen una secuencia correspondiente al dominio V inmunoglobulínico N-terminal de una proteína CD47 humana. Las proteínas CD47 humanizadas tienen una secuencia correspondiente a una porción N-terminal de una proteína CD47 humana que comprende una porción extracelular y una porción transmembrana de una proteína CD47 humana, en donde la porción extracelular incluye el dominio V inmunoglobulínico N-terminal de la proteína CD47 humana y la porción transmembrana incluye los cinco dominios de transmembrana de la proteína CD47 humana. Las proteínas CD47 humanizadas tienen una secuencia correspondiente a la cola intracitoplasmática de una proteína CD47 no humana (por ejemplo, murina). Las proteínas CD47 humanizadas pueden tener una secuencia correspondiente a los residuos de aminoácidos 19-292 (o 19-141, o 19-127) de una proteína CD47 humana. Los animales no humanos descritos en el presente documento pueden comprender un gen de CD47 endógeno que contiene material genético del animal no humano y una especie heteróloga (por ejemplo, un ser humano). Los animales no humanos de la presente invención pueden comprender un gen de CD47 humanizado, en donde el gen de CD47 humanizado comprende exones de un gen de CD47 humano que codifican una porción extracelular que incluye el dominio V inmunoglobulínico N-terminal de un gen de CD47 humano. El gen de CD47 humanizado puede comprender exones de CD47 humano, por ejemplo, los exones 2-7, que codifican una porción N-terminal de una proteína CD47 humana que comprende una porción extracelular y una porción transmembrana de una proteína CD47 humana, en donde la porción extracelular incluye el dominio V inmunoglobulínico N-terminal de la proteína CD47 humana y la porción transmembrana incluye los cinco dominios de transmembrana de la proteína CD47 humana. El gen de CD47 humanizado puede comprender exones de CD47 no humanos que codifican el péptido señal, en su totalidad o en parte, y la cola intracitoplasmática de una proteína CD47 no humana. El gen de CD47 humanizado puede comprender el exón 1 de CD47 no humano y el o los exones corriente abajo del exón 7 que codifican la cola intracitoplasmática y la UTR 3'. En dependencia de las isoformas, pueden existir uno o más exones corriente abajo del exón 7, donde el codón de parada y la UTR 3' están presentes en el último exón para todas las isoformas. Por ejemplo, la isoforma 2 tanto de CD47 de ratón como humana mostradas en la Tabla 3 tienen dos exones corriente abajo del exón 7, designados como exón 8 y 9.

Diversos aspectos de la invención se describen en detalle en las siguientes secciones. El uso de secciones no significa que limite la invención. Cada sección puede aplicarse a cualquier aspecto de la invención. En esta solicitud, el uso de "o" significa "y/o" a menos que se indique de cualquier otra manera.

5 Gen del grupo de diferenciación 47 (CD47)

CD47, denominado originalmente como proteína asociada a integrina (IAP) por su papel en la transducción de señales de las integrinas en células inmunitarias, es una proteína de transmembrana que incluye un dominio V inmunoglobulínico (IgV) N-terminal, cinco dominios de transmembrana, y una cola intracitoplasmática corta en C-terminal. La cola intracitoplasmática se diferencia en la longitud de acuerdo con cuatro isoformas de corte y empalme alternativos que se han identificado. Inicialmente se describió que CD47 (o IAP) se expresa en todos los tejidos (isoforma 2), neuronas (isoforma 4) y queratinocitos y macrófagos (isoforma 1; ver Reinhold y otros (1995) J. Cell Sci. 108:3419-3425). Se conoce poco sobre la isoforma 3 a pesar de que esta forma tiene la segunda cola intracitoplasmática más larga entre las cuatro isoformas. Además de las integrinas, se conoce que CD47 interactúa con varias otras proteínas de la superficie celular tales como, por ejemplo, trombospondina y miembros de la familia de SIRP. Lo más notable es que CD47 interactúa con SIRP α y conduce a una señalización bidireccional que regula una variedad de respuestas entre células tales como, por ejemplo, inhibición de la fagocitosis y activación de células T. De hecho, la interacción CD47-SIRP α se ha puesto de manifiesto en años recientes por su papel en proporcionar células tumorales con la capacidad de evadir la vigilancia inmunológica. La unión de CD47 a SIRP α normalmente proporciona protección a través de señales anti-fagocíticas ("no me comas") para las células normales. Sin embargo, se ha descubierto que los tumores expresan además señales anti-fagocíticas, que incluyen CD47, para evadir la destrucción por fagocitosis. De manera interesante, se conoce que CD47 está regulada positivamente en varios cánceres hematológicos y contribuye tanto al crecimiento como a la diseminación de tumores (Chao y otros (2012) Curr Opin Immunol. 24(2): 225–232).

Se desconocen todos los efectos de dirigirse a CD47 y a la vía CD47-SIRP α como un nuevo tratamiento para el cáncer y se han explorado algunas toxicidades posibles. Una comprensión más completa y detallada de la señalización de CD47 y la vía CD47-SIRP α es necesaria para desarrollar mejores terapias dirigidas para el tratamiento del cáncer en el futuro.

30 Secuencias de CD47

En la Tabla 3 se exponen secuencias ilustrativas de CD47 para el ser humano y el ratón. Para las secuencias de ARNm, la letra en negritas indica la secuencia codificante y los exones consecutivos, cuando se indican, se encuentran separados por texto subrayado alterno. Para las secuencias de proteínas humana y de ratón, los péptidos señal están subrayados, las secuencias extracelulares están en letras negritas y las secuencias intracitoplasmáticas están en cursiva. Para las secuencias de proteínas humanizadas, las secuencias no humanas se indican en letra normal, las secuencias humanas se indican en letras negritas y los péptidos señal están subrayados. Como se muestra, las isoformas difieren en el número de exones. Por ejemplo, las isoformas 1-4 del gen de CD47 humano tienen un total de 8, 9, 10 y 11 exones, respectivamente, donde los exones 2-7 de cada isoforma codifican el dominio extracelular y los cinco dominios de transmembrana.

TABLA 3

Isoforma 1 de ARNm de CD47 de ratón (XM_006521810.1)	
45	GCCTACACCGGGAGAGCAGGGAGGAGGAGTTGGACTGAGGTTGGGCGGCTC
50	CGAGGTCCAGGGCGAGCTTGGCCAGAGGGAGTAGAGAGCAGCGGGGCTGC
	GCAGGGACGCGTGCCGTGAGTTCCGGTGAGCGTGTGTGTCCCATGCTCCCGT
	CTTTCAGGCCCGGCCAGGACACGAAGCCGGAAGAGAGCTGGCTGGAGGGAC
	GGGGGCCGTGAGCAGAGAGTGCAACCCGCGCAGCCCCGGGGACAGGCTGA
55	TTCTTGGCGCTCTCCGCCGAGCCTGCCAGGGCTGGGTGTGAGGCTGGCGT
	CACGTCAACGAGCAGAGGCGGCCAGGCGGGGCGGAGTGCGCGTGC
	GCGGCGAGCACGCGCGCGCGCACCCCCGGCAGCCTGGGCGGCCGCTCC
	TGCCTGTCACTGCTGCGGCGCTGCTGGTCCGTCGTTTCCCTTGAAGGCAGCA
60	GCGGAGGCGGCGGCTGCTCCAGACACCTGCGGCGGCGACCCCCGGCGGCG
	CGGAGATGTGGCCCTTGGCGGCGGCGCTGTTGCTGGGCTCCTGCTGCT
	GCGGTTCACTCAACTACTGTTTAGTAACGTCAACTCCATAGAGTTCAC

65

5 TTCATGCAATGAAACTGTGGTCATCCCTTGCATCGTCCGTAATGTGGAG
 GCGCAAAGCACCGAAGAAATGTTTGTGAAGTGGAAGTTGAACAAATCG
 TATATTTTCATCTATGATGGAAATAAAAAATAGCACTACTACAGATCAAA
 ACTTTACCAGTGCAAAAATCTCAGTCTCAGACTTAATCAATGGCATTGC
 CTCTTTGAAAAATGGATAAGCGCGATGCCATGGTGGGAAACTACACTTGC
 10 GAAGTGACAGAGTTATCCAGAGAAGGCAAAACAGTTATAGAGCTGAAA
 AACCGCACGGCCTTCAACACTGACCAAGGATCAGCCTGTTCTTACGAGG
 AGGAGAAAGGAGGTTGCAAATTAGTTTCGTGGTTTTCTCCAAATGAAAA
 GATCCTCATTGTTATTTTTCCCAATTTTGGCTATACTCCTGTTCTGGGGAA
 AGTTTGGTATTTTAACTCAAAATAAAATCCAGCCATACGAATAAGAG
 AATCATTCTGCTGCTCGTTGCCGGGCTGGTGTCTCACAGTCATCGTGGTT
 15 GTTGAGCCATCCTTCTCATCCCAGGAGAAAAGCCCGTGAAGAATGCTT
 CTGGACTTGGCCTCATTGTAATCTCTACGGGGATATTAATACTACTTCA
 GTACAATGTGTTTATGACAGCTTTTGGAAATGACCTCTTTCACCATTGCC
 ATATTGATCACTCAAGTGCTGGGCTACGTCCCTTGCTTTGGTTCGGGCTGT
 20 GTCTCTGCATCATGGCATGTGAGCCAGTGCACGGCCCCCTTTTGATTT
 AGGTTTGGGGATCATAGCTCTAGCAGAACTACTTGGATTAGTTTATATG
 AAGTTTGTGCAATAGGTGAAGGGAAGTGACGGACTGTAACCTGGAAGTCA
 GAAATGGAAGAATACAGTTGTCTAAGCACAGGCTTTCACGACTCACAGT
 GGAAGGAACAGACAACAGTAACTGACTTCCATCCAGGAAAACATGCACAT
 25 AAATGATTACTAAGTTTATATTCAAAGCAGCTGTACTTTACATAATAAAAA
 AATATGATGTGCTGTGTAACCAATTGGAATCCCATTTTTCTATTGTTTCTACT
 CAACTAGGGGCAAACGTTTCAGGGGCAACTTCCAAGAATGATGCTTGTTAG
 ATCCTAGAGTCTCTGAACACTGAGTTTAAATTGATTCCGAGTGAGACTCGCC
 AAGCACTAACCTGAGGGTTAGTTACCCAGAGATACCTATGAAAAACAGTGG
 30 TATCCAGCAAGCCTTAGTAAACTCAGGTTGCCAGCAGCTTGGCCACTCCGC
 TGCTAGCTGAATAACAAGACTGCCACTTCTGGGTCATAGTGATAGAGACTG
 AAGTAGAAAAACGAATGTGGTTGGGCAAATCCCGTGTGGCCCCCTCTGTGTG
 CTATGATATTGATGGCACTGGTGTCTTCATTCTTGGGGGTTGCCATCATTAC
 35 ACACACCCCTTTGACATACAGTGCACCCAGTTTTGAATACATTTTTTTTGA
 CCCTGTCCCGTTCTGCTACTTTGATTTGCGTTATGATATATATATATATAT
 AATACCTTTTCTCCTCTTTAAACATGGTCCGTGTGACACAATAGTCAGTTGCA
 GAAAGGAGCCAGACTTATTCGCAAAGCACTGTGCTCAAACCTTTCAGAAAA
 AAAGGAAAAAAAAAAAAAAAAAGCTATAGTTGTAACATATGTATTCCAGACCTCT
 40 GGTTTAAAGGCAAAAGAAAAAAAAATCTACAGTGTCTTCTCATGTTTTCTG
 ATCGGAGGCATGACAAAGCAAGACTGAAATCTGAACTGTGTCTCCTGCATG
 GCAACACGTGTCTCCGTCAAGCCCTCGCAAGGCCCGGGAGGGGTTCTAC
 GCCTCTTGTCTCTTTGTTGCATGCTGAACACTCATCGCCTTCTACTGTATCC
 45 TGCTCCTGCAGCCTCCCTCTTCTCCTCCTCTTCTCCTCTTCTCCTCTTCTCCTCC
 TCCTCCTCCTCTTCTCCTCCAAGTTTGAAGGTCAAACAAAACACTACCACATTCC
 CTACCCAGTTAGAAGAAAACCACCGTCCCTGACAGTTGTGATCGCATGGAGT
 ACTTTTAGATTATTAGCACCTGTTTTTACCTCGTTTGTGGGCGTGTGTTGATG
 50 TGCACATGTATGAAGTCGGCACATGCACCTTCTGTATGGGCAGAGGCGTGG
 CATCTACAGAAGAGCAGATGCCAACTTTGTGCTTTTGTGTAATACATTA
 AAAAAAACCAACGGTCTTATTGAGTGAATTTCTATTTGATGCAAATATTT
 GAGCTCTTAAAGACTTTAAACTAGATAATGTGCCAAGCTTTTAGGACTGCT
 CACCAGTGCCCTCTGAAGAAACACCAGTACTTTTTCTGTTTGTGTAATAAA
 55 GGCATATTTGATTTGTGTTTGCATCACTAATGGTTATTTCTTCTTAGTCCAC

55

60

65

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

5 MWPLAAALLLGSCCCGSAQLLFSNVNSIEFTSCNETVVIPCIVRNVEAQSTEE
MFVKWKLNKSYIFIYDGNKNSTTTDQNFSAKISVSDLINGIASLKMDKRDA
MVGNYTCEVTELSREGKTVIELKNRTAFNTDQGSACSYYYYEKGKGLVSW
FSPNEKILIVIFPILAILLFWGKFGILTLKYSSHTNKRILLVAGLVLTIVVVV
10 AILLIPGEKPVKNASGLGLIVISTGILILLQYNVFMATAFGMTSFTIAILITQVLGYV
LALVGLCLCIMACEPVHGPLLISGLGIIALAEELLGLVYMKFV*E*(sec. con núm de ident.: 2)

Isoforma 2 de ARNm de CD47 de ratón (XM_006521811.1)

15 GCCTACACCGGGAGAGCAGGGAGGAGGAGTTGGACTGAGGTTGGGCGGCTC
CGAGGTCCAGGGCGAGCTTGGCCAGAGGGAGTAGAGAGCAGCGGGGCTGC
GCAGGGACGCGTGCCGTGAGTCCGGTGAGCGTGTGTGCCATGCTCCCGT
20 CTTTCAGGCCGCCCAGGACACGAAGCCGGAAGAGAGCTGGCTGGAGGGAC
GGGGGCGGTGAGCAGAGAGTGAACCCGCGCAGCCCCGGGGACAGGCTGA
TTCTTGCGCTCTCCGCCGAGCCTGCCAGGGCTGGGTGTGAGGCTGGCGT
CACGTCAACGAGCAGAGGCGGCCAGGCGGGGCGGAGTGCAGCGTGCAGCGG
25 GCGGCGAGCACGCGCGCGCGCACCCCGGGCAGCCTGGGCGGGCCGCTCC
TGCTGTACTGCTGCGGGCTGCTGGTTCGGTTCGTTCCCTTGAAGGCAGCA
GCGGAGGCGGCGGCTGCTCCAGACACCTGCGGGCGGCGACCCCGGGCGGCG
CGGAGATGTGGCCCTTGGCGGCGGCGCTGTTGCTGGGCTCCTGCTGCT
30 GCGGTTCACTCAACTACTGTTTAGTAACGTCAACTCCATAGAGTTCAC
TTCATGCAATGAAACTGTGGTCATCCCTTGCATCGTCCGTAATGTGGAG
GCGCAAAGCACCGAAGAAATGTTTGTGAAGTGGAAAGTTGAACAAATCG
TATATTTTCATCTATGATGGAAATAAAAATAGCACTACTACAGATCAAA
35 ACTTTACCAGTGCAAAAATCTCAGTCTCAGACTTAATCAATGGCATTGC
CTCTTTGAAAATGGATAAGCGCGATGCCATGGTGGGAAACTACACTTGC
GAAGTGACAGAGTTATCCAGAGAAGGCAAAAACAGTTATAGAGCTGAAA
AACCAGCGGTTTCGTGGTTTTCTCCAAATGAAAAGATCCTCATTGTTA
TTTTCCCAATTTGGCTATACTCCTGTTCTGGGGAAAGTTTGGTATTTTA
40 AACTCAAATATAAATCCAGCCATAAGAAATAAGAGAATCATTCTGTGCTG
TCGTTGCCGGGCTGGTGTCTCACAGTCATCGTGGTTGTTGGAGCCATCCT
TCTCATCCAGGAGAAAAGCCCGTGAAGAATGCTTCTGGACTTGGCCTC
ATTGTAATCTCTACGGGGATATTAATACTACTTTCAGTACAATGTGTTTAT
45 GACAGCTTTTGGAAATGACCTCTTTCACCATTGCCATATTGATCACTCAA
GTGCTGGGCTACGTCTTGGTTCGGGCTGTGTCTCTGCATCATGG
CATGTGAGCCAGTGCACGGCCCCCTTTGATTTTCAGGTTTGGGGATCAT
AGCTCTAGCAGAACTACTTGGATTAGTTTATATGAAGTTTGTGCTTCC
50 AACCAGAGGACTATCCAACCTCCTAGGAATAGGTGAAGGGAAGTGACGG
ACTGTAACCTGGAAGTCAGAAATGGAAGAATACAGTTGTCTAAGCACCAGG
TCTTACGACTCACAGCTGGAAGGAACAGACAACAGTAAGTACTGACTTCCATC
CAGGAAAACATGTCACATAAATGATTACTAAGTTTATATTCAAAGCAGCTGT
ACTTTACATAATAAAAAAATATGATGTGCTGTGTAACCAATTGGAATCCCA
55 TTTTCTATTGTTTCTACTCAACTAGGGGCAAACGTTTCAGGGGCAACTTCCA
AGAATGATGCTTGTTAGATCCTAGAGTCTCTGAACACTGAGTTTAAATTGAT
TCCGAGTGAGACTCGCCAAGCACTAACCTGAGGGTTAGTTACCCAGAGATA
CCTATGAAAAACAGTGGTATCCAGCAAGCCTTAGTAAACTCAGGTTGCCAG

60

65

ES 2 716 735 T3

CAGCTTTGCCACTTCCGCTGCTAGCTGAATAACAAGACTGCCACTTCTGGGT
CATAGTGATAGAGACTGAAGTAGAAAAACGAATGTGGTTGGGCAAATCCCG
5 TGTGGCCCCTCTGTGTGCTATGATATTGATGGCACTGGTGTCTTCATTCTGG
GGGTTGCCATCATTACACACACCCCTTTGACATACAGTGCACCCAGTTTT
GAATACATTTTTTTTGCACCCTGTCCCGTTCTGCTACTTTGATTTGCGTTATG
ATATATATATATATATAATAACCTTTTCTCCTCTTTAAACATGGTCCTGTGA
CACAATAGTCAGTTGCAGAAAAGGAGCCAGACTTATTCGCAAAGCACTGTGC
10 TCAAACCTTTCAGAAAAAAGGAAAAAAGCTATAGTTGTAACAT
ATGTATTCCAGACCTCTGGTTTAAAGGCAAAAGAAAAAATCTACAGTGT
TTCTTCTCATGTTTTCTGATCGGAGGCATGACAAAGCAAGACTGAAATCTGA
ACTGTGTCTCCTGCATGGCAACACGTGTCTCCGTCAGGCCCTCGCAAGCCC
GGGGAGGGGTTCTACGCCTCTTGTCTCTTTGTTGCATGCTGAACACTCATC
15 GCCTTCTACTGTATCCTGCCTCCTGCAGCCTCCCTCTTCCTCCTCCTCCT
CTTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCT
AAAACCTACCACATTCCCTACCCAGTTAGAAGAAAACCACCGTCCTGACAGTT
GTGATCGCATGGAGTACTTTTAGATTATTAGCACCTGTTTTTACCTCGTTTGT
20 GGGCGTGTGTGATGTGCACATGTATGAAGTCGGCACATGCACCTTCTGTAT
GGGCAGAGGCGTGGCATCTACAGAAGAGCAGATGCCAACTTTGTGCTTTTA
GTGAATACATTAAAAAAAAAAACAACGGTCCTTATTGAGTGGAAATTCTA
TTTGATGCAAATTTTGTAGCTCTTAAAGACTTTAAACTAGATAATGTGCCA
25 AGCTTTTAGGACTGCTCACCAGTGCCCTCTGAAGAAAACACCAGTACTTTTTC
CTGTTTGTGTAATAAAGGCATATTTGTATTTGTGTTTGCATCACTAATGGTTA
TTTCTTCTTAGTCCACTGAATGTTTCCATGTGCCTCTCGTATGCCAACTTTT
TGTCACTTTCATGTGGGGACCAAATGGTTTGTCTGTGGCAAACCTAAACCT
ATGACCTGCTGAGGCCTCTCAGAAAAGTACCACAGTACCAAGATAGTACT
30 TCGCAAAGAAAAGTAGGTTCCCTCCCTGGTTTTGTAGCTGTCGCCAATATTA
GCGTAATCCAAGGAGCTGAACGCCTTATATAAATCTGATGGCACCTGATG
CTTTTAGTTCTGAAAATATTTACACTCGGATCATGTTGTTGATGACTTAAACA
AAGTTTTGATGAAGAGAGCAAAAAAAGCAGGTGGATTTGGAACAGTTTC
35 AGGGTTTTTTTTGTTTTTTGTTTTTTGTTTTTTGTTTTTTTTTTTTATTTTTGTTT
TTCTGTTCTCTGTTAGAAAAGTCAGGTGTTCTCTGTCAGGCTATCTTTATAGT
CAATTTTTTTTACGAACTAAAGTAGTACCTTTTAAATATGTAGTCAACGCCCT
CTGCTCGGGGTTTCAAGTTTTGGGTCTTAACCAGCTGTCATGTTCTCTATGCTGC
40 CTGCCACTTGAGGCACTGAGTGCCCTAGACAGTCCCATCGGTGGTAGCCAG
GGAAACGAAAGACGAACTCAACTCTTGCTCCTAATAATCAACTCTCTGTATG
AAGGATGGCAGCATTAAAGAGTCTCCTGCCTGGGCATTATTGGGCCAGTTCA
CCCTCTTTAAATCAAACCCGCAGTGGCTCCCAGTTCTCGTCCCATCAGATTT
AAATTGCTAACAGTATGGGGGGCACCACGCATCTGTTTTGTCCACAATGCG
45 CTTTTCTCTCCCAAATCCCAGATTTCTGCTGTCATAGCCTCTATTCAATTTTTAT
TTATTGCTGCCCCTCCACTTATACAATCGTAGAGAGCAATGCCATTTGTCACT
TTCTGCAACAGTTTTTTGAGCCTTATGGCTGAATCCCATTTTTCTTCTCTTTC
AAACTGTTTGTCTCATTGCTCCTCCCGCACGGCTGTCCGTACAGTCAATCCAT
50 CCATCTGGGGGCCTCTTTCATCTCTCACCCCTCCTGGTGCTTCGTGGATCTCT
GCTTACCTCTGTGGGTTTTTTTTTTTTTTTGTGACTTATCTTCTCACTGGACT
TTAAGATTACTTCCACAGCGAAAGTGCTGCCTCCCTTTCTGCCCGCAGTGT
CTGCGTACTTTAGATACTACTCAGTGCTGACATTTGATGGCAAAGTTGCCT
GCACTTAAATTTCTCTTTTAAATAGGGTGAAGTACTAGAGTTGGAGTTTTTTCTC
55 TTTTTCTCTTTCT

CCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCTCTCTCTCTTTTTCTTTCTTTC
 TTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTTTTGACAAATCT
 5 CACAGGCTTTGAGAATTATAAAAAGGTGACAGTTCACCTGAAAATCACAGGT
 CTGGTCTGTTAAATTTGTTGAGAAATATCCGATTAAGTCTTGTGGCTGTG
 TCCTAATAGGCTCTCTTTTCAGGACGTTGTAGTCAATAGAGTGGCTGAACCAT
 ACTTGAGTTTATAAAGCTCAAAAACACTGATGCACCCACTCTGCTATTATCGTG
 TTAGTAAGAGTTCAGCTGTATATCATTGTCTAGGTTTATCTTGTCTACAGTG
 10 GGTATTCAAATATGGCCACCAGAGGATATGTGTAATATAAGCACCTGTATT
 TGCCTGTTGTTGAGAACTGGAGGGAAAAACAAAAATGTCTGGCAACCCTTT
 GCCTTTTTAACCGTAATTAATTGACAGTTTATTTAGAGATAAGAGTTTTCAA
 AAATCTCTTAAC TGCCACAACCCACAGAGGGTCTTGTTTTGCCATCTTCAGT
 GGCTCACAGATATGATCCAAGTTAACTTGAAAGAGATGAGCAGTACCCAGG
 15 AAATTGTCCTGCCTTTAACTCTGGCTGCCTTAATTATGACTGTTAATGCTG
 AATTTCCATCCGCTAGTGTGTTGAGGGTAAAGAAAAGCCTTTTTAAATAA
 GTATTTCTGTAAAACGGCATCGGTGGGATCTTCTGTGTGCTATCACGGGTG
 AAAGAGGGAAACATTTCTTATTTTTATTAAGCAGAGCATTATTTACAGAAAG
 CCATTGTTGAGAATTAGTTCCACATCATATAAATATCCATTAACCATTTCTA
 20 AATTGTAAGAGAACTCCAGTGTGCTATGCACAAGGAACCTCCTGGGGGC
 CTTTTTTGTCATAGCAATTAAGGTATGCTATTTGTCAGTAGCCATTTTTTGC
 AGTGATTTAAAGACCAAAGTTGTTTTACAGCTGTGTTACCCTTAAAGGTTTT
 TTTTTATGTATTAATCAATTTATCACTGTTTGAAGCTTTGAATACCTGCAA
 25 TCTTTGCCAAGATACTTTTTTATTTAAAAAAATAACTGTGTAATATTACCCT
 GTAATATTATATATACTTAATAAAACATTTTAAGCTA(sec. con núm de ident.: 3)

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

30 MWPLAAALLLGSCCCGSAQLLFSNVNSIEFTSCNETVVIPCIVRNVEAQSTEE
MFVKWKLNKSYIFIYDGNKNSTTTDQNFTSAKISVSDLINGIASLKMDKRDA
MVGNYTCEVTELSREGKTVIELKNRTVSWFSPNEKILIVIFPILAILLFWGKFG
 ILTLKYKSSHTNKRIILLVAGLVLTIVVVGAILLIPGEKPVKNASGLGLIVISTG
 35 ILILLQYNVFMATFGMTSFTIALITQVLGYVLALVGLCLCIMACEPVHGPLLISG
 LGHIALAELLGLVYMKFVASNQRTIQPPNR(sec. con núm de ident.: 4)

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

40 GCCTACACCGGGAGAGCAGGGAGGAGGAGTTGGACTGAGGTTGGGCGGCTC
 CGAGGTCCAGGGCGAGCTTGCCAGAGGGAGTAGAGAGCAGCGGGGCTGC
 GCAGGGACGCGTGCCGTGAGTTCCGGTGAGCGTGTGTGCCATGCTCCCGT
 45 CTTTCAGGCCGCCCAGGACACGAAGCCGGAAGAGAGCTGGCTGGAGGGAC
 GGGGGCCGTGAGCAGAGAGTGAACCCGCGCAGCCCCGGGACAGGCTGA
 TTCTTGCGCTCTCCGCCGAGCCTGCCAGGGCTGGGTGTGAGGCTGGCGT
 CACGTCAACGAGCAGAGGCGGCCAGGCGGGGCGGAGTGC GCGTGC GCGGG
 GCGGCGAGCACGCGCGCGCGCACCCCCGGGCAGCCTGGGCGGCCGCTCC
 50 TGCCTGTC ACTGCTGCGGCGCTGCTGGTCCGTCGTTCCCTTGAAGGCAGCA
 GCGGAGGCGGCGCTGCTCCAGACACCTGCGGCGGCGACCCCCGGCGGCG
 CGGAGATGTGGCCCTTGGCGGGCGGCGCTGTTGCTGGGCTCCTGCTGCT
 GCGGTTCACTCAACTACTGTTTAGTAACGTCAACTCCATAGAGTTCAC
 55 TTCATGCAATGAACTGTGGTCATCCCTTGCATCGTCCGTAATGTGGAG
 GCGCAAAGCACCGAAGAAATGTTTGTGAAGTGAAGTTGAACAAATCG
 TATATTTTCATCTATGATGGAATAAAAAATAGCACTACTACAGATCAAA

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

ACTTTACCAGTGCAAAAATCTCAGTCTCAGACTTAATCAATGGCATTGC
 CTCTTTGAAAATGGATAAAGCGCGATGCCATGGTGGGAAACTACACTTGC
 5 GAAGTGACAGAGTTATCCAGAGAAGGCCAAAACAGTTATAGAGCTGAAA
 AACCGCACGGCCTTCAACACTGACCAAGGATCAGCCTGTTCTTACGAGG
 AGGAGAAAGGAGGTTGCAAATTAGTTTCGTGGTTTTCTCCAATGAAAA
 GATCCTCATTGTTATTTTCCCAATTTTGGCTATACTCCTGTTCTGGGGAA
 10 AGTTTGGTATTTTAACTCAAATATAAATCCAGCCATACGAATAAGAG
 AATCATTCTGCTGCTCGTTGCCGGGCTGGTGCTCACAGTCATCGTGGTT
 GTTGGAGCCATCCTTCTCATCCCAGGAGAAAAGCCCGTGAAGAATGCTT
 CTGGACTTGGCCTCATTGTAATCTCTACGGGGATATTAATACTACTTCA
 15 GTACAATGTGTTTATGACAGCTTTTGGAAATGACCTCTTTCACCATTGCC
 ATATTGATCACTCAAGTGCTGGGCTACGTCCTTGCTTTGGTGGGGCTGT
 GTCTCTGCATCATGGCATGTGAGCCAGTGCACGGCCCCCTTTTGATTTT
 AGGTTTGGGGATCATAGCTCTAGCAGAACTACTTGGATTAGTTTATATG
 AAGTTTGTGCTTCCAACCAGAGGACTATCCAACCTCCTAGGAAAGCTG
 20 TAGAGGAACCCCTTAAACGAATAGGTGAAGGGAAGTGACGGACTGTAACCT
 GGAAGTCAGAAATGGAAGAATACAGTTGTCTAAGCACCAGGTCTTCACGAC
 TCACAGCTGGAAGGAACAGACAACAGTAACTGACTTCCATCCAGGAAAACA
 TGTCACATAAATGATTACTAAGTTTATATTCAAAGCAGCTGTACTTTACATA
 25 AAAAAAAAATATGATGTGCTGTGTAACCAATTGGAATCCCATTTTCTATT
 GTTCTACTCAACTAGGGGCAAACGTTTCAGGGGCAACTCCAAGAATGATG
 CTTGTTAGATCCTAGAGTCTCTGAACACTGAGTTTAAATTGATTCCGAGTGA
 GACTCGCCAAGCACTAACCTGAGGGTTAGTTACCCAGAGATACCTATGAAA
 AACAGTGGTATCCAGCAAGCCTTAGTAAACTCAGGTTGCCAGCAGCTTTGCC
 30 ACTTCCGCTGCTAGCTGAATAACAAGACTGCCACTTCTGGGTGATAGTGATA
 GAGACTGAAGTAGAAAAACGAATGTGGTTGGGCAAATCCCGTGTGGCCCCCT
 CTGTGTGCTATGATATTGATGGCACTGGTGTCTTCATTCTTGGGGGTTGCCAT
 CATTACACACACCCCTTTGACATACAGTGCACCCCAAGTTTGAATACATTT
 35 TTTTGCACCCTGTCCCGTTCTGCTACTTTGATTTGCGTTATGATATATATAT
 ATATATATAATACCTTTTCTCCTCTTAAACATGGTCTGTGACACAATAGTC
 AGTTGCAGAAAGGAGCCAGACTTATTCGCAAAGCACTGTGCTCAAACCTTTC
 AGAAAAAAGGAAAAAAGCTATAGTTGTAACATATGTATTCCAG
 ACCTCTGGTTTAAAGGCAAAAGAAAAAATCTACAGTGTTCCTCTCATGT
 40 TTTCTGATCGGAGGCATGACAAAGCAAGACTGAAATCTGAACTGTGTCTCCT
 TGATGGCAACACGTGTCTCCGTCAAGCCCTCGCAAGGCCCGGGGAGGGGGT
 TCTACGCCTCTTGTCTCTTGTGTCATGCTGAACACTCATCGCCTTCTACTG
 TATCCTGCCTCCTGCAGCCTCCCTCTTCCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCT
 45 CCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCAAGTTTGAAGGTCAAACAAAACCTACCAC
 ATTCCCTACCCAGTTAGAAGAAAACCACCGTCTGACAGTTGTGATCGCATG
 GAGTACTTTTAGATTATTAGCACCTGTTTTTACCTCGTTTGTGGGCGTGTG
 TATGTGCACATGTATGAAGTCGGCACATGCACCTTCTGTATGGGCAGAGGCG
 TGGCATCTACAGAAGAGCAGATGCCAACTTTGTGCTTTTGTGAAATACATTA
 50 AAAAAAAAAAACAACGGTCTTATTGAGTGGAATTCTATTTGATGCAAAAT
 ATTTGAGCTCTTAAAGACTTTAAACTAGATAATGTGCCAAGCTTTTAGGAC
 TGCTCACCAGTGCCCTCTGAAGAAACACCAGTACTTTTTCTGTTTGTGTAAT
 AAAGGCATATTTGTATTTGTGTTTGCATCACTAATGGTTATTTCTTCTTAGTC
 55 CACTGAATGTTTCCATGTGCCTCTCGTATGCCAAACTTTTTGTATCTTTCAT
 GTGGGGACCAAATGGTTTGTCTGTGGCAAACCTAAACCTATGACCTGCTGAG

60

65

5 MWPLAAALLLGSCCCGSAQLLFSNVNSIEFTSCNETVVIPCIVRNVEAQSTEE
MVFKWKLKNSYIFIYDGNKNSTTTDQNFSAKISVSDLINGIASLKMDKRDA
MVGNYTCEVTELSREGKTVIELKNRTAFNTDQGSACSYYEEKGGCKLVS
FSPNEKILIVIFPILAILLFWGKFGILTLKYKSSHTNKRILLVAGLVLTIVVVV
10 **AILLIPGEKPVKNASGLGLIVISTGILILLQYNVFMATAFGMTSFTIAILITQVLGYV**
LALVGLCLCIMACEPVHGPLLISGLGIIAELLAELGLVYMKFVASNQRTIQPPRKAV
EEPLNEc(sec. con núm de ident.: 6)

Isoforma 4 de ARNm de CD47 de ratón (XM 006521808.1)

15 GCCTACACCGGGAGAGCAGGGAGGAGGAGTTGGACTGAGGTTGGGCGGCTC
CGAGGTCCAGGGCGAGCTTGGCCAGAGGGAGTAGAGAGCAGCGGGCTGC
GCAGGGACCGGTGCCGTGAGTTCCGGTGAGCGTGTGTGCCATGCTCCCGT
20 CTTTCAGGCCCGCCAGGACACGAAGCCGGAAGAGAGCTGGCTGGAGGGAC
GGGGCCGTGAGCAGAGAGTGCAACCCGCGCAGCCCCGGGACAGGCTGA
TTCTTGGCGCTCTCCGCCGAGCCTGCCAGGGCTGGGTGTGAGGCTGGCGT
CACGTCAACGAGCAGAGGGCGGCCAGGCGGGGCGGAGTGCGCGTGCGCGGG
GCGGCGAGCACGCGCGCGCGCACCCCCGGGCAGCCTGGGCGGCCGCTCC
25 TGCCTGTACTGCTGCGGCGCTGCTGGTCCGTCGTTTCCCTGAAGGCAGCA
GCGGAGGCGGCGGCTGCTCCAGACACCTGCGGCGGCGACCCCCGGCGGCG
CGGAGATGTGGCCCTTGGCGGCGGCGCTGTTGCTGGGCTCCTGCTGCT
GCGGTTACAGCTCAACTACTGTTTAGTAACGTCAACTCCATAGAGTTAC
30 TTCATGCAATGAACTGTGGTCATCCCTTGCATCGTCCGTAATGTGGAG
GCGCAAAGCACCGAAGAAATGTTTGTGAAGTGGAAGTTGAACAAATCG
TATATTTTCATCTATGATGAAATAAAAATAGCACTACTACAGATCAA
ACTTTACCAGTGCAAAAATCTCAGTCTCAGACTTAATCAATGGCATTGC
CTCTTTGAAAATGGATAAGCGCGATGCCATGGTGGGAAACTACACTTGC
35 GAAGTGACAGAGTTATCCAGAGAAGGCAAAACAGTTATAGAGCTGAAA
AACCGCACGGTTTCGTGGTTTTCTCCAAATGAAAAGATCCTCATTGTTA
TTTTCCCAATTTGGCTATACTCCTGTCTGGGAAAAGTTTGGTATTTTA
ACACTCAAATATAAATCCAGCCATACGAATAAGAGAATCATTCTGCTGC
40 TCGTTGCCGGGCTGGTGTCTACAGTCATCGTGGTTGTTGGAGCCATCCT
TCTCATCCCAGGAGAAAAGCCCGTGAAGAATGCTTCTGGACTTGGCCTC
ATTGTAATCTCTACGGGGATATTAATACTACTTTCAGTACAATGTGTTTAT
GACAGCTTTTGGAAATGACCTCTTTCACCATTGCCATATTGATCACTCAA
45 GTGCTGGGCTACGTCCTTGGTTCGGGCTGTGTCTCTGCATCATGG
CATGTGAGCCAGTGACGCGCCCCCTTTGATTTTCAGGTTTGGGGATCAT
AGCTCTAGCAGAACTACTTGGATTAGTTTATATGAAGTTTGTGCTTCC
AACCAGAGGACTATCCAACCTCCTAGGAAAGCTGTAGAGGAACCCCTTA
ACGCATTTAAAGAGTCAAAGGAATGATGAATGACGAATAGGTGAAGGG
50 AAGTGACGGACTGTAACCTGGAAGTCAGAAATGGAAGAATACAGTTGTCTA
AGCACCAGGTCTTACGACTCACAGCTGGAAGGAACAGACAACAGTAACTG
ACTTCCATCCAGGAAAACATGTACATAAATGATTACTAAGTTTATATTCAA
AGCAGCTGTACTTTACATAATAAAAAAATATGATGTGCTGTGTAACCAATT
GGAATCCCATTTTTCTATTGTTTCTACTCAACTAGGGGCAAACGTTTCAGGG
55 GCAACTTCCAAGAAATGATGCTTGTAGATCCTAGAGTCTCTGAACACTGAGT
TTAAATTGATTCAGAGTGAGACTCGCCAAGCACTAACCTGAGGGTTAGTTAC
CCAGAGATACCTATGAAAAACAGTGGTATCCAGCAAGCCTTAGTAACTCA

60

65

5 GGTGCGCAGCAGCTTTGCCACTTCCGCTGCTAGCTGAATAACAAGACTGCCA
 CTTCTGGGTCATAGTGATAGAGACTGAAGTAGAAAAACGAATGTGGTTGGG
 CAAATCCCGTGTGGCCCTCTGTGTGCTATGATATTGATGGCACTGGTGTCT
 TCATTCTTGGGGGTTGCCATCATTACACACACCCCTTTGACATACAGTGCA
 10 CCCCAGTTTTGAATACATTTTTTTTTGCACCCTGTCCCGTTCTGCTACTTTGATT
 TCGTATGATATATATATATATAATAACCTTTTCTCCTCTTTAAACATG
 GTCCTGTGACACAATAGTCAGTTGCAGAAAGGAGCCAGACTTATTTCGAAA
 GCACTGTGCTCAAACCTTTCAGAAAAAAGGAAAAAAAAAAAAAAAAAGCTATAG
 TTGTAACATATGTATTCCAGACCTCTGGTTTAAAGGCAAAGAAAAAAAAAAT
 15 CTACAGTGTCTTCTCATGTTTTCTGATCGGAGGCATGACAAAGCAAGACT
 GAAATCTGAACGTGTCTCCTGCATGGCAACACGTGTCTCCGTCAGGCCCTC
 GCAAGGCCCGGGAGGGGTTCTACGCCTCTTGTCTCTTTGTTGCATGCTGA
 AACTCATCGCCTTCTACTGTATCCTGCCTCCTGCAGCCTCCCTCTTCTCTC
 TCCTCTTCTCTTCT
 20 AGGTCAAACAAAACCTACCACATTCCCTACCCAGTTAGAAGAAAACCACCGT
 CCTGACAGTTGTGATCGCATGGAGTACTTTTAGATTATTAGCACCTGTTTTTA
 CCTCGTTTGTGGGCGTGTGTGATGTGCACATGTATGAAGTCGGCACATGCA
 CCTTCTGTATGGGCAGAGGCGTGGCATCTACAGAAGAGCAGATGCCAACTT
 25 TGTGCTTTTAGTGAATACATTAAAAAAAAAAAAAACCAACGGTCTTATTGAGT
 GGAATTCTATTTGATGCAATATTTGAGCTCTTTAAGACTTTAAAACCTAGAT
 AATGTGCCAAGCTTTTAGGACTGCTCACCAGTGCCTCTGAAGAAACACCAG
 TACTTTTCTGTTTGTGTAATAAAGGCATATTTGTATTTGTGTTTGCATCAC
 30 TAATGGTTATTTCTTCTTAGTCCACTGAATGTTTCCATGTGCCTCTCGTATGC
 CAACTTTTTGTATCTTTTATGTGGGGACCAAATGGTTTGTCTGTGGCAAA
 CCTAAACCTATGACCTGCTGAGGCCTCTCAGAAAACTGACCACAGTACCAA
 GATAGTACTTCGCAAAGAAAAGTAGGTTCCCTCCCTGGTTTTGTAGCTGTCTG
 35 CCAATATTAGCGTAATTCCAAGGAGCTGAACGCCTTTATATAAATCTGATGG
 CACCTGATGCTTTAGTCTGAAAATATTTACACTCGGATCATGTTGTTGATG
 ACTTAAACAAAGTTTTGATGAAGAGAGCAAAAAAAAAAAGCAGGTGGATTTGG
 AACAGTTTCAGGGTTTTTTTTGTTTTTTGTTTTTTGTTTTTTGTTTTTTTTTTT
 ATTTTTGTTTTTCTGTCTCTGTAGAAAAGTCAGGTGTTCTCTGTCTCAGGCTA
 40 TCTTTATAGTCAATTTTTTTTACGAACTAAAGTAGTACCTTTTAAATATGTAGT
 CAACGCCCTCTGCTCGGGGTTTCAAGTTTGGGTCTTAACCAGCTGTATGTTT
 TCTATGCTGCCTGCCACTTGAGGCCTGAGTGCCCTAGACAGTCCCATCGGT
 GGTAGCCAGGGAAACGAAAGACGAACTCAACTCTTGCTCCTAATAATCAAC
 45 TCTCTGTATGAAGGATGGCAGCATTAAAGAGTCTCCTGCCTGGGCATTATTG
 GGCCAGTTCACCCTCTTAAATCAAACCCGAGTGGCTCCCAGTCTCGTCC
 CATCAGATTTAAATTGCTAACAGTATGGGGGGCACCACGCATCTGTTTTGTC
 CCACAATGCGTTTTTCTCTCCCAAATCCCGATTTCTGCTGTATAGCCTCTAT
 50 TCAATTTTTATTTATTTGCTGCCCCTCACTTATACAATCGTAGAGAGCAATGC
 CATTTGTCACCTTTCTGCAACAGTTTTTTGAGCCTTTATGGCTGAATCCCATTT
 TTCTTCTTTCAAACGTGTTGCTCCATTGCTCCTCCCGCACGGCTGTCCGTA
 CAGTCATCCCATCCATCTGGGGGCCTTTTCATCTCTCACCCCTTCTGGTGCT
 TCGTGGATCTCTGCTTACCTCTGTGGGTTTTTTTTTTTTTTTTTTGACTTATTCTT
 55 CTCACTGGACTTTAAGATTACTTCCACAGCGAAAGTGCTGCCTCCCTTTTCTG
 CCCGAGTGTCTGCGTACTTTAGATACTACTCAGTGCTGACATTTGATGGC
 AAAAGTTGCCTGCACTTAAATTTCTCTTTTTAATAGGGTGAACCTAGAGTTGG
 AGTTTTTTTCTTTTTTCTTTTTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT

60

65

5
 TCTCTCTCTCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCTCTCTCTCT
 TTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTT
 TTTGACAAATCTCACAGGCTTTGAGAATTATAAAAGGTGACAGTTCACCTGA
 AAATCACAGGCTGGTCTGTTTAAATTGTTGAGAAATATCCGATTAAGGTC
 10 TGTGGCTGTGTCCTAATAGGCTCTTTTCAGGACGTTGTAGTCAATAGAGT
 GGCTGAACCATACTTGAGTTTATAAAGCTCAAAAACTGATGCACCCACTCTG
 CTATTATCGTGTTAGTAAGAGTTCAGCTGTATATCATTGTCTAGGTTTATCTT
 GTCCTACAGTGGGTATCAAAATATGGCCACCAGAGGATATGTGTAATATA
 AGCACCTGTATTTGCCTGTTGTTGAGAAGTGGAGGGAAAACAAAAAATGTC
 15 TGGCAACCCTTTGCCTTTTTAACCGTAATTAATTGACAGTTTATTAGAGATA
 AGAGTTTTCAAAAATCTCTTAACTGCCACAACCCACAGAGGGTCTGTTTTG
 CCATCTTCAGTGGCTCACAGATATGATCCAAGTAACTTGAAAGAGATGAGC
 AGTACCAGGAAATTGTCCTGCCTTAACTCTGGCTGTCCTAATTATGACT
 GTTTAATGCTGAATTTTCCATCCGTCTAGTGTGTTGAGGGTAAAGAAAAGCCT
 20 TTTTTAAATAAGTATTTCTGTAAAACGGCATCGGTGGGATCTTCTGTGTTGCT
 ATCACGGGTGAAAGAGGGAAACATTTCTTATTTTATTAAGCAGAGCATTAT
 TTACAGAAAGCCATTGTTGAGAATTAGTTCCACATCATATAAATATCCATT
 AACCATTTCTAAATTGTAAGAGAACTCCAGTGTGCTATGCACAAGGAACTCT
 CCTGGGGGCCTTTTTTGCATAGCAATTAAGGTATGCTATTTGTCAGTAGC
 25 CATTTTTGTCAGTGATTTAAAGACCAAAGTTGTTTTACAGCTGTGTTACCCTT
 AAAGGTTTTTTTTTATGTATTAATCAATTTATCACTGTTTGAAGCTTTGAA
 TACCTGCAATCTTTGCCAAGATACTTTTTTATTTAAAAAATAACTGTGTAA
 ATATTACCCTGTAATATTATATACTTAATAAAACATTTTAAGCTA
 (sec. con núm de ident.: 7)

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

35 MWPLAAALLLGSCCGSAQLLFSNVNSIEFTSCNETVVIPCIVRNVEAQSTEE
 MFVKWKLNKSYIFIYDGNKNSTTTDQNFTSAKISVSDLINGIASLKMDKRDA
 MVGNYTCEVTELSREGKTVIELKNRTVSWFSPNEKILIVIFPILAILLFWGKFG
 ILTLKYSSHTNKRIILLVAGLVLTIVVVVGAILLIPGEKPVKNASGLGLIVISTG
 40 ILILLQYNVFMATAFGMTSFTIAILITQVLGYVLALVGLCLCIMACEPVHGPLLISG
 LGHIALAELLGLVYMKFVASNQRTIQPPRKAVEEPLNAFKESKGMNDE
 (sec. con núm de ident.: 8)

Isoforma 1 de ARNm de CD47 humano (XM 005247909.1)

45 AGTGGGAGCGCGCGTGCAGCCTGGGCAGTGGGTCCTGCC
 TGTGACGCGCGCGCGGCGGTCGGTCTGCCTGTAACGGCGGCGGCGGCTGCT
 GCTCCGGACACCTGCGGCGGCGGCGGCGACCCCGCGGCGGGCGCGGAGAT
 GTGGCCCCGTGGTAGCGGCGCTGTTGCTGGGCTCGGCGTGCTGCGGATC
 50 AGCTCAGCTACTATTTAATAAAAACAAAATCTGTAGAATTCACGTTTGTGTA
ATGACACTGTCGTCATTCCATGCTTTGTTACTAATATGGAGGCACAAAA
CACTACTGAAGTATACGTAAAGTGGAAATTTAAAGGAAGAGATATTTAC
ACCTTTGATGGAGCTCTAAACAAGTCCACTGTCCCCACTGACTTTAGTA
GTGCAAAAATTGAAGTCTCACAATTACTAAAAGGAGATGCCTCTTTGAA
 55 GATGGATAAGAGTGATGCTGTCTCACACACAGGAACTACACTTGTGAA
GTAACAGAATTAACCAGAGAAGGTGAAACGATCATCGAGCTAAAATATC
GTGTTGTTTCATGGTTTTCTCAAATGAAAATATTCTTATTGTTATTTTC
 60 CCAATTTTGTATACTCCTGTTCTGGGGACAGTTTGGTATTAAAACAC

65

5 TTAAATATAGATCCGGTGGTATGGATGAGAAAACAATTGCTTTACTTGT
TGCTGGACTAGTGATCACTGTCATTGTCATTGTTGGAGCCATTCTTTTC
GTCCCAGGTGAATATTCATTAAGAATGCTACTGGCCTTGGTTTAATTG
TGACTTCTACAGGGATATTAATATTACTTCACTACTATGTGTTTAGTACA
GCGATTGGATTAACCTCCTTCGTCATTGCCATATTGGTTATTACAGGTGA
10 TAGCCTATATCCTCGCTGTGGTTGGACTGAGTCTCTGTATTGCGGCGTG
TATACCAATGCATGGCCCTCTTCTGATTTTCAGGTTTGAGTATCTTAGCT
CTAGCACAATTACTTGGACTAGTTTATATGAAATTTGTGGAATAACTGAA
GTGAAGTGATGGACTCCGATTTGGAGAGTAGTAAGACGTGAAAGGAATACA
15 CTTGTGTTTAAAGCACCAATGGCCTTGAIGATTCACTGTITGGGGAGAAGAAACA
AGAAAAGTAACTGGTTGTCACCTATGAGACCCTTACGTGATTGTTAGTTAAG
TTTTTATTCAAAGCAGCTGTAATTTAGTTAATAAAAATAATTATGATCTATGTT
GTTTGCCCAATTGAGATCCAGTTTTTTGTTGTTATTTTTAATCAATTAGGGGC
20 AATAGTAGAATGGACAATTTCCAAGAATGATGCCTTTCAGGTCTTAGGGCCT
CTGGCCTCTAGGTAACCAGTTTAAATTGGTTCAGGGTGATAACTACTTAGCA
CTGCCCTGGTGATTACCCAGAGATATCTATGAAAACCAGTGGCTTCCATCAA
ACCTTTGCCAACTCAGGTTACACAGCAGCTTTGGGCAGTTATGGCAGTATGGC
25 ATTAGCTGAGAGGTGTCTGCCACTTCTGGGTCAATGGAATAATAAATTAAGT
ACAGGCAGGAATTTGGTTGGGAGCATCTTGTATGATCTCCGTATGATGTGAT
ATTGATGGAGATAGTGGTCCTTCTTGGGGTIGCCATTCCCACATTCCC
CCTTCAACAAACAGTGTAACAGGTCCTTCCCAGATTTAGGGTACTTTTATTG
30 ATGGATATGTTTTCTTTTATTACATAACCCCTTGAAACCCTGTCTTGTCTCT
CCTGTTACTTGCTTCTGCTGTACAAGATGTAGCACCTTTTCTCCTTTTGAAC
ATGGTCTAGTGACACGGTAGCACCAAGTTGCAGGAAGGAGCCAGACTGTTC
TCAGAGCACTGTGTTACACTTTTCAGCAAAAAATAGCTATGGTTGTAACATA
TGTATTCCCTTCTCTGATTGAAAGGCAAAAATCTACAGTGTTCCTTCACTTC
35 TTTTCTGATCTGGGGCATGAAAAAAGCAAGATTGAAATTTGAACTATGAGTC
TCCTGCATGGCAACAAAATGTGTGTCACCATCAGGCCAACAGGCCAGCCCTT
GAATGGGGATTATTACTGTTGTATCTATGTTGCATGATAAACATTTCATCAC
CTTCTCCTGTAGTCTCGCTCGTACTCCCCTTCCCCTATGATTGAAAAGTAA
40 ACAAAACCCACATTTCTATCCTGGTTAGAAGAAAATTAATGTTCTGACAGT
TGTGATCGCCTGGAGTACTTTTAGACTTTTAGCATTTCGTTTTTACCTGTTT
TGGATGTGTGTTTGTATGTGCATACGIATGAGATAGGCACATGCATCTTCTG
TATGGACAAAGGTGGGGTACCTACAGGAGAGCAAAGGTTAATTTTGTGCTT
45 TTAGTAAAAACATTTAAATACAAAGTTCCTTTATTGGGTGGAATTATATTGA
TGCAAATATTTGATCACTTAAAACCTTTAAAACCTTCTAGGTAATTTGCCACG
CTTTTTGACTGCTCACCAATACCCTGTA AAAATACGTAATTCTTCTGTTTGT
GTAATAAGATATTCATATTTGTAGTTGCATTAATAATAGTTATTTCTTAGTCC
ATCAGATGTTCCCGTGTGCCTCTTTATGCCAAATTGATTGTATATTTCATG
50 TGGGACCAAGTAGTTTGGCCATGGCAAACCTAAATTTATGACCTGCTGAGG
CCTCTCAGAAAACCTGAGCATACTAGCAAGACAGCTCTTCTTGAAAAA
ATATGTATACACAAATATATACGTATATCTATATATACGTATGTATATACAC
ACATGTATATTCTTCTTGTATTGTAGCTGICCAAAAATAATAACATATATA
GAGGGAGCTGTATTCTTTATACAAATCTGATGGCTCCTGCAGCACTTTTTC
55 CTTCTGAAAATATTTACATTTTGCTAACCTAGTTTGTACTTTAAAAATCAGT
TTTGATGAAAGGAGGGAAAAGCAGATGGACTTGAAAAAGATCCAAGCTCCT
ATTAGAAAAGGTATGAAAATCTTTATAGTAAAAATTTTTATAAACTAAAGT
GTACCTTTAATATGTAGTAAACTCTCATTATTTGGGGTTCGCTCTTGGATC

60

65

5
 10
 15
 20
 25
 30
 35
 40

TCATCCATCCATTGTGTTCTCTTTAATGCTGCCTGCCTTTTGAGGCATTCACT
GCCCTAGACAATGCCACCAGAGATAGTGGGGGAAATGCCAGATGAAACCAA
CTCTTGCTCTCACTAGTTGTCAGCTTCTCTGGATAAGTGACCACAGAAGCAG
GAGTCCTCCTGCTTGGGCATCATTGGGCCAGTTCCTTCTCTTTAAATCAGATT
TGTAATGGCTCCCAAATCCATCACATCACATTTAAATTCAGACAGTGTTT
TGCACATCATGTATCTGTTTTGTCCCATAATATGCTTTTTACTCCCTGATCCC
AGTTTCGCTGTTGACTCTCCATTAGTTTTATTTATTTGTGTGTTCTCACAGT
GACACCATTTGTCTTTTCTGCAACAACCTTCCAGCTACTTTTGCCAAATTC
TATTTGCTTCTCCTTCAAACATTCTCCTTTGCAGTTCCTCTTCATCTGTGTA
GCTGCTCTTTTGTCTCTTAACTTACCATTCCATATAGTACTTTATGCATCTGCG
TTAGTTCTATTAGTTTTTGGCCTTGCTCTTCTCCTTGATTTTAAAATTCCTTC
TATAGCTAGAGCTTTTCTTCTTTCATTCTCTTCTCCTGCAGTGTTTTGCATAC
ATCAGAAGCTAGGTACATAAGTTAAATGATTGAGAGTTGGCTGTATTTAGAT
TTATCACTTTTTAATAGGGTGAGCTTGAGAGTTTTCTTCTTCTGTTTTTTTT
TTTTGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTACTAATTCACATGCTCT
AAAAACCTTCAAAGGTGATTATTTTTCTCCTGGAAACTCCAGGTCCATTCTG
TTAAATCCCTAAGAATGTCAGAATTAATAACAGGGCTATCCCCTAATTG
GAAATATTTCTTTTTTTCAGGATGCTATAGTCAATTTAGTAAGTGACCACCAA
ATTGTTATTTGCACTAACAAAGCTCAAAACACGATAAGTTTACTCCTCCATC
TCAGTAATAAAAATTAAGCTGTAATCAACCTTCTAGGTTTTCTTGTCTTAA
AATGGGTATTCAAAAATGGGGATCTGTGGTGTATGTATGGAAACACATACT
CCTTAATTTACCTGTTGTTGGAAACTGGAGAAATGATTGTCGGGCAACCGTT
TATTTTTATGTATTTTATTTGGTTGAGGGATTTTTTTATAAACAGTTTTACT
TGTGTCATATTTTAAAATACTAACTGCCATCACCTGCTGGGGTCTTTTGTTA
GGTCATTTTCAGTGACTAATAGGGATAATCCAGGTAACCTTGAAGAGATGA
GCAGTGAGTGACCAGGCAGTTTTTCTGCCTTTAGCTTTGACAGTTCTTAATTA
AGATCATTGAAGACCAGCTTTCTCATAAATTTCTCTTTTTGAAAAAAGAAA
GCATTTGACTAAGCTCCTCTGTAAGACAACATCTTAAATCTTAAAAGTGTT
GTTATCATGACTGGTGAGAGAAGAAAACATTTTGTTTTTATTAATGGAGCA
TTATTTACAAAAGCCATTGTTGAGAATTAGATCCCACATCGTATAAATATC
TATTAACCATTCTAAATAAAGAGAACTCCAGTGTGCTATGTGCAAGATCCT
CTCTTGGAGCTTTTTTGCATAGCAATTAAGGTGTGCTATTTGTCAGTAGCC
ATTTTTTGCAGTGATTTGAAGACCAAGTTGTTTTACAGCTGTGTTACCGTT
AAAGGTTTTTTTTTATATGTATTAATCAATTTACTGTTTAAAGCTTT
GAATATCTGCAATCTTGGCCAAGTACTTTTTTATTTAAAAAAAACATAAC
TTTGTAATATTACCCTGTAATATTATATACTTAATAAAAACATTTTAAGCT

Δ (sec. con núm de ident.: 9)

45 **Isoforma 1 de aminoácidos de CD47 humano (XP_005247966.1)**

50
 55

MWPLVAALLGSACCGSAQLLFNKT̄KSVEFTFC̄NDTVVIPC̄FVTNMEAQNT
TEVYVKWKF̄KGRDIYTF̄DGALNKSTVPTDF̄SSAKIEVSQ̄LLKGDASLKMDK
SDAVSHTGNYTCEVTELTREGETH̄ELKYRVVSWF̄SPNENILIVIFPIFAILLFW
GQFGIKTLKYRSGMDEKTIALLVAGLVITVIVIVGAILFVPGEYSLKNATGLGLI
VTSTGILILLHYV̄FSTAIGLTSF̄VIAILVIQVIĀYILAVVGLSLCIAACIPMHGPLLI
SGLSILALAOLLGLVYMKFVE

(sec. con núm de ident.: 10)

60 **Isoforma 2 de ARNm de CD47 humano (NM_198793.2)**

65

5 GGGGAGCAGGCGGGGGAGCGGGCGGGAAGCAGTGGGAGCGCGCGTGC GCG
 CGGCCGTGCAGCCTGGGCAGTGGGTCCTGCCTGTGACGCGCGGGCGGGTC
 GGTCTGCCTGTAACGGCGGGCGGGCTGCTGCTCCAGACACCTGCGGGCGG
 CGGCGGGCAGCCCCGCGGGCGGGCGGGAGATGTGGCCCCCTGGTAGCGGGC
 10 CTGTTGCTGGGCTCGGCGTGCTGCGGATCAGCTCAGCTACTATTTAATA
AAACAAAATCTGTAGAATTCACGTTTTGTAATGACACTGTCGTCATTCC
ATGCTTTGTTACTAATATGGAGGCACAAAACACTACTGAAGTATACGTA
AAGTGGAAATTTAAAGGAAGAGATATTTACACCTTTGATGGAGCTCTAA
ACAAGTCCACTGTCCCCACTGACTTTAGTAGTGCAAAAATTGAAGTCTC
 15 ACAATTACTAAAAGGAGATGCCTCTTTGAAGATGGATAAGAGTGATGCT
GTCTCACACACAGGAACTACACTTGTGAAGTAACAGAATTAACCAGAG
AAGGTGAAACGATCATCGAGCTAAAATATCGTGTTGTTTCATGGTTTTC
 TCCAAATGAAAATATTCCTTATTGTTATTTTCCCAATTTTGTCTATACTCC
 TGTTCTGGGGACAGTTTGGTATTAACAACACTTAAATATAGATCCGGTGG
 20 TATGGATGAGAAAACAATTGCTTTACTTGTGCTGGACTAGTGATCACT
GTCATTGTCATTGTTGGAGCCATTCTTTTCGTCCCAGGTGAATATTCATT
 AAAGAATGCTACTGGCCTTGGTTAATTGTGACTTCTACAGGGATATTA
 ATATTACTTCACTACTATGTGTTTAGTACAGCGATTGGATTAACCTCCTT
 25 CGTCATTGCCATATTGGTTATTCAGGTGATAGCCTATATCCTCGCTGTG
GTTGGACTGAGTCTCTGTATTGCGGGCGTGTATACCAATGCATGGCCCTC
 TTCTGATTTAGGTTTGTGAGTATCTTAGCTCTAGCACAAATTAATTGGACTA
 GTTATATGAAAATTTGTGGCTTCCAATCAGAAGACTATAACAACCTCCTA
 30 GAATAACTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGGACTCCGATTTGGAGAGTAGTAAGACG
 TGAAAGGAATACACTTGTGTTAAGCACCATTGGCCTTGATGATTCAGTGTG
 GGGAGAAGAAACAAGAAAAGTAACTGGTTGTCACCTATGAGACCCTTACGT
 GATTGTTAGTTAAGTTTTTATTCAAAGCAGCTGTAATTTAGTTAATAAAAATA
 35 ATTATGATCTATGTTGTTTGCCCAATTGAGATCCAGTTTTTTGTTGTTATTTTT
 AATCAATTAGGGGCAATAGTAGAATGGACAATTTCCAAGAATGATGCCTTT
 CAGGTCCTAGGGCCTCTGGCCTCTAGGTAACCAGTTTAAATTGGTTCAGGGT
 GATAACTACTTAGCACTGCCCTGGTGAATTACCCAGAGATATCTATGAAAACC
 AGTGGCTTCCATCAAACCTTTGCCAACTCAGGTTACAGCAGCTTTGGGCAG
 40 TTATGGCAGTATGGCATTAGCTGAGAGGTGTCTGCCACTTCTGGCTCAATGG
 AATAATAAATTAAGTACAGGCAGGAATTTGGTTGGGAGCATCTTGTATGATC
 TCCGTATGATGTGATATTGATGGAGATAGTGGTCCTCATTCTTGGGGGTTGC
 CATTCCCACATTCCCCCTTCAACAAACAGTGTAACAGGTCCTTCCCAGATTT
 45 AGGGTACTTTTATTGATGGATATGTTTTCTTTTATTACATAACCCCTTGAA
 ACCCTGTCTTGTCCCTCCTGTTACTTGTCTCTGCTGTACAAGATGTAGCACCTT
 TTCTCCTCTTTGAACATGGTCTAGTGACACGGTAGCACCAGTTGCAGGAAGG
 AGCCAGACTTGTTCTCAGAGCACTGTGTTACACTTTTCAGCAAAAATAGCT
 ATGGTTGTAACATATGTAATCCCTTCCCTCTGATTTGAAGGCAAAAATCTACA
 50 GTGTTTCTTCACTTCTTTTCTGATCTGGGGCATGAAAAAAGCAAGATTGAAA
 TTTGAACTATGAGTCTCCTGCATGGCAACAAAATGTGTGTCACCATCAGGCC
 AACAGGCCAGCCCTTGAATGGGGATTTATTACTGTTGTATCTATGTTGCATG
 ATAAACATTCATCACCTTCCCTCCTGTAGTCCTGCCTCGTACTCCCCTTCCCCT
 55 ATGATTGAAAAGTAAACAAAACCCACATTTCCCTATCCTGGTTAGAAGAAAA
 TTAATGTTCTGACAGTTGTGATCGCCTGGAGTACTTTTAGACTTTTAGCATTC
 GTTTTTTACCTGTTTGTGGATGTGTGTTTGTATGTGCATACGTATGAGATAGG
 CACATGCATCTTCTGTATGGACAAAGGTGGGGTACCTACAGGAGAGCAAAG

60

65

5 GTTAATTTTGTGCTTTTAGTAAAAACATTTAAATACAAAGTTCTTTATTGGGT
 GGAATTATATTTGATGCAAATATTTGATCACTTAAAACCTTTTAAAACCTTCTA
 GGTAATTTGCCACGCTTTTTGACTGCTCACCAATACCCTGTAAAAATACGTA
 ATTCCTCCTGTTTGTGTAATAAGATATTCATATTTGTAGTTGCATTAATAATA
 10 GTTATTTCTTAGTCCATCAGATGTTCCCGTGTGCCTCTTTTATGCCAAATTGA
 TTGTCATATTTTCATGTTGGGACCAAGTAGTTTGCCCATGGCAAACCTAAATT
 TATGACCTGCTGAGGCCTCTCAGAAAACCTGAGCATACTAGCAAGACAGCTC
 TTCTTGAAAAAAAAAATATGTATACACAAATATATACGTATATCTATATATA
 15 CGTATGTATATACACACATGTATATTCTTCCTTGATTGTGTAGCTGTCCAAAA
 TAATAACATATATAGAGGGAGCTGTATTCTTTATACAAATCTGATGGCTCC
 TGCAGCACTTTTTCTTCTGAAAATATTTACATTTTGCTAACCTAGTTTGTTA
 CTTTAAAAATCAGTTTTGATGAAAGGAGGGAAAAGCAGATGGACTTGAAAA
 AGATCCAAGCTCCTATTAGAAAAGGTATGAAAATCTTTATAGTAAAAATTTT
 20 TATAAACTAAAGTTGTACCTTTTAAATATGTAGTAAACTCTCATTTATTTGGGG
 TTCGCTCTTGGATCTCATCCATCCATTGTGTTCTCTTAAATGCTGCCTGCCTTT
 TGAGGCATTCAGTCCCTAGACAATGCCACCAGAGATAGTGGGGGAAAATGC
 CAGATGAAACCAACTCTTGCTCTCACTAGTTGTCAGCTTCTCTGGATAAGTG
 ACCACAGAAGCAGGAGTCTCTGCTTGGGCATCATTGGGCCAGTTCCCTTCT
 25 CTTTAAATCAGATTTGTAATGGCTCCCAAATCCATCACATCACATTTAAATT
 GCAGACAGTGTTTTGCACATCATGTATCTGTTTTGTCCATAATATGCTTTTT
 ACTCCCTGATCCCAGTTTCTGCTGTTGACTCTTCCATTAGTTTATTTATTGT
 GTGTTCTCACAGTGACACCATTGTCCTTTTCTGCAACAACCTTTCCAGCTAC
 TTTTGGCAAATTTCTATTTGCTTCTCCTTCAAACATTCTCCTTTGACAGTTCT
 30 CTTCATCTGTGTAGCTCTTTTTGTCTCTTAACTTACCATTCTATAGTACTT
 TATGCATCTCTGCTTAGTTCTATTAGTTTTTTGGCCTTGCTCTTCTCCTTGATT
 TAAAAATTCCTTCTATAGCTAGAGCTTTTCTTTCTTTCATTCTCTCTCCTGCA
 GTGTTTTGCATACATCAGAAGCTAGGTACATAAGTTAAATGATTGAGAGTTG
 35 GCTGTATTTAGATTTATCACTTTTTAATAGGGTGAGCTTGAGAGTTTTCTTTC
 TTCTGTTTTTTTTTTTTTTGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT
 ATTTACATGCTCTAAAAACCTTCAAAGGTGATTATTTTTCTCCTGGAAACTC
 CAGGTCCATTCTGTTTAAATCCCTAAGAATGTCAGAATTAATAAACAGGGC
 40 TATCCCGTAATTGGAAATATTTCTTTTTTTCAGGATGCTATAGTCAATTTAGTA
 AGTGACCACCAAATTGTTATTTGCACTAACAAAGCTCAAACACGATAAGTT
 TACTCCTCCATCTCAGTAATAAAAAATTAAGCTGTAATCAACCTTCTAGGTTT
 CTCTTGTCTTAAATGGGTATTCAAAAATGGGGATCTGTGGTGTATGTATGG
 45 AAACACATACTCCTTAATTTACCTGTTGTTGGAAACTGGAGAAATGATTGTC
 GGGCAACCGTTTATTTTTTATTGATTTTTATTTGGTTGAGGGATTTTTTTATA
 AACAGTTTACTTGTGTCATATTTTAAAATTAATACTGCCATCACCTGCTGG
 GGTCTTTGTTAGGTCATTTTCAGTGACTAATAGGGATAATCCAGGTAACCTT
 TGAAGAGATGAGCAGTGAGTGACCAGGCAGTTTTTCTGCCTTAGCTTTGAC
 50 AGTTCTTAATTAAGATCATTGAAGACCAGCTTTCTCATAAATTTCTCTTTTTG
 AAAAAAGAAAGCATTGTACTAAGCTCCTCTGTAAGACAACATCTTAAAT
 CTTAAAAGTGTGTTATCATGACTGGTGAGAGAAGAAAACATTTTGTTTTTA
 TAAATGGAGCATTATTTACAAAAAGCCATTGTTGAGAATTAGATCCCACAT
 55 CGTATAAATATCTATTAACCATCTAAATAAAGAGAACTCCAGTGTGTGCTAT
 GTGCAAGATCCTCTCTTGGAGCTTTTTTGCATAGCAATTAAGGTGTGCTAT
 TTGTCAGTAGCCATTTTTTTCAGTGATTTGAAGACCAAAGTTGTTTTACAGC
 TGTGTTACCGTTAAAGGTTTTTTTTTTTATATGTATTAATCAATTTATCACT

60

65

5 GTTTAAAGCTTTGAATATCTGCAATCTTTGCCAAGGTACTTTTTTATTTAAAA
 AAAAACATAACTTTGTAAATATTACCCTGTAATATTATATACTTAATAAAA
 ACATTTTAAGCTATTTTGTGGGCTATTTCTATTGCTGCTACAGCAGACCACA
 AGCACATTTCTGAAAAATTTAATTTATTAATGTATTTTTAAGTTGCTTATATT
 10 CTAGGTAACAATGTAAAGAATGATTTAAAATATTAATTATGAATTTTTTGTAG
 TATAATACCCAATAAGCTTTTAATTAGAGCAGAGTTTTAATTTAAAAGTTTAA
 AATCAGTC
 (sec. con núm de ident.: 11)

15 **Isoforma 2 de aminoácidos de CD47 humano (NP_942088.1)**

MWPLVAALLLGSACCGSAQLLFNKTKSVEFTFCNDTVVIPCFVTNMEAQNT
TEVYVKWKFKGRDIYTFDGLNKTVPDFSSAKIEVSQLLKGDASLKMDK
 20 SDAVSHTGNYTCEVTELREGETHIELKYRVVSWFSPNENILIVIFPIAILLFW
GQFGIKTLKYRSGMDEKTIALLVAGLVITVIVIVGAILFVPGEYSLKNATGLGLI
VTSTGILILLHYVVFSTAIGLTSFVIAILVIQVIAYILAVVGLSLCIAACIPMHGPLLI
SGLSILALAQLLGLVYMKFVASNQKTIQPPRNN(sec. con núm de ident.: 12)

25 **Isoforma 3 de ARNm de CD47 humano (XM_005247908.1)**

AGTGGGAGCGCGGTGCGCGCGGCCGTGCAGCCTGGGCAGTGGGTCCTGCC
TGTGACGCGCGCGCGGCGGTCGGTCCTGCTGTAACGGCGGCGGCGGCTGCT
 30 GCTCCGGACACCTGCGGCGGCGGCGGCGACCCCGCGGCGGCGCGGAGAT
GTGGCCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCTGGGCTCGGCGTGCTGCGGATC
AGCTCAGCTACTATTTAATAAAAACAAAATCTGTAGAATTCACGTTTTGTA
ATGACACTGTCGTCATTCCATGCTTTGTTACTAATATGGAGGCACAAAA
 35 CACTACTGAAGTATACGTAAAGTGGAAATTTAAAGGAAGAGATATTTAC
ACCTTTGATGGAGCTCTAAACAAGTCCACTGTCCCCACTGACTTTAGTA
GTGCAAAAATTGAAGTCTCACAAATTAATAAAGGAGATGCCTCTTTGAA
GATGGATAAAGAGTGATGCTGCTCACACACAGGAAACTACACTGTGAA
GTAACAGAATTAACCAGAGAAGGTGAAACGATCATCGAGCTAAAATATC
 40 GTGTTGTTTCATGGTTTTCTCCAAATGAAAATATTCTTATTGTTATTTTC
CCAATTTTTGCTATACTCCTGTTCTGGGGACAGTTTGGTATTAACAAC
TTAAATATAGATCCGGTGGTATGGATGAGAAAACAATTGCTTTACTTGT
TGCTGGACTAGTGATCACTGTCATTGTCATTGTTGGAGCCATTCTTTTC
GTCCCAGGTGAATATTCATTAAGAATGCTACTGGCCTTGGTTAATG
 45 TGACTTCTACAGGGATATTAATATTACTTCACTACTATGTGTTTAGTACA
GCGATTGGATTAACCTCCTTCGTCATTGCCATATTGGTTATTCAGGTGA
TAGCCTATATCCTCGCTGTGGTTGGACTGAGTCTCTGTATTGCGGCGTG
TATACCAATGCATGGCCCTCTTCTGATTTCAAGTTTGGAGTATCTTAGCT
 50 CTAGCACAACTACTGGACTAGTTTATATGAAATTTGTGGCTTCCAATC
AGAAGACTATAACAACCTCCTAGGAAAGCTGTAGAGGAACCCCTTAATGA
ATAACTGAAGTGAAGTGAAGTGGACTCCGATTTGGAGAGTAGTAAGACGTGAA
AGGAATACACTTGTGTTTAAGCACCATGGCCTTGATGATTCACTGTTGGGGA
GAAGAAAACAAGAAAAGTAACTGGTTGTCACCTATGAGACCCTTACGTGATT
 55 GTTAGTTAAGTTTTTATTCAAAGCAGCTGTAATTTAGTTAATAAAAATAATTAT
GATCTATGTTGTTGCCCAATTGAGATCCAGTTTTTTGTTGTTATTTTAATC
AATTAGGGGCAATAGTAGAATGGACAATTTCCAAGAATGATGCCTTTCAGG
TCCTAGGGCCTCTGGCCTCTAGGTAACCAGTTTAAATTGGTTTCAGGGTGATA
 60 ACTACTTAGCACTGCCCTGGTGATTACCCAGAGATATCTATGAAAACCAAGTG

65

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

GCTTCCATCAAACCTTIGCCAACCTCAGGTTACAGCAGCTTTGGGCAGTTAT
GGCAGTATGGCATTAGCTGAGAGGTGCTGCCACTTCTGGGTCAATGGAATA
ATAAATTAAGTACAGGCAGGAATTTGGTTGGGAGCATCTTGTATGATCTCCG
TATGATGTGATATTGATGGAGATAGTGGTCCTCATTCTTGGGGGTGCCATT
CCCACATTCCCCCTTCAACAAACAGTGTAACAGGTCCTCCCAGATTTAGGG
TACTTTTATTGATGGATATGTTTTCTTTTATTACATAACCCCTTGAAACCC
TGTCTTGTCTCCTGTTACTTGCTTCTGCTGTACAAGATGTAGCACCTTTTCT
CCTCTTTGAACATGGTCTAGTGACACGGTAGCACCAGTTGCAGGAAGGAGC
CAGACTTGTTCAGAGCACTGTGTTACACTTTTCAGCAAAAATAGCTATG
GTTGTAACATATGTATCCCTTCTCTGATTTGAAGGCCAAAAATCTACAGTG
TTCTTCACTTCTTTCTGATCTGGGGCATGAAAAAAGCAAGATTGAAATTT
GAACATGAGTCTCTGCATGGCAACAAAATGTGTGTCACCATCAGGCCAA
CAGGCCAGCCCTTGAATGGGGATTTAATCTGTTGTATCTATGTTGCATGAT
AAACATTCATCACCTTCCCTCCTGTAGTCCTGCCTCGTACTCCCCTCCCCTAT
GATTGAAAAGTAAACAAAACCCACATTTCCCTATCCTGGTTAGAAGAAAATT
AATGTTCTGACAGTTGTGATCGCCTGGAGTACTTTTAGACTTTTAGCATTCTG
TTTTACCTGTTTGTGGATGTGTGTTTGTATGTGCATACGTATGAGATAGGCA
CATGCATCTTCTGTATGGACAAAGGTGGGGTACCTACAGGAGAGCAAAGGT
TAATTTTGTGCTTTTAGTAAAAACATTTAAATACAAAGTCTTTATTGGGTGG
AATTTATTTGATGCAAATATTTGATCACTTAAAACCTTTAAAACCTTCTAGGT
AATTTGCCACGCTTTTGTACTGCTCACCAATACCCTGTAAAAATACGTAATT
CTTCCTGTTTGTGTAATAAGATATTCATATTTGTAGTTGCATTAATAATAGTT
ATTTCTTAGTCCATCAGATGTTCCCGTGTGCCTTTTTATGCCAAATTGATTG
TCATATTTCATGTTGGGACCAAGTAGTTTGGCCATGGCAAACCTAAATTTAT
GACCTGCTGAGGCCTCTCAGAAAACCTGAGCATACTAGCAAGACAGCTCTTCT
TGAAAAAATAATATGTATACACAAATATATACGTATATCTATATATACGTA
TGTATATACACACATGTATATTTCTTCTGATTGTGTAGCTGTCCAAAATAAT
AACATATATAGAGGGAGCTGTATTTCTTTATACAAATCTGATGGCTCCTGCA
GCACTTTTTCTTCTGAAAATATTTACATTTTGCTAACCTAGTTTGTACTTT
AAAAATCAGTTTGTAGAAAGGAGGGAAAAGCAGATGGACTTGAAAAGA
TCCAAGCTCCTATTAGAAAAGGTATGAAAATCTTTATAGTAAAATTTTTTAT
AAACTAAAGTTGTACCTTTTAATATGTAGTAAACTCTCATTATTTGGGGTTC
GCTCTTGGATCTCATCCATCCATTGTGTTCTCTTTAATGCTGCCTGCCTTTG
AGGCATTCAGTCCCTAGACAATGCCACCAGAGATAGTGGGGGAAATGCCA
GATGAAACCAACTCTTGCTCTCACTAGTTGTCAGCTTCTCTGGATAAGTGAC
CACAGAAGCAGGAGTCCCTCCTGCTTGGGCATCATTTGGGCCAGTTCCCTTCT
TAAATCAGATTTGTAATGGCTCCCAAATCCATCACATCACATTTAAATTG
CAGACAGTGTTTTGCACATCATGTATCTGTTTTGTCCATAATATGCTTTTTA
CTCCCTGATCCCAGTTTCTGCTGTTGACTCTTCCATTCAGTTTATTTATTTG
TGTTCTCACAGTGACACCATTTGTCCTTTTCTGCAACAACCTTCCAGCTACT
TTTGCCAAATCTATTTGTCTTCTCCTTCAAAACATTCCTTTGCAGTTCCTC
TTACTCTGTGTAGCTGCTCTTTTGTCTCTTAACTTACCATTCTATAGTACTTT
ATGCATCTCTGCTTAGTCTATTAGTTTTTTGGCCTTGCTTCTCCTTGATT
TAAAATTCCTTCTATAGCTAGAGCTTTTCTTTCTTTCATTCTCTCTTCTGAG
TGTTTTGCATACATCAGAAGCTAGGTACATAAGTTAAATGATTGAGAGTTGG
CTGTATTTAGATTTATCACTTTTAAATAGGGGTGAGCTTGAGAGTTTTCTTTCT
TTCTGTTTACTAA
TTTACATGCTCTAAAACCTTCAAAGGTGATTATTTTTCTCCTGGAAACTCC

5 AGGTCCATTCTGTTTAAATCCCTAAGAATGTCAGAATTAATAAACAGGGCT
ATCCCGTAATTGGAAATATTTCTTTTTTCAGGATGCTATAGTCAATTTAGTAA
GTGACCACCAAAATGTTATTTGCACTAACAAAGCTCAAAACACGATAAGTTT
ACTCCTCCATCTCAGTAATAAAAATTAAGCTGTAATCAACCTTCTAGGTTTC
TCTTGTCTTAAATGGGTATTTCAAAAATGGGGATCTGTGGTGTATGTATGGA
10 AACACATACTCCTTAATTTACCTGTTGTTGGAAACTGGAGAAATGATTGTCG
GGCAACCGTTTATTTTTTATTGTATTTTATTGGTTGAGGGATTTTTTATAA
ACAGTTTTACTTGTGTCAATTTTTAAAATTAATAACTGCCATCACCTGCTGGG
GTCCTTTGTTAGGTCATTTTCAGTGACTAATAGGGATAATCCAGGTAACCTT
GAAGAGATGAGCAGTGAGTGACCAGGCAGTTTTTCTGCCTTAGCTTTGACA
15 GTTCTTAATTAAGATCATTGAAGACCAGCTTCTCATAAAATTTCTTTTTGA
AAAAAGAAAAGCATTGTACTAAGCTCCTCTGTAAGACAACATCTTAAATCT
TAAAAGTGTGTTATCATGACTGGTGAGAGAAGAAAACATTTTGTTTTTATT
AAATGGAGCATTATTTACAAAAAGCCATTGTTGAGAATTAGATCCCACATCG
TATAAATATCTATTAACCATTTCTAAATAAAGAGAACTCCAGTGTGCTATGT
20 GCAAGATCCTCTCTTGGAGCTTTTTTGCATAGCAATTAAGGTGTGCTATTT
GTCAGTAGCCATTTTTTGCAGTGATTTGAAGACCAAAGTTGTTTTACAGCT
GTGTTACCGTTAAAGGTTTTTTTTTATATGTATTAATCAATTTATCACTG
TTTAAAGCTTTGAATATCTGCAATCTTTGCCAAGGTACTTTTTTATTAATAA
AAAACATAACTTTGTAATATTACCCTGTAATATTATATATACTTAATAAAA
25 CATTTAAGCTA(sec. con núm de ident.: 13)

Isoforma 3 de aminoácidos de CD47 humano (XP_005247965.1)

30 MWPLVAALLLGSACCGSAQLLFNKT̄KSVEFTFCNDTVVIPCFTVNMEAQNT
TEVYVKKWKFKGRDIYTFD GALNKSTVPTDFSSAKIEVSQLLKGDASLKMDK
SDAVSHTGNYTCEVTEL TREGETHELKYRVVSWFSPNENILIVIFPIFAILFW
GQFGIKTLKYRSGMDEKTIALLVAGLVITVIVIVGAILFVPGEYSLKNATGLLI
35 VTSTGILILLHYVVFSTAIGLTSFVIAILVIQVIAYILAVVGLSLCIAACIPMHGPLLI
SGLSILALAQLLGLVYMKFVASNQKTIQPPRKAVEEPLNE(sec. con núm de ident.: 14)

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

40 GGGGAGCAGGCGGGGAGCGGGCGGGAAGCAGTGGGAGCGCGCGTGC
CGGCCGTGCAGCCTGGGCAGTGGGTCTGCTGTGACGCGCGGGCGCGGTC
GGTCTGCTGTAAACGGCGGCGGGCGGCTGCTGCTCCAGACACCTGCGGGCGG
CGGCGGCGACCCCGCGGGCGGGCGGAGATGTGGCCCTGGTAGCGGGCG
45 CTGTTGCTGGGCTCGGCGTGTGCGGATCAGCTCAGCTACTATTTAATA
AAACAAAATCTGTAGAATTCACGTTTTGTAATGACACTGTCGTCATTC
ATGCTTTGTTACTAATATGGAGGCACAAAACACTACTGAAGTATACGTA
AAGTGAAATTTAAAAGGAAGAGATATTACACCTTTGATGGAGCTCTAA
ACAAGTCCACTGTCCCCTGACTTTAGTAGTGCAAAAATTGAAGTCTC
50 ACAATTAATAAAGGAGATGCCTCTTTGAAGATGGATAAGAGTGATGCT
GTCTCACACACAGGAACTACACTTGTGAAGTAACAGAATTAACCAGAG
AAGGTGAAACGATCATCGAGCTAAAATATCGTGTGTTTTATGTTTTT
TCCAAATGAAAATATTTATTGTTATTTTCCAATTTTTGCTATACTCC
TGTTCTGGGACAGTTTGGTATTAACACTTAAATATAGATCCGGTGG
55 TATGGATGAGAAAACAATTGCTTTACTTGTGCTGGACTAGTGATCACT
GTCATGTGCTGTTGGAGCCATTTTCGTCACAGGTGAATATTCATT
AAAGAATGCTACTGGCCTTGGTTAATTGTGACTTCTACAGGGATATTA

60

65

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

ATATTACTTCACTACTATGTGTTTAGTACAGCGATTGGATTAACCTCCTT
CGTCATTGCCATATTGGTTATTAGGTGATAGCCTATATCCTCGCTGTG
GTTGGACTGAGTCTCTGTATTGCGGCGTGTATACCAATGCATGGCCCTC
TTCTGATTTCAAGTTTGAGTATCTTAGCTCTAGCACAACTTACTTGGACTA
GTTTATATGAAATTTGTGGCTTCCAATCAGAAGACTATAACAACCTCCTA
GGAAAGCTGTAGAGGAACCCCTTAATGCATTCAAAGAATCAAAAGGAAT
GATGAATGATGAATAACTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGT
 AGTAAGACGTGAAAGGAATACACTTGTGTTAAGCACCATGGCCCTTGATGA
 TTCACTGTTGGGGAGAAGAAACAAGAAAAGTAACTGGTTGTACCTATGAG
 ACCCTTACGTGATTGTTAGTTAAGTTTTTATTCAAAGCAGCTGTAATTTAGTT
 AATAAAATAATTATGATCTATGTTGTTTGCCCAATTGAGATCCAGTTTTTGT
 TGTTATTTTAAATCAATTAGGGGGCAATAGTAGAATGGACAATTTCCAAGAAT
 GATGCCTTTCAGGTCCTAGGGCCTCTGGCCTCTAGGTAACCAGTTTAAATTG
 GTTCAGGGTGATAACTACTTAGCACTGCCCTGGTGATTACCCAGAGATATCT
 ATGAAAACCAAGTGGCTTCCATCAAACCTTTGCCAACTCAGGTTACAGCAGC
 TTTGGGCAGTTATGGCAGTATGGCATTAGCTGAGAGGTGTCTGCCACTTCTG
 GGTCAATGGAATAATAAATTAAGTACAGGCAGGAATTTGGTTGGGAGCATC
 TTGTATGATCTCCGTATGATGTGATATTGATGGAGATAGTGGTCTCCTATTCTT
 GGGGGTTGCCATTCCCACTTCCCCCTTCAACAAACAGTGTAACAGGTCCTT
 CCCAGATTTAGGGTACTTTTATTGATGGATATGTTTTCTTTTTATTACATAA
 CCCCTTGAAACCCTGTCTTGTCTCCTGTTACTTGCTTCTGCTGTACAAGATG
 TAGCACTTTTCTCCTCTTTGAACATGGTCTAGTGACACGGTAGCACCAGTT
 GCAGGAAGGAGCCAGACTTGTCTCAGAGCACTGTGTTACACTTTTTAGCA
 AAAATAGCTATGGTTGTAACATATGATTCCCTTCCTCTGATTTGAAGGCAA
 AAATCTACAGTGTTCCTTCACTTCTTTTCTGATCTGGGGCATGAAAAAAGCA
 AGATTGAAATTTGAACTATGAGTCTCCTGCATGGCAACAAAATGTGTGTCAC
 CATCAGGCCAACAGGCCAGCCCTTGAATGGGGATTTATTACTGTTGTATCTA
 TGTTGCATGATAAACATTCATCACCTTCCTCCTGTAGTCCTGCCTCGTACTCC
 CCTTCCCCTATGATTGAAAAGTAAACAAAACCCACATTTCCCTATCCTGGTTA
 GAAGAAAATTAATGTTCTGACAGTTGTGATCGCCTGGAGTACTTTTAGACTT
 TTAGCATTTCGTTTTTACCTGTTTGTGGATGTGTGTTTGTATGTGCATACGTA
 TGAGATAGGCACATGCATCTTCTGTATGGACAAAGGTGGGGTACCTACAGG
 AGAGCAAAGGTTAATTTTGTGCTTTTAGTAAAAACATTTAAATACAAAGTTC
 TTTATTGGGTGGAATTATATTGATGCAATATTTGATCACTTAAACTTTTA
 AAACCTTAGGTAATTTGCCACGCTTTTTGACTGCTCACCAATACCCTGTAA
 AAATACGTAATTCCTCCTGTTTGTGTAATAAGATATTCATATTTGTAGTTGCA
 TTAATAATAGTTATTTCTTAGTCCATCAGATGTTCCCGTGTGCCCTTTTTATG
 CCAAATGATTGTCATATTTTCATGTTGGGACCAAGTAGTTTGCCCATGGCAA
 ACCTAAATTTATGACCTGCTGAGGCCTCTCAGAAAACCTGAGCATACTAGCAA
 GACAGCTCTTCTGAAAAAATAATATGTATACACAAATATATACGTATATC
 TATATATACGTATGTATATACACACATGTATATTCTTCCCTTGATTGTGTAGCT
 GTCCAAAATAATAACATATATAGAGGGAGCTGTATTCCTTTATACAAATCTG
 ATGGCTCCTGCAGCACTTTTTCTTCTGAAAATATTTACATTTTGCTAACCTA
 GTTTGTACTTTTAAAAATCAGTTTTGATGAAAGGAGGGAAAAGCAGATGGA
 CTTGAAAAGATCCAAGCTCCTATTAGAAAAGGTATGAAAATCTTTATAGTA
 AAATTTTTTATAAACTAAAGTTGTACCTTTTAAATAIGTAGTAAACTCTCATT
 ATTTGGGGTTCGCTCTTGGATCTCATCCATCCATTGTGTTCTTTAATGCTG
 CCTGCCTTTTGAAGCATTCACTGCCCTAGACAATGCCACCAGAGATAGTGGG

5 GGAAATGCCAGATGAAACCAACTCTTGCTCTCACTAGTTGTCAGCTTCTCTG
 GATAAGTGACCACAGAAGCAGGAGTCTCTGCTTGGGCATCATTGGGCCA
 GTTCCTTCTCTTTAAATCAGATTTGTAATGGCTCCCAAATTCCATCACATCAC
 ATTTAAATTGCAGACAGTGTTTTGCACATCATGTATCTGTTTTGTCCATAAT
 10 ATGCTTTTTACTCCCTGATCCCAGTTTCTGCTGTTGACTCTTCCATTAGTTTT
 ATTTATGTGTGTTCTCACAGTGACACCATTGTCCTTTTCTGCAACAACCTT
 TCCAGCTACTTTTGCCAAATTCTATTGTCTTCTCCTTCAAACATTCTCCTT
 GCAGTTCCTCTTTCATCTGTGTAGCTGCTCTTTTGTCTCTTAACTTACCATTCT
 ATAGTACTTTATGCATCTCTGCTTAGTTCTATTAGTTTTTTGGCCTTGCTCTC
 15 TCCTTGATTTTAAAAATCCTTCTATAGCTAGAGCTTTTCTTTCTTTCATTCTCT
 CTTCTGCAGTGTTTTGCATACATCAGAAGCTAGGTACATAAGTTAAATGAT
 TGAGAGTTGGCTGTATTTAGATTTATCACTTTTTAATAGGGTGAGCTTGAGA
 GTTTTCTTCTTCTGTT
 TTTTACTAATTTACATGCTCTAAAAACCTTCAAAGGTGATTATTTTCTCC
 20 TGGAAACTCCAGGTCCATTCTGTTTAAATCCCTAAGAATGTCAGAATTAATA
 TAACAGGGCTATCCCGTAATTGGAAATATTTCTTTTTTTCAGGATGCTATAGT
 CAATTTAGTAAGTGACCACCAAATTGTTATTTGCACTAACAAAGCTCAAAAC
 ACGATAAGTTTACTCCTCCATCTCAGTAATAAAAAATTAAGCTGTAATCAACC
 TTCTAGGTTTCTCTTGTCTTAAAATGGGTATTCAAAAATGGGGATCTGTGGT
 25 GTATGTATGGAAACACATACTCCTTAATTTACCTGTTGTTGGAAACTGGAGA
 AATGATTGTCGGGCAACCGTTTATTTTTATTGTATTTATTTGGTTGAGGGA
 TTTTTTATAAACAGTTTACTTGTGTCATATTTTAAAATTACTAAGTCCAT
 CACCTGCTGGGGTCTTTGTTAGGTCATTTTCAGTGACTAATAGGGATAATC
 CAGGTAACCTTTGAAGAGATGAGCAGTGAGTGACCAGGCAGTTTTTCTGCCT
 30 TAGCTTTGACAGTTCTTAATTAAGATCATTGAAGACCAGCTTCTCATAAAT
 TTCTTTTTTGAAAAAAGAAAGCATTGTACTAAGCTCCTCTGTAAGACAA
 CATCTTAAATCTTAAAAGTGTGTTATCATGACTGGTGAGAGAAGAAAACAT
 TTTGTTTTTATTAATGGAGCATTATTTACAAAAAGCCATTGTTGAGAATTA
 35 GATCCACATCGTATAAATATCTATTAACCATTCTAAATAAAGAGAACTCCA
 GTGTGCTATGTGCAAGATCCTCTCTTGGAGCTTTTTTGCATAGCAATTA
 AAGGTGCTATTTGTCAGTAGCCATTTTTTTCAGTGATTTGAAGACCAAAGT
 TGTTTACAGCTGTGTTACCCTTAAAGGTTTTTTTTTTTTTATATGATTAATC
 40 AATTTACACTGTTTAAAGCTTTGAATATCTGCAATCTTTGCCAAGGTAATTT
 TTTATTTAAAAAAAACATAACTTTGTAATATTACCCTGTAATATTATATAT
 ACTTAATAAAACATTTTAAAGCTATTTTGTGGGCTATTTCTATTGCTGCTACA
 GCAGACCACAAGCACATTTCTGAAAAATTTAATTTATTAATGTATTTTAAAG
 45 TTGCTTATATTCTAGGTAACAATGTAAAGAATGATTTAAAATATTAATTATG
 AATTTTTTGAGTATAATACCCAATAAGCTTTTAAATTAGAGCAGAGTTTTAATT
 AAAAGTTTTAAATCAGTC(sec. con núm de ident.: 15)

Isoforma 4 de aminoácidos de CD47 humano (NP_001768.1)

50 MWPLVAALLLGSACCGSAQLLFN̄K̄T̄K̄SVEFT̄FCNDTVVIPCFTVNMEAQNT
TEVYVKWKFKGRDIYTFD̄GALNKSTVPTDFSSAKIEVSQLLKGDASLKMDK
SDAVSHTGNYTCEVTELTREGETIHELKYRVVSWFSPNENILIVIFPIFAILFW
 55 GQFGIKTLKYRSGMDEKTIALLVAGLVITVIVIVGAILFVPGEYSLKNATGLGLI
 VTSTGILILLHYVVFSTAIGLTSFVIAILVIQVIAYILAVVGLSLCIAACIPMHGPLLI
 SGLSILALAQLLGLVYMKFVASNQKTIQPPRKAVEEPLNAFKESKGMNDE
 (sec. con núm de ident.: 16)

60

65

Isoforma 1 de aminoácidos de CD47 humanizado

MWPLAAALLGSCCCGSAQLLENKTKSVEFTFCNDTVVIPCFTVNMEAQNT
 TEVYVKWKFKGRDIYTFDGALNKSTVPTDFSSAKIEVSQLLKGDASLKMDK
 SDAVSHGTGNYTCEVTELTREGETHIELKYRVVSWFSPNENILIVIFPIFAILLF
 WGQFGIKTLKYRSGGMDEKTIALLVAGLVITVIVIVGAILFVPGEYSLKNAT
 GLGLIVTSTGILILLHYVVFSTAIGLTSFVIALVIQVIAYILAVVGLSLCIAACI
 PMHGPLLISGLSILALAQLLGLVYMKFVE(sec. con núm de ident.: 17)

Isoforma 2 de aminoácidos de CD47 humanizado

MWPLAAALLGSCCCGSAQLLENKTKSVEFTFCNDTVVIPCFTVNMEAQNT
 TEVYVKWKFKGRDIYTFDGALNKSTVPTDFSSAKIEVSQLLKGDASLKMDK
 SDAVSHGTGNYTCEVTELTREGETHIELKYRVVSWFSPNENILIVIFPIFAILLF
 WGQFGIKTLKYRSGGMDEKTIALLVAGLVITVIVIVGAILFVPGEYSLKNAT
 GLGLIVTSTGILILLHYVVFSTAIGLTSFVIALVIQVIAYILAVVGLSLCIAACI
 PMHGPLLISGLSILALAQLLGLVYMKFVASNQRTIQPPRNR
 (sec. con núm de ident.: 18)

Isoforma 3 de aminoácidos de CD47 humanizado

MWPLAAALLGSCCCGSAQLLENKTKSVEFTFCNDTVVIPCFTVNMEAQNT
 TEVYVKWKFKGRDIYTFDGALNKSTVPTDFSSAKIEVSQLLKGDASLKMDK
 SDAVSHGTGNYTCEVTELTREGETHIELKYRVVSWFSPNENILIVIFPIFAILLF
 WGQFGIKTLKYRSGGMDEKTIALLVAGLVITVIVIVGAILFVPGEYSLKNAT
 GLGLIVTSTGILILLHYVVFSTAIGLTSFVIALVIQVIAYILAVVGLSLCIAACI
 PMHGPLLISGLSILALAQLLGLVYMKFVASNQRTIQPPRKAVEEPLNE
 (sec. con núm de ident.: 19)

Isoforma 4 de aminoácidos de CD47 humanizado

MWPLAAALLGSCCCGSAQLLENKTKSVEFTFCNDTVVIPCFTVNMEAQNT
 TEVYVKWKFKGRDIYTFDGALNKSTVPTDFSSAKIEVSQLLKGDASLKMDK
 SDAVSHGTGNYTCEVTELTREGETHIELKYRVVSWFSPNENILIVIFPIFAILLF
 WGQFGIKTLKYRSGGMDEKTIALLVAGLVITVIVIVGAILFVPGEYSLKNAT
 GLGLIVTSTGILILLHYVVFSTAIGLTSFVIALVIQVIAYILAVVGLSLCIAACI
 PMHGPLLISGLSILALAQLLGLVYMKFVASNQRTIQPPRKAVEEPLNAFKESKG
 MMNDE (sec. con núm de ident.: 20)

Animales no humanos con CD47 humanizado

Se proporcionan animales no humanos que expresan proteínas CD47 humanizadas en la superficie de las células de los animales no humanos como resultado de una modificación genética de un locus endógeno del animal no humano que codifica una proteína CD47. Los ejemplos adecuados descritos en la presente descripción incluyen roedores, particularmente, ratones.

Un gen de CD47 humanizado, puede comprender material genético de una especie heteróloga (por ejemplo, seres humanos), en donde el gen de CD47 humanizado codifica una proteína CD47 que comprende la porción codificada del material genético de la especie heteróloga. Un gen de CD47 humanizado descrito en el presente documento puede comprender ADN genómico de una especie heteróloga que codifica la porción extracelular de una proteína CD47 que se expresa en la membrana plasmática de una célula. Un gen de CD47 humanizado descrito en el presente documento puede comprender ADN genómico de una especie heteróloga que codifica la porción extracelular y la porción transmembrana de una proteína CD47 que se expresa en la membrana plasmática de una célula. Se proporcionan, además, animales no humanos, embriones, células y construcciones de transformación para producir animales no humanos, embriones no humanos, y células que contienen dicho gen de CD47 humanizado.

- 5 Puede eliminarse un gen endógeno de CD47. Puede alterarse un gen de CD47 endógeno, en donde una porción del gen de CD47 endógeno se reemplaza con una secuencia heteróloga (por ejemplo, una secuencia de CD47 humana, en su totalidad o en parte). La totalidad o sustancialmente la totalidad de un gen de CD47 endógeno se reemplaza con un gen heterólogo (por ejemplo, un gen de CD47 humano). Una porción de un gen de CD47 heterólogo puede insertarse en un gen de CD47 endógeno no humano en un locus de CD47 endógeno. El gen heterólogo puede ser un gen humano. La modificación o humanización puede realizarse a una de las dos copias del gen de CD47 endógeno, lo que da lugar a un animal no humano que es heterocigoto con respecto al gen de CD47 humanizado. Se puede proporcionar un animal no humano que sea homocigoto para un gen CD47 humanizado
- 10 Un animal no humano como se describe en la presente puede contener un gen CD47 humano, en su totalidad o en parte, en un locus CD47 endógeno no humano. Así, tales animales no humanos pueden describirse como que tienen un gen de CD47 heterólogo. El gen de CD47 reemplazado, insertado, modificado o alterado en el locus de CD47 endógeno puede detectarse con el uso de una variedad de métodos que incluyen, por ejemplo, PCR, transferencia Western, transferencia Southern, polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP), o un ensayo de ganancia o pérdida de alelos. El animal no humano puede ser heterocigoto con respecto al gen de CD47 humanizado. El animal no humano puede ser homocigoto para el gen de CD47 humanizado.
- 15 Un gen de CD47 humanizado descrito en la presente incluye un gen de CD47 que tiene un segundo, tercero, cuarto, quinto, sexto y séptimo exón, cada uno de los cuales puede tener una secuencia al menos 50 % (por ejemplo, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más) idéntica a un segundo, tercero, cuarto, quinto, sexto y séptimo exón que aparece en un gen de CD47 humano de la Tabla 3.
- 20 Un gen de CD47 humanizado de acuerdo con la presente invención incluye un gen de CD47 que tiene un iniciador exón y exón(es) corriente abajo del exón 7 (por ejemplo, los exones octavo y noveno de la isoforma 2) donde cada uno tiene una secuencia al menos 50 % (por ejemplo, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más) idéntica a un exón respectivo que aparece en un gen de CD47 de ratón de la Tabla 3.
- 25 Un gen de CD47 humanizado de conformidad con la presente invención incluye un gen de CD47 que tiene una región 5' no traducida y una región 3' no traducida cada una de las cuales tiene una secuencia al menos 50 % (por ejemplo, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más) idéntica a una región 5' no traducida y una región 3' no traducida que aparecen en un gen de CD47 de ratón de la Tabla 3.
- 30 Un gen de CD47 humanizado de conformidad con la presente invención incluye un gen de CD47 que tiene una secuencia de nucleótidos codificante (por ejemplo, una secuencia de ADNc) al menos 50 % (por ejemplo, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más) idéntica a una secuencia de nucleótidos codificante que aparece en una secuencia de nucleótidos codificante de CD47 humano de la Tabla 3.
- 35 Una proteína CD47 humanizada producida por un animal no humano descrito en el presente documento puede tener una porción extracelular con una secuencia de aminoácidos que es al menos 50 % (por ejemplo, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más) idéntica a una porción extracelular de una proteína CD47 humana que aparece en la Tabla 3.
- 40 Una proteína CD47 humanizada producida por un animal no humano descrito en la presente tiene una porción extracelular que tiene una secuencia de aminoácidos que es idéntica a los residuos de aminoácidos 19-141 que aparecen en una proteína CD47 humana de la Tabla 3.
- 45 Una proteína CD47 humanizada producida por un animal no humano de la presente invención tiene un dominio V inmunoglobulínico N-terminal que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 50 % (por ejemplo, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más) idéntica a un dominio V inmunoglobulínico N-terminal de una proteína CD47 humana que aparece en la Tabla 3.
- 50 Una proteína CD47 humanizada producida por un animal no humano descrito en la presente tiene un dominio V inmunoglobulínico N-terminal que tiene una secuencia de aminoácidos que es idéntica a los residuos de aminoácidos 19-127 que aparecen en una proteína CD47 humana de la Tabla 3.
- 55 Una proteína CD47 humanizada producida por un animal no humano descrito en la presente descripción puede tener un dominio V inmunoglobulínico N-terminal y cinco dominios transmembranas cada uno con una secuencia de aminoácidos que es al menos 50 % (por ejemplo, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más) idéntica a un dominio V inmunoglobulínico N-terminal y cinco dominios transmembranas de una proteína CD47 humana que aparece en la Tabla 3.
- 60 Una proteína CD47 humanizada producida por un animal no humano descrito en la presente descripción puede tener un dominio V inmunoglobulínico N-terminal y cinco dominios transmembranas cada uno con una secuencia de aminoácidos que es al menos 50 % (por ejemplo, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más) idéntica a un dominio V inmunoglobulínico N-terminal y cinco dominios transmembranas de una proteína CD47 humana que aparece en la Tabla 3.
- 65

Una proteína CD47 humanizada producida por un animal no humano de la presente invención tiene una cola intracitoplasmática que tiene una secuencia que es al menos 50 % (por ejemplo, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más) idéntica a una cola intracitoplasmática de una proteína CD47 de ratón que aparece en la Tabla 3.

5 Una proteína CD47 humanizada producida por un animal no humano descrito en el presente documento puede tener una secuencia de aminoácidos que es al menos 50 % (por ejemplo, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más) idéntica a los residuos de aminoácidos 16-292 que aparecen en una proteína CD47 humana de la Tabla 3.

10 Una proteína CD47 humanizada producida por un animal no humano descrito en el presente documento puede tener una secuencia de aminoácidos que es al menos 50 % (por ejemplo, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más) idéntica a los residuos de aminoácidos 19-292 que aparecen en una proteína CD47 humana de la Tabla 3.

15 Una proteína CD47 humanizada producida por un animal no humano descrito en la presente tiene una secuencia de aminoácidos que es idéntica a los residuos de aminoácidos 19-292 (o 16-292) que aparecen en una proteína CD47 humana de la Tabla 3.

20 Una proteína CD47 humanizada producida por un animal no humano descrito en el presente documento puede tener una secuencia de aminoácidos que es al menos 50 % (por ejemplo, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más) idéntica a una secuencia de aminoácidos de una proteína CD47 humanizada que aparece en la Tabla 3.

25 Una proteína CD47 humanizada producida por un animal no humano descrito en la presente descripción puede tener una secuencia de aminoácidos que es idéntica a una secuencia de aminoácidos de una proteína CD47 humanizada que aparece en la Tabla 3.

30 Se proporcionan composiciones y métodos para producir animales no humanos que expresan una proteína CD47 humanizada, que incluye formas polimórficas específicas, variantes alélicas (por ejemplo, diferencias en un solo aminoácido) o isoformas de corte y empalme alternativo, que incluyen composiciones y métodos para producir animales no humanos que expresan tales proteínas a partir de un promotor humano y una secuencia reguladora humana. Se pueden proporcionar además composiciones y métodos para producir animales no humanos que expresan tales proteínas a partir de un promotor endógeno y una secuencia reguladora endógena. Los métodos incluyen insertar el material genético que codifica una proteína CD47 humana en su totalidad o en parte en una ubicación precisa en el genoma de un animal no humano que corresponde a un gen de CD47 endógeno para crear de esta manera un gen de CD47 humanizado que expresa una proteína CD47 que es humana en su totalidad o en parte. Los métodos pueden incluir insertar ADN genómico correspondiente a los exones 2 - 7 de un gen de CD47 humano en un gen de CD47 endógeno del animal no humano para crear de esta manera un gen humanizado que codifica una proteína CD47 que contiene una porción humana que contiene los aminoácidos codificados por los exones insertados.

45 Cuando sea adecuado, la región codificante del material genético o secuencia(s) de polinucleótido(s) que codifica(n) una proteína CD47 humana en su totalidad o en parte puede modificarse de manera que incluya codones optimizados para la expresión en el animal no humano (por ejemplo, ver las patentes de los Estados Unidos núms. 5,670,356 y 5,874,304). Las secuencias con optimización de codones son secuencias sintéticas, y, preferentemente, codifican el polipéptido idéntico (o un fragmento biológicamente activo de un polipéptido de longitud completa que tiene sustancialmente la misma actividad que el polipéptido de longitud completa) codificado por el polinucleótido original sin optimización de codones. La región codificante del material genético que codifica una proteína CD47 humana, en su totalidad o en parte, puede incluir una secuencia alterada para optimizar el uso de codones en un tipo de célula particular (por ejemplo, una célula de roedor). Por ejemplo, los codones del ADN genómico correspondiente a los exones 2-7 de un gen de CD47 humano a insertar en un gen de CD47 endógeno de un animal no humano (por ejemplo, un roedor) pueden optimizarse para su expresión en una célula del animal no humano. Una secuencia de este tipo puede describirse como una secuencia con optimización de codones.

55 Un enfoque del gen de CD47 humanizado emplea una modificación relativamente mínima del gen endógeno y da como resultado la transducción natural de las señales mediadas por CD47 en el animal no humano, debido a que la secuencia genómica de las secuencias de CD47 se modifican en un solo fragmento y por lo tanto conservan su funcionalidad normal mediante la inclusión de las secuencias reguladoras necesarias. Así, en tales casos, la modificación del gen de CD47 no afecta otros genes circundantes u otros genes endógenos que interactúan con CD47 (por ejemplo, trombospondina, SIRP, integrinas, etcétera). Además, la modificación no afecta el ensamblaje de una proteína de transmembrana CD47 funcional en la membrana celular y mantiene sus funciones efectoras normales por medio de la unión y posterior transducción de señales a través de la porción citoplasmática de la proteína que no se afecta por la modificación.

65 Una ilustración esquemática (que no está a escala) de la organización genómica de un gen de CD47 murino endógeno y un gen de CD47 humano se proporciona en la Figura 1. Un método ilustrativo para la humanización de un gen de

CD47 murino endógeno con el uso de un fragmento genómico que contiene los exones 2-7 de un gen de CD47 humano se proporciona en la Figura 2. Como se ilustra, el ADN genómico que contiene los exones 2 - 7 de un gen de CD47 humano se inserta en un locus de un gen de CD47 endógeno murino mediante una construcción de transformación. Este ADN genómico incluye la porción del gen que codifica una porción extracelular los dominios de transmembrana (por ejemplo, los residuos de aminoácidos 16 - 292) de una proteína CD47 humana responsable de la unión a ligandos.

Un animal no humano (por ejemplo, un ratón) que tiene un gen de CD47 humanizado en el locus de CD47 endógeno puede producirse mediante cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, puede producirse un vector de transformación que introduce un gen de CD47 humano en su totalidad o en parte con un gen marcador de selección. La Figura 2 ilustra un locus de CD47 endógeno de un genoma de ratón que comprende una inserción de los exones 2 - 7 de un gen de CD47 humano. Como se ilustra, la construcción de transformación contiene un brazo de homología en 5' que contiene una secuencia corriente arriba del exón 2 de un gen de CD47 endógeno murino (~39 Kb), seguido por un fragmento de ADN genómico que contiene los exones 2 - 7 de un gen de CD47 humano (~23,9 Kb), un casete de selección por fármacos (por ejemplo, un gen de resistencia a la neomicina flanqueado en ambos extremos por secuencias loxP, ~5 Kb), y un brazo de homología en 3' que contiene una secuencia corriente abajo del exón 7 de un gen de CD47 endógeno murino (~99 Kb). El constructo de transformación contiene un casete de selección con fármaco autoeliminable (por ejemplo, un gen de resistencia a neomicina flanqueado por secuencias loxP; ver las patentes de los Estados Unidos núms. 8,697,851, 8,518,392 and 8,354,389). Después de la recombinación homóloga, los exones 2 - 7 de un gen de CD47 endógeno murino se reemplazan por la secuencia contenida en el vector de transformación (es decir, los exones 2 - 7 de un gen de CD47 humano). Se crea un gen de CD47 humanizado que da como resultado una célula o animal no humano que expresa una proteína CD47 humanizada que contiene los aminoácidos codificados por los exones 2 - 7 de un gen de CD47 humano. El casete de selección por fármacos se elimina de una manera dependiente del desarrollo, es decir, la progenie derivada de los ratones cuyas células de la línea germinal contienen el gen de CD47 humanizado descrito anteriormente liberarán el marcador de selección de las células diferenciadas durante el desarrollo.

Los animales no humanos como se describen en la presente pueden prepararse como se describió anteriormente, o mediante el uso de métodos conocidos en la técnica, para comprender genes humanos o humanizados adicionales, lo que depende frecuentemente del uso deseado del animal no humano. El material genético de tales genes humanos o humanizados adicionales puede introducirse a través de la alteración adicional del genoma de las células (por ejemplo, células madre embrionarias) que tienen las modificaciones genéticas como se describió anteriormente o a través de técnicas de cruzamiento conocidas en la técnica con otras cepas modificadas genéticamente según convenga. Los animales no humanos descritos en la presente pueden prepararse de modo que comprendan además uno o más genes humanos o humanizados seleccionados de SIRP α (CD172a), IL-3, M-CSF, GM-CSF y TPO. Los animales no humanos, como se describe en la presente, pueden prepararse mediante la introducción de un vector de transformación, como se describe en la presente, en una célula de una cepa modificada. Solo para dar un ejemplo, un vector de transformación, como se describió anteriormente, puede introducirse en un ratón que es deficiente de Rag2 y deficiente de IL-2R γ e incluye cuatro citocinas humanas (Rag2^{-/-}IL2R γ ^{-/-}; M-CSF^{Hu}; IL-3/GM-CSF^{Hu}; hSIRP α ^{Tg}; TPO^{Hu}). Los animales no humanos descritos en la presente descripción pueden prepararse para comprender además un gen de proteína alfa (SIRP α) reguladora de la señal humana o humanizada (SIRP α). Los animales no humanos como se describe en la presente pueden comprender un gen CD47 humanizado como se describe en la presente y material genético de una especie heteróloga (por ejemplo, seres humanos), en donde el material genético codifica, en su totalidad o en parte, una o más proteínas heterólogas seleccionadas de SIRP α (CD172a), IL-3, M-CSF, GM-CSF y TPO. Los animales no humanos descritos en la presente descripción pueden comprender un gen CD47 humanizado como se describe en la presente descripción y material genético de una especie heteróloga (por ejemplo, humanos), en donde el material genético codifica, en su totalidad o en parte, una proteína SIRP α heteróloga (por ejemplo, humana). Los animales no humanos de la presente invención comprenden además un gen de SIRP α que comprende una porción endógena y una porción humana (por ejemplo, los exones 2-4 de un gen de SIRP α humano), en donde la porción humana codifica el dominio extracelular de una proteína SIRP α (por ejemplo, los aminoácidos correspondientes a los residuos 28-362 de una proteína SIRP α humana) y la porción endógena codifica el dominio intracelular de una proteína SIRP α endógena; la porción humana y la porción endógena se unen operativamente a un promotor de SIRP α endógeno.

Por ejemplo, como se describe en la presente, los animales no humanos que comprenden un gen de CD47 humanizado pueden comprender además (por ejemplo, por medio de estrategias de entrecruzamiento o de transformación de múltiples genes) una o más modificaciones como se describe en los documentos núms. PCT/US2010/051339, presentado el 4 de octubre de 2010; PCT/US2013/058448, presentado el 6 de septiembre de 2013; PCT/US2013/045788, presentado el 14 de junio de 2013; PCT/US2014/056910, presentado el 23 de septiembre de 2014; PCT/US2014/060568, presentado el 15 de octubre de 2014; PCT/US2012/025040, presentado el 14 de febrero de 2014; PCT/US2012/062379, presentado el 29 de octubre de 2012; PCT/US2014/064806, presentado el 10 de noviembre de 2014; y PCT/US2014/064810, presentado el 10 de noviembre de 2014. Un roedor que comprende un gen de CD47 humanizado (es decir, los exones 2-7 de un gen de CD47 humano unido operativamente al exón 1 y al exón 8 (y por lo tanto cualquiera de los exones corriente abajo) de un gen de CD47 endógeno de roedor de manera que el gen de CD47 humanizado codifica un polipéptido de CD47 que tiene una porción extracelular de una proteína CD47 humana y una porción intracelular de una proteína CD47 de roedor) puede cruzarse con un roedor que comprende un gen de SIRP α humanizado (por ejemplo, los exones 2-4 de un gen de SIRP α humano unido

operativamente a los exones 1 y 5-8 de un gen de SIRPα endógeno de roedor de manera que el gen de SIRPα humanizado codifica un polipéptido de SIRPα que tiene una porción extracelular de una proteína SIRPα humana (por ejemplo, los aminoácidos correspondientes a los residuos 28-362) y una porción intracelular de una proteína SIRPα de roedor; ver, por ejemplo, el documento núm. PCT/US2014/056910, presentado el 23 de septiembre de 2014).

5 Aunque las modalidades que emplean un gen de CD47 humanizado en un ratón (es decir, un ratón con un gen de CD47 que codifica una proteína CD47 que incluye una porción humana y una porción de ratón) se analizan exhaustivamente en la presente descripción, se describen, además, otros animales no humanos que comprenden un gen de CD47 humanizado. Tales animales no humanos pueden comprender un gen de CD47 humanizado unido
 10 operativamente a un promotor endógeno de SIRPα. Tales animales no humanos expresan una proteína CD47 humanizada a partir de un locus endógeno, en donde la proteína CD47 humanizada comprende los residuos de aminoácidos 16-292 (o 19-141 o 19-127) de una proteína CD47 humana. Tales animales no humanos incluyen cualquiera de los que pueden modificarse genéticamente para expresar una proteína CD47 como se describe en la presente, que incluyen, por ejemplo, mamíferos, por ejemplo, ratón, rata, conejo, cerdo, bovino (por ejemplo, vaca, toro, búfalo), ciervo, oveja, cabra, pollo, gato, perro, hurón, primate (por ejemplo, tití, mono Rhesus), etcétera. Por
 15 ejemplo, para los animales no humanos donde las células ES genéticamente modificables adecuadas no están fácilmente disponibles, pueden emplearse otros métodos para producir un animal no humano que comprende la modificación genética. Tales métodos incluyen, por ejemplo, la modificación de un genoma de células que no son ES (por ejemplo, un fibroblasto o una célula pluripotente inducida) y el empleo de transferencia nuclear de células somáticas (SCNT) para transferir el genoma modificado genéticamente a una célula adecuada, por ejemplo, un ovocito enucleado, y la gestación de la célula modificada (por ejemplo, el ovocito modificado) en un animal no humano en condiciones adecuadas para formar un embrión.

25 Los métodos para modificar el genoma de un animal no humano (por ejemplo, un genoma de cerdo, vaca, roedor, pollo, etcétera) incluyen, por ejemplo, emplear una nucleasa de dedos de zinc (ZFN) o una nucleasa efectora tipo activador de la transcripción (TALEN) para modificar un genoma de manera que incluya un gen de CD47 humanizado.

Un animal no humano descrito en el presente documento puede ser un mamífero. Un animal no humano descrito en el presente documento puede ser un mamífero pequeño, por ejemplo, de la superfamilia Dipodoidea o Muroidea. Un
 30 animal modificado genéticamente descrito en el presente documento puede ser un roedor. Un roedor descrito en la presente descripción puede seleccionarse de un ratón, una rata, y un hámster. Un roedor como se describe en la presente puede seleccionarse de la superfamilia Muroidea. Un animal modificado genéticamente descrito en el presente documento puede ser de una familia seleccionada de Calomyscidae (por ejemplo, hámsteres similares a ratón), Cricetidae (por ejemplo, hámster, ratas y ratones del Nuevo Mundo, ratones campestres), Muridae (ratones y ratas verdaderos, jerbos, ratones espinosos, ratas crestadas), Nesomyidae (ratones trepadores, ratones de roca, ratas coliblanco, ratas y ratones de Madagascar), Platacanthomyidae (por ejemplo, lirones espinosos), y Spalacidae (por ejemplo, ratas topo, ratas de bambú, y zokor). Un roedor modificado genéticamente descrito en el presente documento puede seleccionarse de un ratón o una rata verdaderos (familia Muridae), un jerbo, un ratón espinoso, y una rata crestada. Un ratón modificado genéticamente como se describe en la presente puede ser un miembro de la familia Muridae. Un animal no humano como se describe en la presente puede ser un roedor. Un roedor descrito en el presente documento puede seleccionarse de un ratón y una rata. Un animal no humano como se describe en la presente puede ser un ratón.

Un animal no humano como se describe en la presente puede ser un roedor que es un ratón de una cepa C57BL seleccionada de C57BL/A, C57BL/An, C57BL/GrFa, C57BL/KaLwN, C57BL/6, C57BL/6J, C57BL/6ByJ, C57BL/6NJ, C57BL/10, C57BL/10ScSn, C57BL/10Cr, y C57BL/Ola. Un ratón como se describe en la presente puede ser de una cepa 129 seleccionada del grupo que consiste en una cepa que es 129P1, 129P2, 129P3, 129X1, 129S1 (por ejemplo, 129S1/SV, 129S1/SvIm), 129S2, 129S4, 129S5, 129S9/SvEvH, 129/SvJae, 129S6 (129/SvEvTac), 129S7, 129S8, 129T1, 129T2 (ver, por ejemplo, Festing y otros, 1999, Mammalian genoma 10:836; Auerbach W. y otros, 2000, Biotechniques 29(5):1024-1028, 1030, 1032). Un ratón modificado genéticamente como se describe en la presente puede ser una mezcla de una cepa 129 mencionada anteriormente y una cepa C57BL/6 mencionada anteriormente. Un ratón como se describe en la presente puede ser una mezcla de las cepas 129 mencionadas anteriormente, o una mezcla de las cepas BL/6 mencionadas anteriormente. Una cepa 129 de la mezcla como se describe en la presente puede ser una cepa 129S6 (129/SvEvTac). Un ratón como se describe en la presente puede ser una cepa BALB, por ejemplo, la cepa BALB/c. Un ratón descrito en la presente descripción puede ser una mezcla de una cepa BALB y otra cepa mencionada anteriormente.

Un animal no humano como se describe en la presente descripción puede ser una rata, una rata descrita en la presente descripción se selecciona de una rata Wistar, una cepa LEA, una cepa Sprague Dawley, una cepa Fischer, F344, F6, y Dark Agouti. Una cepa de rata como se describe en la presente puede ser una mezcla de dos o más cepas seleccionadas del grupo que consiste en Wistar, LEA, Sprague Dawley, Fischer, F344, F6, y Dark Agouti.

Métodos que emplean animales no humanos que tienen genes de CD47 humanizados

65 Se ha informado de células y animales no humanos mutantes y transgénicos para CD47 (por ejemplo, minicerdos) (Koshimizu H. y otros (2014) PLoS One, 9(2):e89584; Lavender, K.J. y otros (2014) J. Immunol. Methods, 407:127-

134; Tena, A. y otros (2014) *Am. J. Transplant.* doi: 10.1111/ajt.12918; Lavender K.J. y otros (2013) *Blood*, 122(25):4013-4020; Tena, A. y otros (2012) *Transplantation* 94(10S):776; Wang, C. y otros (2011) *Cell Transplant.* 20(11-12):1915-1920; Johansen, M.L. y Brown, E.J. (2007) *J. Biol. Chem.* 282:24219-24230; Wang, H. y otros (2007) *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 104:13744-13749; Tulasne D. y otros (2001) *Blood*, 98(12):3346-52; Oldenborg, P. y otros (2000) *Science* 288:2051-2054; Verdrengh, M. y otros (1999) *Microbes Infect.* 1(10):745-751; Chang, H.P. y otros (1999) *Learn Mem.* 6(5):448-457; Wang, X.Q. y otros (1999) *J. Cell Biol.* 147(2):389-400; Lindberg, F.P. y otros (1996) *Science* 274(5288):795-798). Tales animales se han empleado en una variedad de ensayos para determinar, por ejemplo, los aspectos moleculares de la expresión, función y regulación de CD47. Se han descubierto diferencias considerables entre especies. De hecho, ratones diabéticos no obesos/con inmunodeficiencia combinada severa (NOD/SCID) expresan una proteína SIRP que es capaz de interactuar con el CD47 humano y, por lo tanto, se han usado ampliamente para el desarrollo de modelos en ratones con componentes del sistema inmunitario humano (por ejemplo, ver Takenaka, K. y otros (2007) *Nat. Immunol.* 8(12):1313-1323). El alelo de SIRP α presente en estos ratones no es representativo del alelo de SIRP α presente en otras cepas de ratón y, en general, existe poca reacción cruzada entre CD47 y SIRP α entre especies. Además, se ha informado que el CD47 en células de ratón tiene una movilidad casi completa, mientras que el CD47 en células humanas solo demuestra aproximadamente un 30-40 % (Bruce, L. y otros (2003) *Blood* 101:4180-4188; Mouro-Chanteloup, L. y otros (2000) *VoxSanguinis* 78:P030; Mouro-Chanteloup, L. y otros (2003) *Blood* 101:338-344). Así, los ratones NOD/SCID tienen limitaciones. Por ejemplo, aunque el desarrollo hematopoyético humano de múltiples linajes puede soportarse en algunos fondos genéticos (por ejemplo, BALB/c Rag2^{-/-}IL-2R^{c/-/-}), la homeostasis de otros tipos celulares permanece ineficiente (por ejemplo, células T y NK; ver por ejemplo, Gimeno, R. y otros (2004) *Blood* 104:3886-3893; Traggiai, E. y otros (2004) *Science* 304:104-107; Legrand, N. y otros (2006) *Blood* 108:238-245). Además, se conoce además que CD47 interactúa con otras proteínas de la superficie celular y proporcionan una señalización bidireccional. Así, los ratones existentes representan un sistema in vivo ineficiente para el esclarecimiento de funciones dependientes de CD47 en diversos procesos biológicos tales como, por ejemplo, injerto y fagocitosis. Además, los ratones existentes representan un sistema in vivo subóptimo para el desarrollo de terapias dirigidas a CD47.

Los animales no humanos descritos en el presente documento proporcionan un sistema in vivo mejorado y una fuente de materiales biológicos (por ejemplo, células) que expresan CD47 humano, los cuales son útiles para una variedad de ensayos. Los animales no humanos descritos en el presente documento pueden usarse para desarrollar agentes terapéuticos que se dirijan a CD47 y/o modulen la señalización CD47-SIRP α . Los animales no humanos como se describe en la presente pueden usarse para seleccionar y desarrollar productos terapéuticos candidatos (por ejemplo, anticuerpos) que se unen a CD47 humana. Los animales no humanos descritos en la presente descripción pueden usarse para seleccionar y desarrollar terapéuticos candidatos (por ejemplo, anticuerpos) que bloquean la interacción del CD47 humano con SIRP α humana. Los animales no humanos descritos en el presente documento pueden usarse para determinar el perfil de unión de antagonistas y/o agonistas al CD47 humanizado en la superficie de una célula de un animal no humano como se describe en el presente documento. Los animales no humanos de la presente invención se usan para determinar el epítipo o epítipos de uno o más anticuerpos terapéuticos candidatos que se unen al CD47 humano.

Los animales no humanos como se describe en la presente se usan para determinar los perfiles de farmacocinética de los anticuerpos anti-CD47. Uno o más animales no humanos como se describen en la presente y uno o más animales no humanos de control o de referencia cada uno se exponen a uno o más anticuerpos terapéuticos candidatos anti-CD47 a diversas dosis (por ejemplo, 0,1 mg/kg, 0, 2 mg/kg, 0, 3 mg/kg, 0, 4 mg/kg, 0, 5 mg/kg, 1 mg/kg, 2 mg/kg, 3 mg/kg, 4 mg/kg, 5 mg/kg, 7,5 mg/kg, 10 mg/kg, 15 mg/kg, 20 mg/kg, 25 mg/kg, 30 mg/kg, 40 mg/kg, o 50 mg/kg o más). Los anticuerpos terapéuticos candidatos pueden dosificarse por medio de cualquier vía de administración deseada (por ejemplo, por vía subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, etcétera). La sangre se aísla de los animales no humanos (humanizados y control) en diversos puntos de tiempo (por ejemplo, 0 h, 6 h, 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, 8 días, 9 días, 10 días, 11 días, o hasta 30 o más días). Diversos ensayos pueden realizarse para determinar los perfiles farmacocinéticos de los anticuerpos terapéuticos candidatos administrados mediante el uso de muestras obtenidas a partir de animales no humanos como se describen en la presente descripción, que incluyen, pero no se limitan a, IgG total, respuesta contra el anticuerpo terapéutico, aglutinación, etcétera.

Los animales no humanos descritos en la presente descripción pueden usarse para medir el efecto terapéutico de bloquear o modular la señalización de CD47 y el efecto sobre la expresión génica como un resultado de cambios celulares. Un animal no humano de la presente invención o células aisladas a partir de ellos se exponen a un producto terapéutico candidato que se une a una proteína CD47 humanizada (o una porción humana de una proteína CD47) en la superficie de una célula del animal no humano y, después de un periodo de tiempo posterior, se analizan para determinar los efectos sobre los procesos dependientes de CD47, por ejemplo, adhesión, angiogénesis, apoptosis, inflamación, migración, fagocitosis, proliferación y eliminación de tumores (o células tumorales).

Los animales no humanos de la presente invención expresan una proteína CD47 humanizada, por tanto pueden generarse células, líneas celulares, y cultivos celulares para servir como una fuente de CD47 humanizado para usar en ensayos funcionales y de unión, por ejemplo, ensayar la unión o función de un antagonista o agonista de CD47, particularmente donde el antagonista o agonista es específico para una secuencia o epítipo de SIRP α humano. Los

epítomos CD47 que se unen por anticuerpos candidatos terapéuticos pueden determinarse mediante el uso de células aisladas de animales no humanos como se describe en la presente.

5 Las células de los animales no humanos descritos en el presente documento pueden aislarse y usarse sobre una base ad hoc, o pueden mantenerse en cultivo por muchas generaciones. Las células de un animal no humano descrito en el presente documento pueden inmortalizarse y mantenerse en cultivo indefinidamente (por ejemplo, en cultivos en serie).

10 Las células y/o los animales no humanos como se describe en la presente pueden usarse en un ensayo de supervivencia y/o proliferación (por ejemplo, con el empleo de células B o T) para seleccionar y desarrollar productos terapéuticos candidatos que modulan la señalización de CD47 humano. La activación o pérdida de CD47 pueden desempeñar un papel importante en la regulación de la proliferación celular, y la inducción de la apoptosis por CD47 puede ser el resultado de la activación de epítomos específicos del dominio extracelular de CD47, por lo tanto, los moduladores de CD47 candidatos (por ejemplo, antagonistas o agonistas) pueden identificarse, caracterizarse y desarrollarse con el uso de células de animales no humanos de la presente invención y/o un animal no humano como se describe en la presente. Las células y/o los animales no humanos como se describe en la presente se usan en ensayo(s) de supervivencia o muerte para determinar el efecto sobre la proliferación o la apoptosis de una(s) célula(s) específica(s) (por ejemplo, células cancerosas) en presencia y ausencia de CD47.

15 Las células y/o animales no humanos de la presente invención se usan en el xenotrasplante de células heterólogas (por ejemplo, humanas) para determinar las funciones mediadas por CD47 en la respuesta fisiológica (por ejemplo, inmunitaria) a las células humanas trasplantadas. Los productos terapéuticos candidatos que se unen, o bloquean una o más funciones de, CD47 humana pueden caracterizarse en un animal no humano como se describe en la presente. Las mediciones adecuadas incluyen diversos ensayos celulares, ensayos de proliferación, análisis de inmunoglobulinas séricas (por ejemplo, titulación de anticuerpos), ensayos de citotoxicidad, y caracterización de las interacciones entre ligando y receptor (ensayos de inmunoprecipitación). Los animales no humanos como se describe en la presente pueden usarse para caracterizar las funciones mediadas por CD47 que regulan una respuesta inmunitaria a un antígeno. El antígeno puede asociarse con una neoplasia. El antígeno puede asociarse con una enfermedad o afección autoinmunitaria. El antígeno puede ser una diana asociada con una enfermedad o afección que padecen uno o más pacientes humanos que necesitan tratamiento.

20 Los animales no humanos como se describe en la presente pueden usarse en experimentos de trasplante o transferencia adoptiva para determinar el potencial terapéutico de compuestos o agentes biológicos para modular la regulación dependiente de CD47 de linfocitos nuevos y su función inmunológica. Los animales no humanos como se describe en la presente pueden trasplantarse con células B humanas.

25 Las células de animales no humanos descritos en el presente documento pueden usarse en un ensayo de dispersión o migración celular para tamizar y desarrollar agentes terapéuticos candidatos que modulen el CD47 humano. Tales procesos son necesarios para muchos procesos celulares que incluyen la cicatrización de heridas, la diferenciación, la proliferación y la supervivencia.

30 Las células de animales no humanos descritos en el presente documento pueden usarse en ensayos de fagocitosis para determinar el potencial terapéutico de compuestos o agentes biológicos que modulen la regulación de la fagocitosis dependiente de CD47.

35 Las células de los animales no humanos descritas en la presente descripción pueden usarse en ensayos de crecimiento de células tumorales para determinar el potencial terapéutico de compuestos o agentes biológicos para modular la regulación y/o apoptosis de las células tumorales dependiente de CD47.

40 Una enfermedad o afección inflamatoria puede inducirse en uno o más animales no humanos de la presente invención para proporcionar un sistema in vivo para determinar el potencial terapéutico de compuestos o agentes biológicos para modular la regulación dependiente de CD47 de una o más funciones de la enfermedad o afección inflamatoria. La enfermedad o afección inflamatoria puede estar asociada con una neoplasia.

45 Una afección antiangiogénica puede inducirse en uno o más animales no humanos descritos en la presente descripción para proporcionar un sistema in vivo para determinar el potencial terapéutico de compuestos o agentes biológicos para modular la regulación dependiente de CD47 de una o más funciones de la afección antiangiogénica. Las funciones ilustrativas que pueden evaluarse para determinar la eficacia terapéutica incluyen expresión de quimiocinas, respuestas estimuladas por el óxido nítrico (NO) y recuperación del flujo sanguíneo.

50 Los animales no humanos descritos en el presente documento pueden proporcionar un sistema in vivo para el análisis y prueba de un fármaco o vacuna. Un fármaco o vacuna candidato puede suministrarse a uno o más animales no humanos descritos en el presente documento, seguido del control de los animales no humanos para determinar una o más respuestas inmunitarias frente al fármaco o vacuna, el perfil de seguridad del fármaco o vacuna, o el efecto sobre una enfermedad o afección. Los métodos ilustrativos usados para determinar el perfil de seguridad incluyen mediciones de toxicidad, concentración de dosis óptima, eficacia del fármaco o vacuna, y posibles factores de riesgo. Tales fármacos o vacunas pueden mejorarse y/o desarrollarse en tales animales no humanos.

- 5 Los animales no humanos como se describen en la presente pueden proporcionar un sistema in vivo para evaluar las propiedades farmacocinéticas de un fármaco dirigido a CD47. Un fármaco dirigido a CD47 puede suministrarse o administrarse a uno o más animales no humanos como se describen en la presente descripción, seguido del control de los animales no humanos (o células aisladas a partir de estos), o la realización de uno o más ensayos en éstos, para determinar el efecto del fármaco sobre el animal no humano. Las propiedades farmacocinéticas incluyen, pero no se limitan a, la manera en que un animal procesa el fármaco hacia diversos metabolitos (o detección de la presencia o ausencia de uno o más metabolitos del fármaco, que incluyen, metabolitos tóxicos), tiempo de vida media del fármaco, niveles circulantes del fármaco después de su administración (por ejemplo, concentración sérica del fármaco), respuesta contra el fármaco (por ejemplo, anticuerpos contra el fármaco), absorción y distribución del fármaco, vía de administración, vías de excreción y/o eliminación del fármaco. Las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas de los fármacos (por ejemplo, moduladores de CD47) se controlan en los animales no humanos o a través del uso de estos como se describen en la presente.
- 10
- 15 Los animales no humanos de la presente invención proporcionan un sistema in vivo para evaluar la toxicidad por acción en el objetivo de un fármaco dirigido a CD47. Un fármaco dirigido a CD47 puede suministrarse o administrarse a uno o más animales no humanos como se describen en la presente descripción, seguido del control de los animales no humanos (o células aisladas a partir de estos), o la realización de uno o más ensayos en éstos, para determinar el efecto de la toxicidad por acción en el objetivo del fármaco sobre el animal no humano. Típicamente, los fármacos se destinan a modular una o más funciones de sus objetivos. Solo para dar un ejemplo, un modulador de CD47 está destinado a modular las funciones mediadas por CD47 (por ejemplo, apoptosis inducida por CD47) a través de la interacción de alguna manera con la molécula de CD47 en la superficie de una o más células. Un modulador de este tipo puede tener un efecto adverso que es una exageración de la(s) acción(es) farmacológica(s) deseada(s) del modulador. Tales efectos se denominan efectos por acción sobre el objetivo. Los efectos por unión al objetivo ilustrativos incluyen una dosis demasiado elevada, activación/inactivación crónica, y acción correcta en un tejido incorrecto. Los efectos por acción sobre el objetivo de un fármaco dirigido a CD47, identificados en los animales no humanos de la presente invención, o a través del uso de estos, se usan para determinar una o más funciones de CD47 previamente desconocidas.
- 20
- 25
- 30 Los animales no humanos de la presente invención proporcionan un sistema in vivo para evaluar la toxicidad fuera del objetivo de un fármaco dirigido a CD47. Un fármaco dirigido a CD47 puede suministrarse o administrarse a uno o más animales no humanos como se describen en la presente descripción, seguido del control de los animales no humanos (o células aisladas a partir de estos), o la realización de uno o más ensayos en éstos, para determinar el efecto de la toxicidad fuera del objetivo del fármaco sobre el animal no humano. Los efectos por acción fuera del objetivo pueden producirse cuando un fármaco interactúa con un objetivo no previsto (por ejemplo, reactividad cruzada a un epítipo común). Tales interacciones pueden producirse en un tejido previsto o no previsto. Para proporcionar un ejemplo, los isómeros especulares (enantiómeros) de un fármaco pueden conducir a efectos tóxicos por acción fuera del objetivo. Además, un fármaco puede interactuar de manera inadecuada con diferentes subtipos de receptores y activarlos de manera no intencional. Los efectos por acción fuera del objetivo ilustrativos incluyen la activación/inhibición incorrecta de un objetivo incorrecto independientemente del tejido en el que se encuentra el objetivo incorrecto. Los efectos por acción fuera del objetivo de un fármaco dirigido a CD47 se determinan mediante la comparación de los efectos de la administración del fármaco a los animales no humanos de la presente invención con uno o más animales no humanos de referencia.
- 35
- 40
- 45 La realización de un ensayo incluye determinar el efecto sobre el fenotipo (por ejemplo, cambio del peso corporal) y/o el genotipo del animal no humano al que se administra el fármaco. La realización de un ensayo incluye determinar la variabilidad lote a lote de un modulador de CD47 (por ejemplo, un antagonista o un agonista). La realización de un ensayo incluye determinar las diferencias entre los efectos de un fármaco dirigido a CD47 administrado a un animal no humano como se describe en la presente descripción y a un animal no humano de referencia. Los animales no humanos de referencia pueden tener una modificación como se describe en la presente, una modificación que es diferente a como se describe en la presente (por ejemplo, una que tiene una interrupción, delección o un gen de CD47 no funcional de cualquier otra manera) o puede no tener modificaciones (es decir, un animal no humano de tipo silvestre).
- 50
- 55 Los parámetros ilustrativos que pueden medirse en los animales no humanos (o en células aisladas a partir de ellos y/o con el uso de éstas) para evaluar las propiedades farmacocinéticas, la toxicidad por acción en el objetivo, y/o la toxicidad por acción fuera del objetivo de un fármaco dirigido a CD47 incluyen, pero no se limitan a, aglutinación, autofagia, división celular, muerte celular, hemólisis mediada por complemento, integridad del ADN, título de anticuerpos específicos para el fármaco, metabolismo del fármaco, arreglos de expresión génica, niveles de hematocrito, hematuria, actividad metabólica, actividad mitocondrial, estrés oxidativo, fagocitosis, biosíntesis de proteínas, degradación de proteínas, secreción de proteínas, respuesta al estrés, concentración del fármaco en el tejido objetivo, concentración del fármaco en tejido que no es objetivo, actividad transcripcional y similares. Los animales no humanos como se describen en la presente se usan para determinar una dosis con eficacia farmacéutica de un modulador de CD47.
- 60
- 65

Los animales no humanos como se describen en la presente proporcionan un sistema in vivo mejorado para el desarrollo y caracterización de productos terapéuticos candidatos para usar en cáncer. Los animales no humanos como se describe en la presente pueden implantarse con un tumor, seguido de la administración de uno o más productos terapéuticos candidatos. Los productos terapéuticos candidatos pueden incluir un anticuerpo multiespecífico (por ejemplo, un anticuerpo biespecífico) o un cóctel de anticuerpos; los productos terapéuticos candidatos incluyen una terapia de combinación tal como, por ejemplo, la administración de anticuerpos monoespecíficos dosificados de manera secuencial o simultánea. El tumor puede dejarse durante el tiempo suficiente para su establecimiento en uno o más sitios dentro del animal no humano. La proliferación, crecimiento, etcétera, de células tumorales puede medirse antes y después de la administración con el o los productos terapéuticos candidatos. La citotoxicidad de los productos terapéuticos candidatos puede medirse además en el animal no humano según convenga.

Los animales no humanos descritos en el presente documento pueden proporcionar un sistema in vivo mejorado para elucidar los mecanismos de la interacción de célula a célula humana a través de transferencia adoptiva. Los animales no humanos descritos en el presente documento pueden implantarse con un xenoinjerto de tumor, seguido de un segundo implante de linfocitos infiltrantes de tumores que pueden implantarse en los animales no humanos mediante transferencia adoptiva para determinar la eficacia en la erradicación de tumores sólidos u otras enfermedades malignas. Tales experimentos pueden realizarse con células humanas debido a la presencia exclusiva de CD47 humano sin competencia con CD47 endógeno del animal no humano. Alternativamente, tales experimentos pueden incluir el uso de células de ratón de un fondo NOD/SCID o BRG (BALB/c Rag2^{-/-}IL-2Rγc^{-/-}). Además, las terapias y los agentes farmacéuticos para usar en el xenotrasplante pueden mejorarse y/o desarrollarse en tales animales no humanos.

Los animales no humanos descritos en el presente documento pueden proporcionar un sistema in vivo mejorado para el mantenimiento y desarrollo de células madre hematopoyéticas humanas a través del injerto. Los animales no humanos descritos en el presente documento pueden proporcionar un mejor desarrollo y mantenimiento de las células madre humanas dentro del animal no humano. Puede observarse un aumento de las poblaciones de células B y T humanas diferenciadas en la sangre, la médula ósea, el bazo y el timo del animal no humano. Se observa una homeostasis óptima de las células T y NK en las células en sangre, médula ósea, bazo y timo del animal no humano. Los animales no humanos de la presente invención demuestran un aumento en el nivel o cantidad de glóbulos rojos (RBC) en comparación con uno o más animales no humanos de referencia.

Los animales no humanos descritos en el presente documento pueden emplearse para evaluar la eficacia de un fármaco terapéutico dirigido a células humanas. Un animal no humano descrito en el presente documento puede recibir un trasplante de células humanas, y un candidato a fármaco dirigido a dichas células humanas se administra a dicho animal no humano. Después se determina la eficacia terapéutica del fármaco mediante el control de las células humanas en el animal no humano después de la administración del fármaco. Los fármacos que pueden someterse a prueba en los animales no humanos incluyen compuestos moleculares pequeños, es decir, compuestos de pesos moleculares menores que 1500 kD, 1200 kD, 1000 kD, u 800 Dalton, y compuestos moleculares grandes (tales como proteínas, por ejemplo, anticuerpos), que tienen efectos terapéuticos previstos para el tratamiento de enfermedades y afecciones humanas al dirigirse a células humanas (por ejemplo, unión a ellas y/o acción sobre ellas).

El fármaco es un fármaco anticancerígeno, y las células humanas pueden ser células cancerosas, que pueden ser células de un cáncer primario o células de líneas celulares establecidas a partir de un cáncer primario. En estos casos, un animal no humano descrito en el presente documento recibe un trasplante de células cancerosas humanas, y se le suministra un fármaco anticancerígeno al animal no humano. La eficacia del fármaco puede determinarse al evaluar si el crecimiento o la metástasis de las células cancerosas humanas en el animal no humano se inhibe como resultado de la administración del fármaco.

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

Un animal no humano descrito en el presente documento puede recibir un injerto de células inmunitarias humanas o células que se diferencian en células inmunitarias humanas. Dicho animal no humano con las células inmunitarias humanas injertadas recibe un trasplante de células cancerosas humanas, y una administración de un fármaco anticancerígeno, tal como un anticuerpo biespecífico que se une a un antígeno en las células cancerosas humanas y a un antígeno en las células inmunitarias humanas (por ejemplo, células T). La eficacia terapéutica del anticuerpo biespecífico puede evaluarse en base a su capacidad para inhibir el crecimiento o las metástasis de las células cancerosas humanas en el animal no humano. El animal no humano descrito en el presente documento puede recibir un injerto de células progenitoras hematopoyéticas humanas CD34+ que producen células inmunitarias humanas (que incluyen células T, células B, células NK, entre otras). Las células de linfoma de células B humanas (por ejemplo, células Raji) se trasplantan a dicho animal no humano con células inmunitarias humanas injertadas, el cual se administra después con un anticuerpo biespecífico que se une a un antígeno tumoral (por ejemplo, un antígeno en las células B normales y determinados tumores malignos de células B, tal como CD20) y a la subunidad CD3 del receptor de células T, para probar la capacidad del anticuerpo biespecífico para inhibir el crecimiento del tumor en el animal no humano.

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos se proporcionan para describir a los expertos en la técnica cómo producir y usar los métodos y composiciones de la invención, y no están destinados a limitar el alcance de lo que los inventores consideran como su invención. A menos que se indique de cualquier otra manera, la temperatura se indica en Celsius, y la presión es la atmosférica o cercana a ella.

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

Este ejemplo muestra métodos ilustrativos para la humanización de un gen endógeno que codifica al grupo de diferenciación 47 (CD47) en un mamífero no humano tal como un roedor (por ejemplo, un ratón). Los métodos descritos en este ejemplo pueden emplearse para humanizar un gen de CD47 endógeno de un animal no humano con el uso de cualquier secuencia humana, o combinación de secuencias humanas (o fragmentos de secuencias) según convenga. En este ejemplo, un gen de CD47 humano que aparece en el clon del cromosoma artificial bacteriano (BAC) RP11-69A17 se emplea para humanizar un gen de CD47 endógeno de un ratón.

Un vector de transformación para la humanización del material genético que codifica un dominio V Ig N-terminal extracelular y cinco dominios de transmembrana de un gen de CD47 endógeno se construyó mediante el uso de tecnología VELOCIGENE (ver, por ejemplo, patente de los Estados Unidos núm. 6,586,251 y Valenzuela y otros (2003) High-throughput engineering of the ratón genoma coupled with high-resolution expression analysis, Nature Biotech. 21(6):652-659).

En resumen, el clon del cromosoma artificial bacteriano (BAC) de ratón RP23-230L20 (Invitrogen) se modificó para eliminar la secuencia que contiene los exones 2-7 de un gen de CD47 endógeno e insertar los exones 2-7 de un gen de CD47 humano mediante el uso del clon de BAC humano RP11-69A17 (Invitrogen), el cual codifica los aminoácidos 16-292 de un polipéptido de CD47 humano. Se retuvo el ADN endógeno que contiene ADN genómico correspondiente a los exones 1, 8 y 9 de la isoforma 2 así como las regiones no traducidas en 5' y 3' (UTR). El análisis de secuencias de la secuencia de CD47 humana contenida en el clon de BAC RP11-69A17 confirmó todos los exones de CD47 y las señales de corte y empalme. El análisis de secuencia reveló que la secuencia coincidía con el genoma de referencia y los transcritos de CD47 NM_001777.3 y NM_198793.2. El ADN genómico correspondiente a los exones 2-7 de un gen de CD47 endógeno (~30, 8 kb) se reemplazó en el clon de BAC RP23-230L20 mediante recombinación homóloga en células bacterianas para insertar un fragmento de ADN que contiene ~23,9 kb de ADN genómico humano correspondiente a los exones 2-7 de un gen de CD47 humano a partir de un clon de BAC RP11-69A17 y ~4995 pb correspondientes a un casete de neomicina autoeliminable flanqueado por sitios de reconocimiento de recombinasas (loxP-hUb1-em7-Neo-pA-mPrr1-Crei-loxP; ver las patentes de los Estados Unidos núms. 8,697,851, 8,518,392 y 8,354,389). El casete de neomicina autoeliminable se añadió al extremo del fragmento de ADN humano de ~23,9 kb que contiene los exones 2-7 del gen de CD47 humano (Figura 2). El vector de transformación contenía, de 5' a 3', un brazo de homología en 5' que contiene ~39 kb de ADN genómico de ratón del clon de BAC RP23-230L20, ~29,3 kb de ADN genómico humano del clon de BAC RP11-69A17 (que contiene los exones 2-7 de un gen de CD47 humano), un casete de neomicina autoeliminable flanqueado por sitios loxP, ~98,8 kb de ADN genómico de ratón del clon de BAC RP23-230L20. Después de la recombinación homóloga en las células bacterianas con el vector de transformación descrito anteriormente, se creó un clon de BAC RP23-230L20 modificado que resultó en un gen de CD47 humanizado que contenía una UTR 5' de ratón, un exón 1 de ratón, los exones humanos 2-7, los exones de ratón 8-9 y una UTR 3' de ratón. Las secuencias de proteínas de cuatro isoformas proyectadas de corte y empalme alternativos de CD47 humanizado se proporcionan en la Tabla 3 que indica los aminoácidos de ratón y humanos resultantes, codificados por el ADN de ratón y humano, respectivamente.

El clon de BAC modificado descrito anteriormente se utilizó para la electroporación de F1H4 (50 % 129/S6/SvEv/Tac, 50 % C57BL/6NTac; Auerbach, W. y otros (2000) Biotechniques 29(5):1024-8, 1030, 1032) células madre embrionarias (ES) de ratón para crear células ES modificadas que comprenden un gen de CD47 endógeno que se humaniza a partir de los exones 2-7. Las células ES transformadas positivamente que contienen un gen de CD47 humanizado se identificaron mediante un ensayo (Valenzuela y otros, más arriba) que detectó la presencia de las secuencias de CD47 humano (por ejemplo, los exones 2-7) y confirmó la pérdida y/o retención de las secuencias de CD47 de ratón (por ejemplo, los exones 1, 8 y 9 y/o los exones 2-7). La Tabla 4 expone los cebadores y sondas que se usaron para confirmar la humanización de un gen de CD47 endógeno como se describió anteriormente (Figura 3). La secuencia de nucleótidos a través del punto de inserción corriente arriba incluyó lo siguiente, que indica la secuencia endógena de ratón corriente arriba del punto de inserción (contenida dentro de los paréntesis más abajo con un sitio de restricción AsiSI en letras cursivas) unida de manera contigua a una secuencia de CD47 humana presente en el punto de inserción: (GCAGACATGA TTAⁱCTTCAGA GCTTTCⁱAAAG CTAGATACTG TACCTTGCAT ATTCCAACAC) GCGATCGC ATTTAAGAT TTCCATCCT AGTGGAAGA TATGATTGA TTCATCCTAT TACTTTGTA TATTAAAGTA CAGTAGAACC TGCCACTTTT (sec. con núm de ident.: 33). La secuencia de nucleótidos a través del punto de inserción corriente abajo en el extremo 5' del casete de resistencia a neomicina autoeliminable incluyó lo siguiente, que indica una secuencia genómica de CD47 humana contigua con la secuencia del casete corriente abajo del punto de inserción (contenida dentro de los paréntesis más abajo con la secuencia loxP en letras cursivas): GGATCCATTT TAAGTAATAG AATAGGATTT TTAATTGTTT CAGTGTTTCT GTGATAGAGC TGTCCTGCAC

AGACCTGTTT (CTCGAGATAA CTTCGTATAA TGTATGCTAT ACGAAGTTAT ATGCATGGCC TCCGCGCCGG
 GTTTTGGCGC CTCCCGCGGG) (sec. con núm. de ident.: 34). La secuencia de nucleótidos a través del punto de
 inserción corriente abajo en el extremo 3' del casete de resistencia a neomicina incluyó lo siguiente, que indica la
 secuencia del casete contigua con la secuencia genómica de ratón en 3' del exón 7 de un gen endógeno de CD47
 5 (contenida dentro de los paréntesis más abajo con la secuencia loxP en letras cursivas): CATGTCTGGA
 ATAACCTCGT ATAATGTATG CTATACGAAG TTATGCTAGT AACTATAACG GTCCTAAGGT AGCGACTAGC
 (ATTAGTATGG AAGGTCCGTC CACTGTCCAG GTTCCTCTTG CGGAGCTCTT TGTCTCTCTG GACTCTGTAT
 AACTGCTTG) (sec. con núm de ident.: 35). La secuencia de nucleótidos a través del punto de inserción corriente
 10 abajo después de la delección del casete de resistencia a neomicina (76 pb restantes) incluyó lo siguiente, que indica
 la yuxtaposición de las secuencias genómicas de ratón y humana con la secuencia loxP restante de la secuencia del
 casete (contenida dentro de los paréntesis más abajo con la secuencia loxP en letras cursivas): GGATCCATTT
 TAAGTAATAG AATAGGATTT TTAATTGTTT CAGTGTTTCT GTGATAGAGC TGTCCTGCAC AGACCTGTTT
 (CTCGAGATAA CTTCGTATAA TGTATGCTAT ACGAAGTTAT GCTAGTAACT ATAACGGTCC TAAGGTAGCG
 ACTAGC)ATT AGTATGGAAG GTCCGTCCAC TGTCCAGTT CCTCTTGCGG AGCTCTTTGT CTCTCTGGAC
 15 TCTGTATACA CTGCTTGCAT (sec. con núm de ident.: 36).

Los clones positivos de células ES se usaron después para implantar ratones hembras mediante el uso del método
 VELOCIMOUSE® (ver, por ejemplo, patente de los Estados Unidos núm. 7,294,754 y Poueymirou y otros, F0
 generation mice that are essentially fully derived from the donor gen-targeted ES cells allowing immediate phenotypic
 20 analyses, 2007, Nature Biotech. 25(1):91-99) para generar una camada de crías que contienen una inserción de los
 exones 2-7 de un gen de CD47 humano en un gen de CD47 endógeno de un ratón. Los ratones que tienen la
 humanización de los exones 2-7 de un gen de CD47 endógeno se volvieron a confirmar e identificar mediante la
 genotipificación del ADN aislado a partir de fragmentos de la cola con el uso de una modificación del ensayo de alelos
 (Valenzuela y otros, más arriba) que detectó la presencia de las secuencias del gen de CD47 humano. Las crías se
 25 genotipan y las cohortes de animales heterocigotos para la construcción génica del CD47 humanizado se
 seleccionan para su caracterización.

TABLA 4

Nombre	Iniciador	Secuencia (5'-3')	
	Directo	TGCAGAAGTCACTAGGAGGAAT	(sec. con núm. de ident.:21)
7190mTU	Sonda	TCAGTCAACTTCTTCTGGGTTGTTT CC	(sec. con núm. de ident.:22)
	Inverso	GTGCCAGACTCACTTTCTATCCA	(sec. con núm. de ident.:23)
	Directo	TGCTGCCAATATACGGCTTCTG	(sec. con núm. de ident.:24)
7190mTD	Sonda	CAGCTCTCATAGCCAACACTATGGTG CC	(sec. con núm. de ident.:25)
	Inverso	TCAAGCAGAGCCTGGTTATCTG	(sec. con núm. de ident.:26)
	Directo	GTCGTCATTCCATGCTTTGTTAC	(sec. con núm. de ident.:27)
7190hTU	Sonda	TGGAGGCACAAAACACTACTGAAG TATACG	(sec. con núm. de ident.:28)
	Inverso	GGACAGTGGACTTGTTTAGAGC	(sec. con núm. de ident.:29)
	Directo	GGCTTGGTGGCTGATTGTTCT	sec. con núm. de ident.:30
7190hTD	Sonda	AGCACCCAAACTGATATGCCTGTA TTTG	(Sec. con núm. de ident.:31)
	Inverso	TGGGAAGTGGTGTTCAGTCTA	(Sec. con núm. de ident.:32)

65 Ejemplo 2. Expresión de un polipéptido de CD47 humanizado por los glóbulos rojos de ratón.

Este Ejemplo demuestra que los animales no humanos (por ejemplo, roedores) modificados de manera que contengan un gen de CD47 humanizado de conformidad con el Ejemplo 1 pueden usarse para el tamizaje de moduladores de CD47 (por ejemplo, anticuerpos anti-CD47) y la determinación de diversas características tales como, por ejemplo, farmacocinética y perfiles de seguridad. En este Ejemplo, se realiza un tamizaje de varios anticuerpos anti-CD47 en glóbulos rojos de ratón (RBC) aislados a partir de roedores obtenidos de acuerdo con el Ejemplo 1, dichos roedores expresan un polipéptido de CD47 humanizado como se describe en la presente.

En resumen, se transfirieron 2 mL de sangre completa de ratones con CD47 humanizado (n=2) a un tubo de 15 mL y centrifugaron a 200xg durante 10 minutos a 4 °C. El plasma y la capa leucocitaria se aspiraron y después se añadió 15 mL de PBS y las células se mezclaron suavemente. La mezcla se centrifugó de nuevo a 200xg durante cinco minutos a 4 °C. El sobrenadante se aspiró y las células se lavaron dos veces adicionales. Los RBC sedimentados se resuspendieron hasta un volumen final en 10 ml de PBS. Los RBC resuspendidos se centrifugaron por última vez a 200xg durante 10 minutos a 4 °C. El volumen de los RBC empaquetados se estimó en 0,5 mL y se diluyó hasta una concentración de 0,5 % con PBS (0,5 ml de RBC empaquetados/100 ml de PBS). La concentración real de RBC se determinó con un contador de células Cellometer Auto T4 (1,5 x 10⁷/ml; Nexcelom Bioscience).

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

TABLA 5

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

Como se muestra en la Figura 4, todos los anticuerpos anti-CD47 se unieron a los RBC de ratones con CD47 humanizado. En conjunto, este Ejemplo demuestra que (1) los animales no humanos (por ejemplo, roedores) modificados genéticamente para contener un gen de CD47 humanizado como se describe en la presente expresan un polipéptido de CD47 humanizado en la superficie de las células (por ejemplo, RBC) del animal no humano, y (2) tales células son útiles para el tamizaje de moduladores de CD47 (por ejemplo, anticuerpos para CD47) y determinar los perfiles farmacocinéticos de tales moduladores.

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

Este Ejemplo demuestra adicionalmente que los animales no humanos (por ejemplo, roedores) modificados para contener un gen de CD47 humanizado de acuerdo con el Ejemplo 1 pueden usarse en diversos ensayos (por ejemplo, ensayo de hemaglutinación) para el tamizaje de moduladores de CD47 (por ejemplo, anticuerpos anti-CD47) y para determinar diversas características tales como, por ejemplo, farmacocinética y perfiles de seguridad. En este Ejemplo, se realiza un tamizaje de varios anticuerpos anti-CD47 en glóbulos rojos de ratón (RBC) que expresan un polipéptido de CD47 humanizado como se describe en la presente para determinar la concentración de anticuerpos que promueve la hemaglutinación.

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

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

5 Como se muestra en La Figura 5, solo la lectina provocó aglutinación en ratones de tipo silvestre. Sin embargo, dos anticuerpos anti-CD47 (Ac E y Ac C) además de la lectina indujeron aglutinación en los RBC de dos roedores con CD47 humanizado obtenidos de acuerdo con el Ejemplo 1. La concentración a la que estos dos anticuerpos indujeron aglutinación comenzó desde los 11 nM. En conjunto, este Ejemplo demuestra que los animales no humanos (por ejemplo, roedores) modificados genéticamente para contener un gen de CD47 humanizado como se describe en la presente pueden usarse para evaluar una o más propiedades (por ejemplo, hemaglutinación) de moduladores de CD47 (por ejemplo, anticuerpos para CD47).

Ejemplo 4. Eliminación farmacocinética de moduladores de CD47 en roedores con CD47 humanizado.

15 Este Ejemplo ilustra un método para evaluar la eliminación farmacocinética de moduladores de CD47 (por ejemplo, anticuerpos anti-CD47) en animales no humanos (por ejemplo, roedores) modificados para contener un gen de CD47 humanizado de acuerdo con el Ejemplo 1. En este Ejemplo, los roedores de tipo silvestre y con CD47 humanizado (por ejemplo, ratones) se administraron con anticuerpos anti-CD47 y los niveles de anticuerpos en suero se determinaron mediante el uso de un ensayo ELISA.

20 En resumen, los ratones de tipo silvestre (n=5) u homocigotos para CD47 humanizado (n=5; como se describió anteriormente) se administraron con cuatro anticuerpos anti-CD47 (Ac F, Ac G, Ac H y Ac I) y un anticuerpo control de isotipo IgG4s (IgG4s). El fondo genético de los ratones fue 75 % CD57BL/6 y 25 % 129Sv. Cada anticuerpo se analizó en cinco roedores con CD47 humanizado. Todos los anticuerpos se administraron por vía subcutánea a una dosis de 50 mg/kg. Una extracción de sangre previa se recolectó un día antes de la administración de anticuerpos (día 0). Las extracciones posteriores a la inyección se recolectaron a las 6 horas, 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 7 días, 10 días y 14 días. Las fracciones séricas de las extracciones de sangre se separaron y se sometieron a análisis de anticuerpos humanos totales mediante el uso de un inmunoensayo ELISA.

25 En resumen, las placas de 96 pocillos se recubrieron con un anticuerpo policlonal de cabra anti-IgG humana (Jackson ImmunoResearch) para capturar los anticuerpos humanos analizados en los sueros, y después los anticuerpos unidos a la placa se detectaron mediante el uso de un anticuerpo policlonal de cabra anti-IgG humana conjugado con peroxidasa de rábano picante (Jackson ImmunoResearch) y el sustrato TMB (BD Pharmingen). Las muestras de suero se prepararon en diluciones en serie de seis dosis y los estándares de referencia de los anticuerpos respectivos se prepararon en diluciones en serie de 12 dosis. Las concentraciones de los anticuerpos como fármacos en los sueros se calcularon en base a la curva patrón de referencia generada mediante el uso del programa informático Graphpad Prism. Los resultados ilustrativos se muestran en la Figura 6 y la Tabla 6.

30 Los datos demostraron que los anticuerpos administrados a los ratones de tipo silvestre y humanizados como se describe en la presente se toleraron bien. En conjunto, este Ejemplo demuestra que los animales no humanos de la presente invención pueden usarse para evaluar una o más propiedades farmacocinéticas de un fármaco dirigido a CD47 (por ejemplo, un anticuerpo anti-CD47) tales como, por ejemplo, los niveles del fármaco circulante. Además, los animales no humanos descritos en la presente pueden usarse para evaluar la toxicidad de un fármaco dirigido a CD47 mediante la determinación de los efectos adversos después de la administración.

45 **TABLA 6**

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

Ejemplo 5. Perfiles de farmacocinética de moduladores de CD47 en roedores con CD47/SIRPα humanizados.

50 Este Ejemplo ilustra un método para evaluar la eliminación farmacocinética de moduladores de CD47 (por ejemplo, anticuerpos anti-CD47) en animales no humanos (por ejemplo, roedores) modificados para contener genes de CD47 (de acuerdo con el Ejemplo 1) y SIRPα humanizados. En particular, los roedores con CD47 humanizado descritos en la presente se modificaron para contener además un gen de SIRPα humanizado que contiene una porción endógena y una porción humana, dicha porción humana codifica el dominio extracelular de una proteína SIRPα humana (por ejemplo, los aminoácidos 28-362 de una proteína SIRPα humana) y dicha porción endógena codifica un dominio intracelular de una proteína SIRPα endógena (por ejemplo, los aminoácidos que codifican las porciones

transmembrana e intracelular de una proteína SIRP α murina) como se describe en el documento núm. PCT/US14/56910, presentado el 23 de septiembre de 2014. Los ratones CD47/SIRP α doblemente humanizados se obtuvieron al cruzar ratones con SIRP α humanizado con ratones con CD47 humanizado. En este Ejemplo, los roedores CD47/SIRP α doblemente humanizados (por ejemplo, ratones) se administraron con diversos anticuerpos anti-CD47 y se determinaron sus correspondientes perfiles farmacocinéticos.

En resumen, los grupos de ratones de tipo silvestre (n=5) y homocigotos para los genes humanizados de CD47 y SIRP α (CD47^{hu/hu}SIRP α ^{hu/hu}; n=5 por grupo) se administraron con anticuerpos anti-CD47 seleccionados y un anticuerpo control de isotipo IgG4 (hIgG4s). El fondo genético de los ratones fue 75 % CD57BL/6 y 25 % 129Sv. Todos los anticuerpos se administraron en una única dosis subcutánea de 50 mg/kg. Una extracción de sangre previa se recolectó un día antes de la administración de anticuerpos (día 0). Las extracciones de sangre posteriores a la inyección se recolectaron a las 6 horas, 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 7 días y 10 días. Las fracciones séricas de las muestras de sangre se separaron y se sometieron a análisis de anticuerpos humanos totales mediante el uso de un inmunoensayo ELISA (descrito anteriormente). Adicionalmente, se midieron los niveles de hematocrito a las 6 horas, 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 7 días y 10 días y se realizó una prueba de orina en caso de ser necesario (a las 6 horas y cuando el color de la orina se desvió del color amarillo) para determinar los conteos de glóbulos rojos. Los resultados ilustrativos se muestran en las Figuras 7-9.

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

El Ac J tuvo menos efecto sobre los niveles de hematocrito que otros anticuerpos anti-CD47 analizados (Ac F, Ac G, Ac I, etc.) y cambios comparables en los niveles de hematocrito con respecto al control (hIgG4s) en ratones CD47^{hu/hu}SIRP α ^{hu/hu}. Las mediciones del hematocrito en los días 2-4 mostraron la mayor caída a partir de un intervalo normal (~38,5-45,1 %), lo cual incluyó a los grupos administrados con los Ac F, G e I. En particular, una forma monovalente del Ac F demostró un efecto de disminución retardada en el hematocrito en comparación con otros anticuerpos analizados. Los inventores razonaron que las diferencias en los niveles de hematocrito entre los diversos grupos de tratamiento podrían atribuirse a una diferencia en el epítipo reconocido por los diversos anticuerpos. Además, los ratones dosificados con anticuerpos anti-CD47 seleccionados demostraron pruebas positivas de la varilla de orina para el hemo a las 6 horas. Por ejemplo, cada uno de los grupos de tratamiento con Ac J y Ac F tuvo un ratón positivo para el hemo en el día 1, mientras que en todos los otros puntos de tiempo fueron negativos. No se observó una pérdida significativa del peso (>20 %) en ningún grupo de tratamiento.

En conjunto, este Ejemplo demuestra que los animales no humanos de la presente invención proporcionan un sistema in vivo para evaluar las propiedades farmacocinéticas y/o los perfiles de uno o más fármacos dirigidos a CD47 (por ejemplo, uno o más anticuerpos anti-CD47) tales como, por ejemplo, niveles del fármaco circulante. Además, los animales no humanos como se describen en la presente, modificados genéticamente para contener además otros genes humanizados (por ejemplo, SIRP α humanizado) pueden usarse para evaluar la eliminación mediada por el objetivo de uno o más fármacos dirigidos a CD47.

Equivalentes

Habiendo descrito así diversos aspectos de al menos una modalidad de esta invención, los expertos en la técnica apreciarán que pueden idear fácilmente diversas alteraciones, modificaciones, y mejoras. Tales alteraciones, modificaciones, y mejoras están destinadas a ser parte de esta descripción y están destinadas a estar dentro del alcance de la invención. En consecuencia, la descripción y figuras anteriores son solo a manera de ejemplo y la invención se describe en detalle en las reivindicaciones que siguen.

El uso de términos ordinales tales como "primero", "segundo", "tercero", etcétera, en las reivindicaciones para modificar un elemento de reivindicación no connota por sí mismo una prioridad, precedencia, u orden de un elemento de reivindicación sobre otro o el orden temporal en el que se realizaron los actos de un método, sino que se usan simplemente como marcadores para distinguir un elemento de reivindicación con un nombre determinado de otro elemento con el mismo nombre (excepto por el uso del término ordinal) para distinguir los elementos de reivindicación.

Debe entenderse que los artículos "un" y "una" como se usan en la presente descripción y en las reivindicaciones incluyen los referentes plurales, a menos que se indique claramente lo contrario. Las reivindicaciones o descripciones que incluyen "o" entre uno o más miembros de un grupo se consideran satisfechos si uno, más de uno, o todos los miembros del grupo están presentes, se emplean, o son relevantes de cualquier otra manera en un determinado producto o proceso a menos que se indique lo contrario o sea evidente de cualquier otra manera a partir del contexto. La invención incluye modalidades en las que exactamente un miembro del grupo está presente, se emplea, o es relevante de cualquier otra manera en un determinado producto o proceso. La invención incluye, además, modalidades en las que más de uno, o todos los miembros del grupo están presentes, se emplean, o son relevantes de cualquier

- otra manera en un determinado producto o proceso. Además, debe entenderse que la invención abarca todas las variaciones, combinaciones y permutaciones en las que una o más limitaciones, elementos, cláusulas, términos descriptivos, etcétera, de una o más de las reivindicaciones enumeradas se introducen en otra reivindicación dependiente de la misma reivindicación base (o, según sea relevante, cualquier otra reivindicación) a menos que se indique de cualquier otra manera o a menos que sea evidente para un experto en la técnica que surja una contradicción o inconsistencia. Cuando los elementos se presentan como listas, (por ejemplo, en un grupo Markush o formato similar) debe entenderse que cada subgrupo de los elementos también se describe, y cualquier elemento(s) puede eliminarse del grupo. Debe entenderse que, en general, cuando la invención, o aspectos de la invención, se denomina(n) como que comprenden elementos, características particulares, etcétera, determinadas modalidades de la invención o aspectos de la invención consisten, o consisten esencialmente en, tales elementos, características, etcétera. Con fines de simplicidad esas modalidades no se han expuesto específicamente de manera detallada en todos los casos en la presente. Debe entenderse, además, que ninguna modalidad o aspecto de la invención puede excluirse explícitamente de las reivindicaciones, independientemente de si la exclusión específica se menciona en la especificación.
- 5
- 10
- 15 Los expertos en la técnica apreciarán estándares de desviación o error típicos atribuibles a valores obtenidos en ensayos u otros procesos descritos en la presente.

ES 2 716 735 T3

Listado de secuencias

5 <110> REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.

<120> Animales no humanos que tienen un gen del grupo de diferenciación 47 humanizado

<130> 32584 (10108WO01)

10 <140>
<141>

<150> 62/087,992
<151> 2014-12-05

15 <160> 36

<170> PatentIn versión 3.5

20 <210> 1
<211> 5591
<212> ADN
<213> Mus musculus

25 <400> 1

	gcctacaccg ggagagcagg gaggaggagt tggactgagg ttggggcggct ccgaggtcca	60
	gggcgagctt ggccagaggg agtagagagc agcggggctg cgcagggacg cgtgccgtga	120
30	gttccgggtga gcgtgtgtgt cccatgctcc cgtctttcag gccggcccag gacacgaagc	180
	cggaagagag ctggctggag ggacgggggc cgtgagcaga gagtgcaacc cgcgcagccc	240
35	cggggacagg ctgattcttg gcgctctccg ccggagcctg cccagggctg ggtgtgagggc	300
	tggcgtcacg tcaacgagca gaggcggcca ggcggggcgg agtgcgctg cgcggggcgg	360
	cgagcacgcy cgcgcgcgca cccccggca gcctgggcgg ccgctcctgc ctgtcaactgc	420
40	tgcggcgctg ctggctcggtc gtttcccttg aagcagcag cggaggcggc ggctgctcca	480
	gacacctgcy gcggcgaccc cccggcggcg cggagatgtg gcccttggcg gcggcgctgt	540
	tgctgggctc ctgctgctgc ggttcagctc aactactgtt tagtaacgtc aactccatag	600
45	agttcacttc atgcaatgaa actgtgtgca tcccttgcac cgtccgtaac gtggaggcgc	660
	aaagcaccga agaaatgttt gtgaagtgga agttgaacaa atcgtatatt ttcacatag	720
50	atggaataa aaatagcact actacagatc aaaactttac cagtgcacaaa atctcagtct	780
	cagacttaat caatggcatt gcctctttga aaatggataa gcgcgatgcc atggtgggaa	840
	actacacttg cgaagtgaca gagttatcca gagaaggcaa aacagttata gagctgaaaa	900
55	accgcacggc cttcaacact gaccaaggat cagcctgttc ttacgaggag gagaaaggag	960
	gttgcaaatt agtttcgtgg ttttctccaa atgaaaagat cctcattgtt attttcccaa	1020
	ttttggctat actcctgttc tggggaaagt ttggtatatt aacctcaaa tataaatcca	1080
60	gccatacgaa taagagaatc attctgctgc tcggtgccgg gctggtgctc acagtcacgc	1140

65

ES 2 716 735 T3

5	tggttggttg agccatcctt ctcatcccag gagaaaagcc cgtgaagaat gcttctggac	1200
	ttggcctcat tgtaatctct acggggatat taatactact tcagtacaat gtgtttatga	1260
	cagcttttg aatgacctct ttcaccattg ccatattgat cactcaagtg ctgggctacg	1320
10	tccttgcttt ggtcgggctg tgtctctgca tcatggcatg tgagccagtg cacggccccc	1380
	ttttgatttc aggtttgggg atcatagctc tagcagaact acttggatta gtttatatga	1440
	agtttgtcga ataggtgaag ggaagtgcg gactgtaact tggaagtgcg aaatggaaga	1500
15	atacagttgt ctaagcacca ggtcttcacg actcacagct ggaaggaaca gacaacagta	1560
	actgacttcc atccaggaaa acatgtcaca taaatgatta ctaagtttat attcaaagca	1620
	gctgtacttt acataataaa aaaaatatga tgtgctgtgt aaccaattgg aatcccattt	1680
20	ttctattggt tctactcaac taggggcaaa cgtttcaggg gcaacttcca agaatgatgc	1740
	ttgtagatc ctagagtctc tgaacactga gtttaaattg attccgagtg agactcgcca	1800
	agcactaacc tgagggttag ttaccagag atacctatga aaaacagtgg tatccagcaa	1860
25	gccttagtaa actcaggttg ccagcagctt tgccacttcc gctgctagct gaataacaag	1920
	actgccactt ctgggtcata gtgatagaga ctgaagtaga aaaacgaatg tggttgggca	1980
	aatcccgtgt ggcacctctg tgtgctatga tattgatggc actggtgtct tcattcttgg	2040
30	gggttgccat cattcacaca caccctttg acatacagtg caccocagtt ttgaatacat	2100
	tttttttgca ccctgtcccg ttctgctact ttgatttgcg ttatgatata tatatatata	2160
	tataatacct tttctcctct ttaaactatg tcctgtgaca caatagtcag ttgcagaaag	2220
35	gagccagact tattcgcaaa gcactgtgct caaactcttc agaaaaaaag gaaaaaaa	2280
	aaaagctata gttgtaacat atgtattcca gacctctggt ttaaaggcaa aagaaaaaa	2340
	atctacagtg tttcttctca tgttttctga tcggaggcat gacaaagcaa gactgaaatc	2400
40	tgaactgtgt ctctgcatg gcaacacgtg tctccgtcag gccctcgcaa ggcccgggga	2460
	gggggttcta cgctcttgt ctctttgtg catgctgaac actcatgcc ttctactgt	2520
45	atcctgcctc ctgcagcctc cctcttctc ctctcttcc tcttctcct ctctctctc	2580
	ctctctctc tcctccaagt ttgaaaggtc aaacaaaact accacattcc ctaccagtt	2640
	agaagaaaac caccgctctg acagttgtga tcgcatggag tacttttaga ttattagcac	2700
50	ctgtttttac ctcgtttgtg ggcgtgtttg tatgtgcaca tgtatgaagt cggcacatgc	2760
	accttctgta tgggcagagg cgtggcatct acagaagagc agatgccaac tttgtgcttt	2820
	tagtgaatac attaaaaaa aaaaaccaac ggtccttatt gagtggaatt ctatttgatg	2880
55	caaatatttg agctctttaa gactttaaaa ctagataatg tgccaagctt ttaggactgc	2940
	tcaccagtgc cctctgaaga aacaccagta ctttttctg tttgtgtaat aaaggcatat	3000
	ttgtatttgt gtttgcacca ctaatggtta tttcttctta gtccactgaa tgtttccatg	3060
60		
65		

ES 2 716 735 T3

5 tgcctctcgt atgccaaact tttgtcacc tttcatgtgg ggaccaaag gtttgtctgt 3120
 ggcaaaccta aacctatgac ctgctgaggc ctctcagaaa actgaccaca gtaccaagat 3180
 agtacttcgc aaagaaaagt aggtccctc cctggttttg tagctgtcgc caatattagc 3240
 10 gtaattccaa ggagctgaac gcctttatat aaatctgatg gcacctgatg cttttagttc 3300
 tgaaaatatt tacactcggg tcatgttggt gatgacttaa acaagtttt gatgaagaga 3360
 gcaaaaaaaaa agcagtgga tttggaacag tttcagggtt ttttttgttt tttgtttttt 3420
 15 gtttttgttt tttttttttt atttttgttt ttctgtctc tgttagaaaa gtcaggtggt 3480
 ctctgtcagg ctatctttat agtcaatttt ttttacgaac taaagtagta cttttaata 3540
 tgtagtcaac gccctctgc tcggggttca gttttgggtc ttaaccagct gtcagtctc 3600
 20 ctatgctgcc tgccactga ggcactgagt gccctagaca gtcccatcgg tggtagccag 3660
 ggaaacgaaa gacgaactca actcttgctc ctaataatca actctctgta tgaaggatgg 3720
 cagcattaag agtctctctg cctgggcatt attgggccag ttcaccctct ttaaatcaaa 3780
 25 cccgcagtgg ctcccagttc tcgtcccatc agatttaaat tgctaacagt atggggggca 3840
 ccacgcactc gttttgtccc acaatgcgct tttctctccc aaatcccgat ttctgtctc 3900
 atagcctcta ttcaattttt atttattgtc tgccctccac ttatacaatc gtagagagca 3960
 atgccatttg tcaactttctg caacagtttt ttgagccttt atggctgaat cccatttttc 4020
 ttctctttca aactgtttgc tccattgctc ctcccgcacg gctgtccgta cagtcatccc 4080
 35 atccatctgg gggcctcttt catctctcac ccttctggt gcttctgga tctctgctta 4140
 cctctgtggg tttttttttt tttttttgac ttattctctc cactggactt taagattact 4200
 tccacagcga aagtgtgccc tcccttttct gcccgcagtg ttctgcgtac tttagatact 4260
 40 actcagtgtc gacatttgat ggcaaaagt gcctgcactt aaatttctct ttttaaatagg 4320
 gtgaactaga gttggagttt tttctcttt tttctcttt ctctctctct ctctctctct 4380
 ctctctctct ctctctctct ctccctccct ccctccctcc ctccctccct ccctctctct 4440
 45 ctctttttct ttctttttt cttcttttct ttctttttt ctttctttct ttctttttt 4500
 ttttgacaaa tctcacaggc tttgagaatt ataaaagggtg acagttcacc tgaaaatcac 4560
 aggtctggtc tgtttaaatt gttgagaaat atccgattaa aagtcttgtg gctgtgtcct 4620
 50 aataggctct ctttcaggac gttgtagtca atagagtggc tgaaccatac ttgagtttat 4680
 aaagctcaaa aactgatgca cccactctgc tattatcgtg ttagtaagag ttcagctgta 4740
 55 tatcattgtc taggtttatc ttgtcctaca gtgggtattc aaatatggcc accagaggat 4800
 atgtgtaaat ataagcacct gtatttgcct gttgttgaga actggaggga aaacaaaaaa 4860
 tgtctggcaa ccctttgcct ttttaaccgt aattaattga cagtttattt agagataaga 4920

60

65

ES 2 716 735 T3

5 gttttcaaaa atctcttaac tgccacaacc cacagagggt cttgttttgc catcttcagt 4980
 ggctcacaga tatgatccaa gttaacttga aagagatgag cagtaccag gaaattgtcc 5040
 tgcctttaac tctggctgtc ctaattatg actgtttaat gctgaatttt ccatccgtct 5100
 10 agtgtttgag ggtaaagaaa agcctttttt aaataagtat ttctgtaaaa cggcatcggg 5160
 gggatcttct gtggttctat cacgggtgaa agagggaaac atttcttatt tttattaagc 5220
 agagcattat ttacagaaag ccattgttga gaattagttc ccacatcata taaatatcca 5280
 15 ttaaccattc taaattgtaa gagaactcca gtggttctat gcacaaggaa ctctcctggg 5340
 ggccctttttt tgcatagcaa ttaaaggat gctatttgtc agtagccatt ttttgcagt 5400
 atttaaagac caaagttggt ttacagctgt gttaccctta aaggtttttt ttttatgtat 5460
 20 taaatcaatt tatcactggt tgaagctttg aatacctgca atctttgcca agatactttt 5520
 ttatttaaaa aaataactgt gtaaataatta ccctgtaata ttatatatac ttaataaaac 5580
 attttaagct a 5591

30 <210> 2
 <211> 312
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

35 <400> 2
 Met Trp Pro Leu Ala Ala Ala Leu Leu Leu Gly Ser Cys Cys Cys Gly
 1 5 10 15
 Ser Ala Gln Leu Leu Phe Ser Asn Val Asn Ser Ile Glu Phe Thr Ser
 20 25 30
 Cys Asn Glu Thr Val Val Ile Pro Cys Ile Val Arg Asn Val Glu Ala
 35 40 45
 Gln Ser Thr Glu Glu Met Phe Val Lys Trp Lys Leu Asn Lys Ser Tyr
 50 55 60
 Ile Phe Ile Tyr Asp Gly Asn Lys Asn Ser Thr Thr Thr Asp Gln Asn
 65 70 75 80
 Phe Thr Ser Ala Lys Ile Ser Val Ser Asp Leu Ile Asn Gly Ile Ala
 85 90 95
 Ser Leu Lys Met Asp Lys Arg Asp Ala Met Val Gly Asn Tyr Thr Cys
 100 105 110
 Glu Val Thr Glu Leu Ser Arg Glu Gly Lys Thr Val Ile Glu Leu Lys
 115 120 125

60

65

ES 2 716 735 T3

5 Asn Arg Thr Ala Phe Asn Thr Asp Gln Gly Ser Ala Cys Ser Tyr Glu
130 135 140

10 Glu Glu Lys Gly Gly Cys Lys Leu Val Ser Trp Phe Ser Pro Asn Glu
145 150 155 160

15 Lys Ile Leu Ile Val Ile Phe Pro Ile Leu Ala Ile Leu Leu Phe Trp
165 170 175

20 Gly Lys Phe Gly Ile Leu Thr Leu Lys Tyr Lys Ser Ser His Thr Asn
180 185 190

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

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

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

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

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

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

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

60 Leu Val Tyr Met Lys Phe Val Glu
305 310

65 <210> 3
<211> 5560
<212> ADN
<213> Mus musculus

70 <400> 3
gcctacaccg ggagagcagg gaggaggagt tggactgagg ttgggaggct ccgaggtcca 60
gggagagctt ggccagaggg agtagagagc agcggggctg cgcagggacg cgtgccgtga 120
gttccgggtga gcgtgtgtgt cccatgctcc cgtctttcag gccggcccag gacacgaagc 180
cggaagagag ctggctggag ggacgggggc cgtgagcaga gagtgcaacc cgcgagagcc 240
cggggacagc ctgattcttg gcgctctccg ccggagcctg cccagggctg ggtgtgagcc 300

ES 2 716 735 T3

5	tggcgtcaag tcaacgagca gaggcggcca ggcggggcgg agtgccgctg cgcggggcgg	360
	cgagcacgcg cgcgcgcgca cccccgggca gcctgggicgg ccgctcctgc ctgtcactgc	420
	tgcggcgctg ctggtcggtc gtttccttg aaggcagcag cggaggcggc ggctgctcca	480
10	gacacctgcg gcggcgacct cccggcggcg cggagatgtg gcccttggcg gcggcgctgt	540
	tgctgggctc ctgctgctgc ggttcagctc aactactgtt tagtaacgct aactccatag	600
	agttcacttc atgcaatgaa actgtggtca tcccttgcat cgtccgtaat gtggaggcgc	660
15	aaagcaccga agaaatgttt gtgaagtgga agttgaacaa atcgtatatt ttcactatg	720
	atggaaataa aaatagcact actacagatc aaaactttac cagtgcaaaa atctcagtct	780
	cagacttaat caatggcatt gcctcttga aaatggataa gcgcgatgcc atggtgggaa	840
20	actacacttg cgaagtgaca gagttatcca gagaaggcaa aacagttata gagctgaaaa	900
	accgcacggt ttcgtggttt tctccaaatg aaaagatcct cattgttatt ttoccaattt	960
	tggctatact cctgttctgg ggaaagtttg gtattttaac actcaaatat aaatccagcc	1020
25	atacgaataa gagaatcatt ctgctgctcg ttgccgggct ggtgctcaca gtcactcgtg	1080
	ttgttgagc catccttctc atcccaggag aaaagcccgt gaagaatgct tctggacttg	1140
30	gcctcattgt aatctctacg gggatattaa tactacttca gtacaatgtg tttatgacag	1200
	cttttggaat gacctctttc accattgcc a tattgatcac tcaagtgctg ggctacgtcc	1260
	ttgctttggt cgggctgtgt ctctgcatca tggcatgtga gccagtgcac ggcccccttt	1320
35	tgatttcagg tttggggatc atagctctag cagaactact tggattagtt tatatgaagt	1380
	ttgtcgcttc caaccagagg actatccaac ctccataggaa taggtgaagg gaagtgcagg	1440
	actgtaactt ggaagtcaga aatggaagaa tacagttgtc taagcaccag gtcttcacga	1500
40	ctcacagctg gaaggaacag acaacagtaa ctgacttcca tccaggaaaa catgtcacat	1560
	aaatgattac taagtttata ttcaaagcag ctgtacttta cataataaaa aaaatatgat	1620
	gtgctgtgta accaattgga atcccatttt tctattgttt ctactcaact aggggcaaac	1680
45	gtttcagggg caacttccaa gaatgatgct tgttagatcc tagagtctct gaacactgag	1740
	tttaaattga ttccgagtga gactcgccaa gcactaacct gagggtagt taccagaga	1800
50	tacctatgaa aaacagtggt atccagcaag ccttagtaaa ctcaggttgc cagcagcttt	1860
	gccacttccg ctgctagctg aataacaaga ctgccacttc tgggtcatag tgatagagac	1920
	tgaagtagaa aaacgaatgt ggttgggcaa atcccgtgtg gccctctgt gtgctatgat	1980
55	attgatggca ctggtgtctt cattcttggg ggttgccatc attcacacac accccttga	2040
	catacagtgc accccagttt tgaatacatt ttttttgcac cctgtcccgt tctgctactt	2100
	tgatttgcgt tatgatatat atatatatat ataatacctt ttctcctctt taaacatggt	2160
60		
65		

ES 2 716 735 T3

5 cctgtgacac aatagtcagt tgcagaaagg agccagactt attcgcaaag cactgtgctc 2220
aaactcttca gaaaaaaagg aaaaaaaaaa aaagctatag ttgtaacata tgtattccag 2280
acctctgggt taaaggcaaa agaaaaaaaa tctacagtgt ttcttctcat gttttctgat 2340
10 cggaggcatg acaaagcaag actgaaatct gaactgtgtc tcctgcatgg caacacgtgt 2400
ctccgtcagg ccctcgcaag gcccggggag ggggttctac gcctctgtc tctttgttg 2460
atgtgaaca ctcatgcct tcctactgta tctgtcctcc tgcagcctcc ctcttctcc 2520
15 tcctcttct ctctctctc tcctctctc tcctctctt cctccaagtt tgaagggtca 2580
aacaaaacta ccacattccc taccagttta gaagaaaacc accgtcctga cagttgtgat 2640
cgcatggagt acttttagat tattagcacc tgtttttacc tcgtttggg gcgtgtttgt 2700
20 atgtgcacat gtatgaagtc ggcacatgca ccttctgtat gggcagaggc gtggcatcta 2760
cagaagagca gatgccaaact ttgtgctttt agtgaatata ttaaaaaaaaa aaaaccaacg 2820
gtccttattg agtggaaatc tatttgatgc aatatattga gctctttaag actttaaac 2880
25 tagataatgt gccaaagctt taggactgct caccagtgcc ctctgaagaa acaccagtac 2940
ttttcctgt ttgtgtaata aaggcatatt tgtatttggg tttgcatcac taatggttat 3000
ttctcttag tccactgaat gtttccatgt gcctctogta tgccaaactt tttgtcatct 3060
30 ttcatgtggg gaccaaatgg tttgtctgtg gcaaacctaa acctatgacc tgctgaggcc 3120
tctcagaaaa ctgaccacag taccaagata gtacttcgca aagaaaagta ggttccctcc 3180
ctggttttgt agctgtgcc aatattagcg taattccaag gagctgaacg cctttatata 3240
35 aatctgatgg cacctgatgc ttttagttct gaaaatattt acaactcggat catgttgttg 3300
atgacttaaa caaagttttg atgaagagag caaaaaaaaa gcaggtggat ttggaacagt 3360
40 ttcagggttt tttttgtttt ttgttttttg tttttgtttt tttttttta tttttgtttt 3420
tctgttctct gttagaaaag tcagggtgtc tctgtcaggc tatctttata gtcaattttt 3480
tttacgaact aaagtagtac cttttaatat gtagtcaacg cccctctgct cggggttcag 3540
45 ttttgggtct taaccagctg tcatgttctc tatgtgcct gccacttgag gcaactgagtg 3600
ccctagacag tcccatcggg ggtagccagg gaaacgaaag acgaaactca ctcttctcc 3660
taataatcaa ctctctgtat gaaggatggc agcattaaga gtccctctgc ctgggcatta 3720
50 ttgggccagt tcaccctctt taaatcaaac ccgcagtggc tccagttct cgtcccata 3780
gatttaaatt gctaacagta tggggggcac cacgcatctg ttttgcctca caatgcgctt 3840
ttctctcca aatcccgatt tctgtgtca tagcctctat tcaattttta tttattgtct 3900
55 gccctccact tatacaatcg tagagagcaa tgccatttgt cactttctgc aacagttttt 3960
tgagccttta tggctgaatc ccatttttct tctctttcaa actgtttgct ccattgtctc 4020
tcccgcacgg ctgtccgtac agtcatccca tccatctggg ggctctttc atctctcacc 4080
60
65

ES 2 716 735 T3

5 cttcctggtg cttcgtggat ctctgcttac ctctgtgggt tttttttttt ttttttgact 4140
 tattcttctc actggacttt aagattactt ccacagcgaa agtgctgcct cccttttctg 4200
 cccgcagtgt tctgcgtact ttagatacta ctcagtgcctg acatttgatg gcaaaagtgt 4260
 10 cctgcactta aatttctctt tttaataggg tgaactagag ttggagtttt tttctctttt 4320
 ttctcttttc tctctctctc tctctctctc tctctctctc tctctctctc tccctccctc 4380
 cctccctccc tccctccctc cctctctctc tctttttctt tcttttcttc tttctttctt 4440
 15 tctttctttc tttctttctt tctttctttt tttgacaaat ctcacaggct ttgagaatta 4500
 taaaaggtga cagttcacct gaaaatcaca ggtctggctt gtttaaattg ttgagaaata 4560
 tccgattaaa agtcttgggt ctgtgtccta ataggctctc tttcaggacg ttgtagtcaa 4620
 20 tagagtggct gaaccatact tgagtttata aagctcaaaa actgatgcac ccactctgct 4680
 attatcgtgt tagtaagagt tcagctgtat atcattgtct aggtttatct tgcctacag 4740
 tgggtattca aatatggcca ccagaggata tgtgtaaata taagcacctg tatttgcctg 4800
 25 ttgttgagaa ctggagggaa aacaaaaaat gtctggcaac cctttgcctt tttaacgta 4860
 attaattgac agtttattta gagataagag ttttcaaaaa tctcttaact gccacaacct 4920
 30 acagagggtc ttgttttggc atcttcagtg gctcacagat atgatccaag ttaactgaa 4980
 agagatgagc agtaccagc aaattgtcct gcctttaact ctggctgtcc ttaattatga 5040
 ctgtttaatg ctgaattttc catccgtcta gtgtttgagg gtaaagaaaa gcctttttta 5100
 35 aataagtatt tctgtaaaac ggcacggtg ggatcttctg tgttgctatc acgggtgaaa 5160
 gagggaaaca tttcttattt ttattaagca gagcattatt tacagaaagc cattgttgag 5220
 aattagttcc cacatcatat aaatatccat taaccattct aaattgtaag agaactccag 5280
 40 tgttgctatg cacaaggaac tctcctgggg gccttttttt gcatagcaat taaaggtatg 5340
 ctatttgtca gtagccattt tttgcagtga tttaaagacc aaagttgttt tacagctgtg 5400
 45 ttacccttaa aggttttttt tttatgtatt aaatcaattt atcactgttt gaagcttga 5460
 atacctgcaa tctttgcaa gatacttttt ttttaaaaa aataactgtg taaatattac 5520
 cctgtaatat tatatatact taataaaaca ttttaagcta 5560

50
 <210> 4
 <211> 303
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 55
 <400> 4

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

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

65

ES 2 716 735 T3

5
 20 25 30
 Cys Asn Glu Thr Val Val Ile Pro Cys Ile Val Arg Asn Val Glu Ala
 35 40 45

10
 Gln Ser Thr Glu Glu Met Phe Val Lys Trp Lys Leu Asn Lys Ser Tyr
 50 55 60

15
 Ile Phe Ile Tyr Asp Gly Asn Lys Asn Ser Thr Thr Thr Asp Gln Asn
 65 70 75 80

20
 Phe Thr Ser Ala Lys Ile Ser Val Ser Asp Leu Ile Asn Gly Ile Ala
 85 90 95

25
 Ser Leu Lys Met Asp Lys Arg Asp Ala Met Val Gly Asn Tyr Thr Cys
 100 105 110

30
 Glu Val Thr Glu Leu Ser Arg Glu Gly Lys Thr Val Ile Glu Leu Lys
 115 120 125

35
 Asn Arg Thr Val Ser Trp Phe Ser Pro Asn Glu Lys Ile Leu Ile Val
 130 135 140

40
 Ile Phe Pro Ile Leu Ala Ile Leu Leu Phe Trp Gly Lys Phe Gly Ile
 145 150 155 160

45
 Leu Thr Leu Lys Tyr Lys Ser Ser His Thr Asn Lys Arg Ile Ile Leu
 165 170 175

50
 Leu Leu Val Ala Gly Leu Val Leu Thr Val Ile Val Val Val Gly Ala
 180 185 190

55
 Ile Leu Leu Ile Pro Gly Glu Lys Pro Val Lys Asn Ala Ser Gly Leu
 195 200 205

60
 Gly Leu Ile Val Ile Ser Thr Gly Ile Leu Ile Leu Leu Gln Tyr Asn
 210 215 220

65
 Val Phe Met Thr Ala Phe Gly Met Thr Ser Phe Thr Ile Ala Ile Leu
 225 230 235 240

70
 Ile Thr Gln Val Leu Gly Tyr Val Leu Ala Leu Val Gly Leu Cys Leu
 245 250 255

75
 Cys Ile Met Ala Cys Glu Pro Val His Gly Pro Leu Leu Ile Ser Gly
 260 265 270

ES 2 716 735 T3

5 Leu Gly Ile Ile Ala Leu Ala Glu Leu Leu Gly Leu Val Tyr Met Lys
275 280 285

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

15 <210> 5
<211> 5648
<212> ADN
<213> Mus musculus

20 <400> 5

20 gcctacaccg ggagagcagg gaggaggagt tggactgagg ttgggaggct ccgaggtcca 60
gggcgagctt ggccagaggg agtagagagc agcggggctg cgcagggacg cgtgccgtga 120
gttccgggtga gcgtgtgtgt cccatgctcc cgtctttcag gccggcccag gacacgaagc 180
25 cggaaagagag ctggctggag ggacgggggc cgtgagcaga gaggcaacc cgcgcagccc 240
cggggacagg ctgattcttg gcgctctccg ccggagcctg cccagggctg ggtgtgaggg 300
tggcgctcacg tcaacgagca gaggcggcca ggcggggcgg agtgcgctg cgcggggcgg 360
30 cgagcacgcg cgcgcgcgca cccccgggca gcctgggcgg ccgctcctgc ctgtcactgc 420
tgcgcgctg ctggtcggtc gtttcccttg aaggcagcag cggaggcggc ggctgtcca 480
gacacctgcg gcggcgacct cccggcggcg cggagatgtg gcccttggcg gcggcgctgt 540
35 tgctgggctc ctgctgctgc ggttcagctc aactactggt tagtaacgtc aactccatag 600
agttcacttc atgcaatgaa actgtggtca tcccttgcat cgtccgtaat gtggaggcgc 660
40 aaagcaccga agaaatgttt gtgaagtgga agttgaacaa atcgtatatt ttcactatg 720
atgaaataa aatagcact actacagatc aaaactttac cagtgcaaaa atctcagtct 780
cagacttaat caatggcatt gcctctttga aatggataa gcgcgatgcc atggtgggaa 840
45 actacacttg cgaagtgaca gagttatcca gagaaggcaa aacagttata gagctgaaaa 900
accgcacggc cttcaacct gaccaaggat cagcctgttc ttacgaggag gagaaaggag 960
gttgcaaat agtttcgtgg ttttctccaa atgaaagat cctcattgtt attttcccaa 1020
50 ttttggtat actcctgttc tggggaaagt ttggtatatt aacctcaaa tataaatcca 1080
gccatacгаа таагаатс аттсгсгс тсгттссгс гсгггсгс асгтсатсг 1140
tggttggttg agccatcctt ctcatcccag gagaaaagcc cgtgaagaat gcttctggac 1200
55 ttggcctcat tgtaatctct acggggatat taatactact tcagtacaat gtgtttatga 1260
cagcttttg aatgacctct ttcaccattg ccatattgat cactcaagtг сгггсгсгс 1320
60 tccttgcttt ggtcgggctg tgtctctgca tcatggcatg tgagccagtг ссггссссс 1380
ttttgatttc aggtttgggg atcatagctc tagcagaact acttggatta gtttatatga 1440
agtttgtcgc ttccaaccag aggactatcc aacctoctag gaaagctgta gaggaacccc 1500

65

ES 2 716 735 T3

5	ttaacgaata ggtgaagga agtgacggac tgtaacttgg aagtcagaaa tggaagaata	1560
	cagttgtcta agcaccaggt cttcacgact cacagctgga aggaacagac aacagtaact	1620
	gacttccatc caggaaaaa tgtcacataa atgattacta agtttatatt caaagcagct	1680
10	gtactttaca taataaaaa aatatgatgt gctgtgtaac caattggaat cccatTTTTc	1740
	tattgtttct actcaactag gggcaaactt ctcaggggca acttccaaga atgatgcttg	1800
	ttagatccta gagtctctga aactgagtt taaattgatt ccgagtgaga ctcgccaagc	1860
15	actaacctga gggtagtta cccagagata cctatgaaa acagtggat ccagcaagcc	1920
	ttagtaaaact caggttgcca gcagctttgc cacttccgct gctagctgaa taacaagact	1980
	gccacttctg ggtcatagt atagagactg aagtagaaaa acgaatgtgg ttgggcaaat	2040
20	cccgtgtggc ccctctgtgt gctatgatat tgatggcact ggtgtcttca ttcttggggg	2100
	ttgccatcat tcacacacac ccctttgaca tacagtgcac cccagttttg aatacatTTT	2160
	ttttgacccc tgtcccgttc tgctactttg atttgcgtta tgatatatat atatatatat	2220
25	aatacctTTT ctctcttTTa aacatgggtcc tgtgacacaa tagtcagttg cagaaaggag	2280
	ccagacttat tcgcaaagca ctgtgctcaa actcttcaga aaaaaaggaa aaaaaaaaaa	2340
30	agctatagtt gtaacatatg tattccagac ctctggtTTa aaggcaaaag aaaaaaatc	2400
	tacagtgttt ctctcatgt tttctgatcg gaggcagac aaagcaagac tgaaatctga	2460
	actgtgtctc ctgcatggca acacgtgtct ccgtcaggcc ctcgcaagcc ccggggaggg	2520
35	ggttctacgc ctcttgtctc tttgttgcac gctgaacact catcgccttc ctactgtatc	2580
	ctgcctcctg cagcctccct ctctcctcct ctcttctctt tcctcctctt cctcctcctc	2640
	ctcctcttcc tccaagtttg aaaggtcaaa caaaactacc acattcccta cccagttaga	2700
40	agaaaaccac cgtcctgaca gttgtgatcg catggagtac ttttagatta ttagcacctg	2760
	tttttacctc gtttgtgggc gtgtttgtat gtgcacatgt atgaagtcgg cacatgcacc	2820
	ttctgtatgg gcagaggcgt ggcatctaca gaagagcaga tgccaacttt gtgcttttag	2880
45	tgaatacatt aaaaaaaaa aaccaacggt ccttattgag tggaattcta tttgatgcaa	2940
	atatttgagc tctttaagac tttaaaacta gataatgtgc caagcttTTa ggactgctca	3000
50	ccagtgcctt ctgaagaaac accagtactt tttcctgttt gtgtaataaa ggcatatttg	3060
	tatttgtggt tgcactacta atggttattt ctcttagtc cactgaatgt ttccatgtgc	3120
	ctctcgtatg ccaaactTTT tgcactctt catgtgggga ccaaaggtt tgtctgtggc	3180
55	aaacctaaac ctatgacctg ctgaggcctc tcagaaaact gaccacagta ccaagatagt	3240
	acttcgcaaa gaaaagtagg ttccctccct ggtttttag ctgtcgccaa tattagcgta	3300
	attccaagga gctgaacgcc tttatataaa tctgatggca cctgatgctt ttagttctga	3360
60		
65		

ES 2 716 735 T3

5	aaatatttac actcggatca tgttgttgat gacttaaaca aagttttgat gaagagagca	3420
	aaaaaaaaagc aggtggattt ggaacagttt cagggttttt tttgtttttt gttttttggt	3480
	tttgtttttt tttttttatt tttgtttttc tgttctctgt tagaaaagtc aggtgttctc	3540
10	tgtcaggcta tctttatagt caattttttt tacgaactaa agtagtacct tttaatatgt	3600
	agtcaacgcc cctctgctcg gggttcagtt ttgggtctta accagctgtc atgttctcta	3660
	tgctgcctgc caottgaggc actgagtgcc ctagacagtc ccatcgggtg tagccagggg	3720
15	aacgaaagac gaactcaact ctgctccta ataatcaact ctctgtatga aggatggcag	3780
	cattaagagt cctcctgcct gggcattatt gggccagttc accctcttta aatcaaaccc	3840
	gcagtggctc ccagttctcg tcccatcaga tttaaattgc taacagtatg gggggcacca	3900
20	cgcatctggt ttgtcccaca atgogctttt ctctcccaa tcccgatttc tgctgtcata	3960
	gcctctattc aatttttatt tattgtctgc cctccactta tacaatcgta gagagcaatg	4020
	ccatttgtca ctttctgcaa cagttttttg agcctttatg gctgaatccc atttttcttc	4080
25	tctttcaaac tgtttgctcc attgctctc ccgcacggct gtccgtacag tcatcccatc	4140
	catctggggg cctctttcat ctctcaccct tcctgggtgt tcgtggatct ctgcttacct	4200
	ctgtggggtt tttttttttt ttttgactta ttcttctcac tggactttaa gattaacttc	4260
30	acagcgaaag tgctgcctcc cttttctgcc cgcagtgttc tgcgtacttt agatactact	4320
	cagtgtctgac atttgatggc aaaagttgcc tgcacttaa tttctctttt taataggggtg	4380
	aactagagtt ggagtttttt tctctttttt ctcttttctc tctctctctc tctctctctc	4440
35	tctctctctc tctctctctc cctccctccc tccctccctc cctccctccc tctctctctc	4500
	tttttcttcc tttctttatt tctttcttcc tttctttctt tctttcttcc tttctttttt	4560
	tgacaaatct cacaggcttt gagaattata aaaggtgaca gttcacctga aaatcacagg	4620
40	tctggctctgt ttaaattggt gagaaatata cgattaaaag tcttgtggct gtgtccta	4680
	aggctctctt tcaggacggt gtagtcaata gagtggctga accatacttg agtttataaa	4740
	gctcaaaaac tgatgcaccc actctgctat tatcgtgtta gtaagagttc agctgtatat	4800
45	cattgtctag gtttatcttg tcttacagtg ggtattcaaa tatggccacc agaggatatg	4860
	tgtaaatata agcacctgta ttgacctggt gttgagaact ggagggaaaa caaaaaatgt	4920
50	ctggcaaccc ttgacctttt taaccgtaat taattgacag tttatttaga gataagagtt	4980
	ttcaaaaatc tcttaactgc cacaaccac agagggctct gttttgcat cttcagtggc	5040
	tcacagatat gatccaagtt aacttgaaag agatgagcag taccagga atgtcctgc	5100
55	ctttaactct ggetgtcctt aattatgact gtttaatgct gaattttcca tccgtctagt	5160
	gtttgagggg aaagaaaagc cttttttaa taagtatttc tgtaaacagg catcgggtggg	5220
	atcttctgtg ttgctatcac gggtgaaaga gggaaacatt tcttattttt attaagcaga	5280
60		
65		

ES 2 716 735 T3

5 gcattattta cagaaagcca ttgttgagaa ttagttccca catcatataa atatccatta 5340
 accattctaa attgtaagag aactccagtg ttgctatgca caaggaactc tcctgggggc 5400
 ctttttttgc atagcaatta aaggatgct atttgcagt agccattttt tgcagtgatt 5460
 10 taaagaccaa agttgtttta cagctgtggt acccttaaag gttttttttt tatgtattaa 5520
 atcaatttat cactgtttga agctttgaat acctgcaatc tttgccaaga tactttttta 5580
 ttttaaaaaa taactgtgta aatattacc tgtaatatta tatatactta ataaaacatt 5640
 15 ttaagcta 5648

<210> 6
 <211> 331
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 6

25 Met Trp Pro Leu Ala Ala Ala Leu Leu Leu Gly Ser Cys Cys Cys Gly
 1 5 10
 30 Ser Ala Gln Leu Leu Phe Ser Asn Val Asn Ser Ile Glu Phe Thr Ser
 20 25 30
 35 Cys Asn Glu Thr Val Val Ile Pro Cys Ile Val Arg Asn Val Glu Ala
 35 40 45
 40 Gln Ser Thr Glu Glu Met Phe Val Lys Trp Lys Leu Asn Lys Ser Tyr
 50 55 60
 45 Ile Phe Ile Tyr Asp Gly Asn Lys Asn Ser Thr Thr Thr Asp Gln Asn
 65 70 75 80
 50 Phe Thr Ser Ala Lys Ile Ser Val Ser Asp Leu Ile Asn Gly Ile Ala
 85 90 95
 55 Ser Leu Lys Met Asp Lys Arg Asp Ala Met Val Gly Asn Tyr Thr Cys
 100 105 110
 60 Glu Val Thr Glu Leu Ser Arg Glu Gly Lys Thr Val Ile Glu Leu Lys
 115 120 125
 65 Asn Arg Thr Ala Phe Asn Thr Asp Gln Gly Ser Ala Cys Ser Tyr Glu
 130 135 140
 70 Glu Glu Lys Gly Gly Cys Lys Leu Val Ser Trp Phe Ser Pro Asn Glu
 145 150 155 160
 75 Lys Ile Leu Ile Val Ile Phe Pro Ile Leu Ala Ile Leu Leu Phe Trp

ES 2 716 735 T3

5	tgcggcgctg ctggtcggtc gtttccttg aaggcagcag cggagggcggc ggctgctcca	480
	gacacctgcg gcggcgaccc cccggcggcg cggagatgtg gcccttggcg gcggcgctgt	540
	tgctgggctc ctgctgctgc ggttcagctc aactactgtt tagtaacgtc aactccatag	600
10	agttcacttc atgcaatgaa actgtgggtca tcccttgcat cgtccgtaat gtggagggcg	660
	aaagcaccga agaaatgttt gtgaagtgga agttgaacaa atcgtatatt ttcactatg	720
	atggaaataa aaatagcact actacagatc aaaactttac cagtgcacaaa atctcagtct	780
15	cagacttaat caatggcatt gcctctttga aaatggataa gcgcgatgcc atgggtgggaa	840
	actacacttg cgaagtgaca gagttatcca gagaaggcaa aacagttata gagctgaaaa	900
	accgcacggt ttcgtggttt tctccaaatg aaaagatcct cattgttatt ttcccaattt	960
20	tggtataact cctgttctgg ggaagtttg gtattttaac actcaaatat aaatccagcc	1020
	atacgaataa gagaatcatt ctgctgctcg ttgccgggct ggtgctcaca gtcactgtgg	1080
	ttgttgagc catccttctc atcccaggag aaaagcccgt gaagaatgct tctggacttg	1140
25	gcctcattgt aatctctacg gggatattaa tactacttca gtacaatgtg tttatgacag	1200
	cttttggaat gacctcttc accattgcc aattgatcac tcaagtgctg ggctacgtcc	1260
	ttgctttggt cgggctgtgt ctctgcatca tggcatgtga gccagtgcac ggcccccttt	1320
30	tgatttcagg tttggggatc atagctctag cagaactact tggattagtt tatatgaagt	1380
	ttgtcgcttc caaccagagg actatccaac ctctaggaa agctgtagag gaaccctta	1440
	acgcatttaa agagtcaaaa ggaatgatga atgacgaata ggtgaagggg agtgacggac	1500
35	tgtaacttg aagtacagaa tggaagaata cagttgtcta agcaccaggt cttcacgact	1560
	cacagctgga aggaacagac aacagtaact gacttccatc caggaaaaca tgtcacataa	1620
	atgattacta agtttatatt caaagcagct gtactttaca taataaaaaa aatatgatgt	1680
40	gctgtgtaac caattggaat cccatttttc tattgtttct actcaactag gggcaaacgt	1740
	ttcaggggca acttccaaga atgatgcttg ttagatccta gagtctctga acactgagtt	1800
	taaattgatt ccgagtgaga ctgcgcaagc actaacctga gggtagtta ccagagata	1860
45	cctatgaaaa acagtggat ccagcaagcc ttagtaaaact caggttgcc gcagctttgc	1920
	cacttccgct gctagctgaa taacaagact gccacttctg ggtcatagt atagagactg	1980
50	aagtagaaaa acgaatgtgg ttgggcaaat cccgtgtggc ccctctgtgt gctatgatat	2040
	tgatggcaact ggtgtcttca ttcttggggg ttgccatcat tcacacacac ccctttgaca	2100
	tacagtgcac cccagttttg aatacatttt ttttgcaccc tgtcccgttc tgctactttg	2160
55	atttgcgtta tgatataat atataatata aatacctttt ctctcttta aacatgggtcc	2220
	tgtgacacaa tagtcagttg cagaaaggag ccagacttat tgcgaaagca ctgtgctcaa	2280
	actcttcaga aaaaaaggaa aaaaaaaaaa agctatagtt gtaacatatg tattccagac	2340
60		
65		

ES 2 716 735 T3

5 ctctggttta aaggcaaaag aaaaaaaaaatc tacagtgttt cttctcatgt tttctgatcg 2400
gaggcatgac aaagcaagac tgaaatctga actgtgtctc ctgcatggca acacgtgtct 2460
ccgtcaggcc ctgcgaaggc ccggggaggg ggttctacgc ctcttgtctc tttgttgcat 2520
10 gctgaacact catcgccttc ctactgtatc ctgcctcctg cagcctccct ctccctcctc 2580
ctcttcctct tcctcctcct cctcctcctc ctctcttcc tccaagtttg aaaggcaaaa 2640
caaaactacc acattcccta cccagttaga agaaaaccac cgtcctgaca gttgtgatcg 2700
15 catggagtac ttttagatta ttagcacctg tttttacctc gtttgtgggc gtgtttgtat 2760
gtgcacatgt atgaagtcgg cacatgcacc ttctgtatgg gcagaggcgt ggcactctaca 2820
gaagagcaga tgccaacttt gtgcttttag tgaatacatt aaaaaaaaaa aaccaacggt 2880
20 ccttattgag tggaattcta tttgatgcaa atatttgagc tctttaagac tttaaaacta 2940
gataatgtgc caagctttta ggactgctca ccagtgcctt ctgaagaaac accagtactt 3000
tttcctgttt gtgtaataaa ggcataattg tatttgtgtt tgcactacta atggttattt 3060
25 ctcttagtgc cactgaatgt ttccatgtgc ctctcgtatg ccaaactttt tgtcatcttt 3120
catgtgggga ccaaatggtt tgtctgtggc aaacctaaac ctatgacctg ctgaggcctc 3180
30 tcagaaaact gaccacagta ccaagatagt acttcgcaaa gaaaagtagg ttccctccct 3240
ggttttgtag ctgtcgcaa tattagcgtc attccaagga gctgaacgcc tttatataaa 3300
tctgatggca cctgatgctt ttagttctga aatatattac actcggatca tgttgttgat 3360
35 gacttaaaaca aagttttgat gaagagagca aaaaaaagc aggtggattt ggaacagttt 3420
cagggttttt tttgtttttt gttttttgtt tttgtttttt tttttttatt tttgtttttc 3480
tgttctctgt tagaaaagtc aggtgttctc tgtcaggcta tctttatagt caattttttt 3540
40 tacgaactaa agtagtacct tttaatatgt agtcaacgcc cctctgctcg gggttcagtt 3600
ttgggtctta accagctgtc atgttctcta tgetgcctgc cacttgaggc actgagtgcc 3660
ctagacagtc ccacgggtgg tagccagga aacgaaagac gaactcaact cttgctccta 3720
45 ataatcaact ctctgtatga aggatggcag cattaagagt cctcctgcct gggcattatt 3780
gggccagttc accctcttta aatcaaaccc gcagtggctc ccagttctcg tcccatcaga 3840
50 tttaaattgc taacagtatg gggggcacca cgcactctgt ttgtcccaca atgcgctttt 3900
ctctccaaa tcccgatttc tgctgtcata gcctctattc aatttttatt tattgtctgc 3960
cctccactta tacaatcgta gagagcaatg ccatttgcct ctttctgcaa cagttttttg 4020
55 agcctttatg gctgaatccc atttttcttc tctttcaaac tgtttgtctc attgctcctc 4080
ccgcacggct gtcctgtacag tcatcccctc catctggggg cctctttcat ctctaccct 4140
tcctggtgct tcgtggatct ctgcttacct ctgtgggttt tttttttttt ttttgactta 4200
60
65

ES 2 716 735 T3

5 ttcttctcac tggactttaa gattacttcc acagcgaaag tgctgcctcc cttttctgcc 4260
 cgcagtggtc tgcgtacttt agatactact cagtgctgac atttgatggc aaaagttgcc 4320
 tgcacttaaa tttctctttt taataggggtg aactagagtt ggagtttttt tctctttttt 4380
 10 ctcttttctc tctctctctc tctctctctc tctctctctc tctctctctc cctccctccc 4440
 tccctccctc cctccctccc tctctctctc tttttctttc tttctttctt tctttctttc 4500
 tttctttctt tctttctttc tttctttttt tgacaaatct cacaggcttt gagaattata 4560
 15 aaaggtgaca gttcacctga aaatcacagg tctggtctgt ttaaattggt gagaaatatac 4620
 cgattaaaag tcttgtggct gtgtcctaata aggtctctctt tcaggacggt gtagtcaata 4680
 gagtggtgta accatacttg agtttataaa gctcaaaaac tgatgcaccc actctgctat 4740
 20 tatcgtgta gtaagagttc agctgtatat cattgtctag gtttatcttg tcctacagtg 4800
 ggtattcaaa tatggccacc agaggatatg tgtaaatata agcacctgta tttgcctggt 4860
 gttgagaact ggagggaaaa caaaaaatgt ctggcaaccc tttgcctttt taaccgtaat 4920
 25 taattgacag tttatttaga gataagagtt ttcaaaaatc tcttaactgc cacaaccac 4980
 agagggctct gttttgccat cttcagtggtc tcacagatat gatccaagtt aacttgaag 5040
 30 agatgagcag taccaggaa attgtcctgc ctttaactct ggctgtcctt aattatgact 5100
 gtttaatgct gaattttcca tccgtctagt gtttgaggggt aaagaaaagc cttttttaa 5160
 taagtatttc tgtaaaacgg catcgggtggg atcttctgtg ttgctatcac gggtgaaaga 5220
 35 gggaaacatt tcttattttt attaagcaga gcattattta cagaaagcca ttgttgagaa 5280
 ttagttccca catcatataa atatcatta accattctaa attgtaagag aactccagtg 5340
 ttgctatgca caaggaactc tcctgggggc ctttttttgc atagcaatta aaggtatgct 5400
 40 atgtgtcagt agccattttt tgcagtgatt taaagaccaa agttgtttta cagctgtggt 5460
 accctaaag gttttttttt tatgtattaa atcaatttat cactgtttga agctttgaat 5520
 45 acctgcaatc ttgccaaga tactttttta tttaaaaaa taactgtgta aatattaccc 5580
 tgtaatatta tatatactta ataaaacatt ttaagcta 5618

50 <210> 8
 <211> 321
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

55 <400> 8
 Met Trp Pro Leu Ala Ala Ala Leu Leu Leu Gly Ser Cys Cys Cys Gly
 1 5 10 15

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

65

ES 2 716 735 T3

5 Cys Asn Glu Thr Val Val Ile Pro Cys Ile Val Arg Asn Val Glu Ala
35 40 45

Gln Ser Thr Glu Glu Met Phe Val Lys Trp Lys Leu Asn Lys Ser Tyr
50 55 60

10 Ile Phe Ile Tyr Asp Gly Asn Lys Asn Ser Thr Thr Thr Asp Gln Asn
65 70 75 80

15 Phe Thr Ser Ala Lys Ile Ser Val Ser Asp Leu Ile Asn Gly Ile Ala
85 90 95

20 Ser Leu Lys Met Asp Lys Arg Asp Ala Met Val Gly Asn Tyr Thr Cys
100 105 110

Glu Val Thr Glu Leu Ser Arg Glu Gly Lys Thr Val Ile Glu Leu Lys
115 120 125

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

30 Ile Phe Pro Ile Leu Ala Ile Leu Leu Phe Trp Gly Lys Phe Gly Ile
145 150 155 160

Leu Thr Leu Lys Tyr Lys Ser Ser His Thr Asn Lys Arg Ile Ile Leu
165 170 175

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

40 Ile Leu Leu Ile Pro Gly Glu Lys Pro Val Lys Asn Ala Ser Gly Leu
195 200 205

Gly Leu Ile Val Ile Ser Thr Gly Ile Leu Ile Leu Leu Gln Tyr Asn
210 215 220

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

50 Ile Thr Gln Val Leu Gly Tyr Val Leu Ala Leu Val Gly Leu Cys Leu
245 250 255

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

55 Leu Gly Ile Ile Ala Leu Ala Glu Leu Leu Gly Leu Val Tyr Met Lys
275 280 285

60

65

ES 2 716 735 T3

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

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

15 Glu

<210> 9
<211> 5021
<212> ADN
<213> Homo sapiens

20 <400> 9

25 agtgggagcg cgcggtgcgcg cggccgtgca gcctgggagc tgggtcctgc ctgtgacgcg 60
cggcggcggt cggtcctgcc tgtaacggcg gcggcggctg ctgctccgga cacctgcggc 120

30 gggcggcgcg accccgcggc gggcgcggag atgtggcccc tggtagcggc gctgttgctg 180
ggctcggcgt gctgcggatc agctcagcta ctatttaata aaacaaaatc tgtagaattc 240
acgttttgta atgacactgt cgtcattcca tgctttgtta ctaatatgga ggcacaaaac 300

35 actactgaag tatacgtaaa gtggaattt aaaggaagag atatttacac ctttgatgga 360
gctctaaaca agtccactgt cccactgac ttagtagtg caaaaattga agtctcacia 420
ttactaaaag gagatgcctc tttgaagatg gataagagtg atgctgtctc acacacagga 480

40 aactacactt gtgaagtaac agaattaacc agagaagggt aaacgatcat cgagctaaaa 540
tatcgtgttg tttcatggtt ttctccaaat gaaaatattc ttattgttat tttcccaatt 600
tttgctatac tcctgttctg gggacagttt ggtattaaaa cacttaaata tagatccggt 660

45 ggtatggatg agaaaacaat tgctttactt gttgctggac tagtgatcac tgtcattgtc 720
attgttgag ccattctttt cgtcccagggt gaatattcat taaagaatgc tactggcctt 780
ggtttaattg tgacttctac agggatatta atattacttc actactatgt gtttagtaca 840

50 gcgattgat taacctcctt cgtcattgcc atattggta ttcaggatgat agcctatatac 900
ctcgtgtgg ttggactgag tctctgtatt gcggcgtgta taccaatgca tggccctctt 960
ctgattcag gtttgagtat cttagctcta gcacaattac ttggactagt ttatatgaaa 1020

55 tttgtggaat aactgaagtg aagtgatgga ctccgatttg gagagtagta agacgtgaaa 1080
ggaatacact tgtgtttaag caccatggcc ttgatgattc actgttgggg agaagaaca 1140
agaaaagtaa ctggttgca cctatgagac ccttacgtga ttgttagtta agtttttatt 1200

60 caaagcagct gtaatttagt taataaaata attatgatct atgttgtttg cccaattgag 1260
atccagtttt ttgttggtat ttttaatcaa ttaggggcaa tagtagaatg gacaatttcc 1320

65

ES 2 716 735 T3

5	aagaatgatg cctttcaggt cctagggcct ctggcctcta ggtaaccagt ttaaattggt	1380
	tcagggatgat aactacttag cactgcacctg gtgattaccc agagatatct atgaaaacca	1440
	gtggcttcca tcaaaccttt gccaaactcag gttcacagca gctttgggca gttatggcag	1500
10	tatggcatta gctgagaggt gtctgccact tctgggtcaa tggaataata aattaagtac	1560
	aggcaggaat ttggttggga gcatcttgta tgatctccgt atgatgtgat attgatggag	1620
	atagtgggcc tcattcttgg gggttgccat tcccacattc ccccttcaac aaacagtgtg	1680
15	acaggtcctt cccagattta gggtaactttt attgatggat atgttttctt tttattcaca	1740
	taaccctctg aaaccctgtc ttgtcctcct gttacttgct tctgctgtac aagatgtagc	1800
	accttttctc ctctttgaac atggcttagt gacacggtag caccagttgc aggaaggagc	1860
20	cagacttggt ctcagagcac tgtgttcaca cttttcagca aaaatagcta tggttgtaac	1920
	atatgtattc ccttcctctg atttgaaggc aaaaatctac agtgtttctt cacttctttt	1980
	ctgatctggg gcatgaaaa agcaagattg aaatttgaac tatgagtctc ctgcatggca	2040
25	acaaaatgtg tgtcaccatc aggccaacag gccagccctt gaatggggat ttattactgt	2100
	tgtatctatg ttgcatgata aacattcatc accttcctcc tgtagtctct cctcgtactc	2160
	cccttcccct atgattgaaa agtaaacaaa acccaccattt cctatcctgg ttagaagaaa	2220
30	attaatgttc tgacagttgt gatcgcctgg agtactttta gacttttagc attcgttttt	2280
	tacctgtttg tggatgtgtg tttgtatgtg catacgtatg agataggcac atgcatcttc	2340
	tgtatggaca aagggtgggg acctacagga gagcaaagggt taattttgtg cttttagtaa	2400
35	aaacatttaa atacaaagtt ctttattggg tggaattata tttgatgcaa atatttgatc	2460
	acttaaaaact tttaaaactt ctaggtaatt tgccacgctt tttgactgct caccaatacc	2520
	ctgtaaaaat acgtaattct tcctgtttgt gtaataagat attcatattt gtagttgcat	2580
40	taataatagt tatttccttag tccatcagat gttcccgtgt gcctctttta tgccaaattg	2640
	attgtcatat ttcattgttg gaccaagtag tttgcccatg gcaaacctaa atttatgacc	2700
45	tgtgagggcc tctcagaaaa ctgagcatac tagcaagaca gctcttcttg aaaaaaaaa	2760
	tatgtataca caaatatata cgtatatcta tatatacgta tgtatataca cacatgtata	2820
	ttcttccttg attgtgtagc tgtccaaaat aataacatat atagagggag ctgtattcct	2880
50	ttatacaaat ctgatggctc ctgcagcact ttttccttct gaaaatattt acattttgct	2940
	aacctagttt gttactttta aaatcagttt tgatgaaagg agggaaaagc agatggactt	3000
	gaaaagatc caagctccta ttagaaaagg tatgaaaatc tttatagtaa aattttttat	3060
55	aaactaaagt tgtacctttt aatatgtagt aaactctcat ttatttgggg ttogctcttg	3120
	gatctcatcc atccattgtg ttctctttta tgctgcctgc cttttgaggc attcactgcc	3180
	ctagacaatg ccaccagaga tagtggggga aatgccagat gaaaccaact cttgctctca	3240
60		
65		

ES 2 716 735 T3

5 ctagtgtgca gcttctctgg ataagtgacc acagaagcag gagtcctcct gcttgggcat 3300
cattgggcca gttccttctc tttaaatcag atttgtaatg gctcccaaat tccatcacat 3360
cacatttaaa ttgcagacag tgttttgac atcatgtatc tgttttgtcc cataaatatgc 3420
10 ttttactcc ctgatcccag tttctgctgt tgactcttcc attcagtttt atttattgtg 3480
tgttctcaca gtgacaccat ttgtcctttt ctgcaacaac ctttccagct acttttgcca 3540
aattctattt gtcttctcct tcaaaacatt ctctttgca gttcctcttc atctgtgtag 3600
15 ctgctctttt gtctcttaac ttaccattcc tatagtactt tatgcatctc tgcttagttc 3660
tattagtttt ttggccttgc tcttctcctt gattttaaaa ttccttctat agctagagct 3720
tttctttctt tcattctctc ttctgacagt gttttgcata catcagaagc taggtacata 3780
20 agttaaataga ttgagagttg gctgtattta gatttatcac tttttaatag ggtgagcttg 3840
agagttttct tcttttctgt tttttttttt tgtttttttt tttttttttt tttttttttt 3900
25 ttttgactaa tttcacatgc tctaaaaacc ttcaaagggtg attatttttc tcctggaac 3960
tccaggtcca tctgttttaa atccctaaga atgtcagaat taaaataaca gggctatccc 4020
gtaattggaa atatttcttt tttcaggatg ctatagtcaa tttagtaagt gaccaccaa 4080
30 ttgttatttg cactaacaaa gctcaaaaaca cgataagttt actcctccat ctgagtaata 4140
aaaattaagc tgtaatcaac cttctaggtt tctctgtct taaaatgggt attcaaaaat 4200
ggggatctgt ggtgtatgta tggaaacaca tactccttaa tttacctgtt gttgaaact 4260
35 ggagaaatga ttgtogggca accgtttatt ttttattgta ttttatttgg ttgagggatt 4320
ttttataaaa cagttttact tgtgtcatat tttaaaatta ctaactgcca tcacctgctg 4380
gggtcctttg ttaggtcatt ttcagtgact aatagggata atccaggtaa ctttgaagag 4440
40 atgagcagtg agtgaccagg cagtttttct gccttttagct ttgacagttc ttaattaaga 4500
tcattgaaga ccagctttct cataaatttc tctttttgaa aaaaagaaag ctttgtact 4560
45 aagctcctct gtaagacaac atcttaaadc ttaaaagtgt tgttatcatg actggtgaga 4620
gaagaaaaca ttttgttttt attaaatgga gcattattta caaaaagcca ttgttgagaa 4680
ttagatccca catcgtataa atatctatta accattctaa ataaagagaa ctccagtgtt 4740
50 gctatgtgca agatcctctc ttggagcttt tttgcatagc aattaaaggt gtgctatttg 4800
tcagtagcca tttttttgca gtgattttaa gaccaaagtt gttttacagc tgtgttaccg 4860
ttaaaggttt ttttttttat atgtattaaa tcaatttatc actgtttaaa gctttgaata 4920
55 tctgcaatct ttgccaaagt acttttttat ttaaaaaaaa acataacttt gtaaataata 4980
ccctgtaata ttatatatac ttaataaaac attttaagct a 5021

60

65

ES 2 716 735 T3

<210> 10
 <211> 293
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 10

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

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

20
 Cys Asn Asp Thr Val Val Ile Pro Cys Phe Val Thr Asn Met Glu Ala
 35 40 45

25
 Gln Asn Thr Thr Glu Val Tyr Val Lys Trp Lys Phe Lys Gly Arg Asp
 50 55 60

30
 Ile Tyr Thr Phe Asp Gly Ala Leu Asn Lys Ser Thr Val Pro Thr Asp
 65 70 75 80

35
 Phe Ser Ser Ala Lys Ile Glu Val Ser Gln Leu Leu Lys Gly Asp Ala
 85 90 95

40
 Ser Leu Lys Met Asp Lys Ser Asp Ala Val Ser His Thr Gly Asn Tyr
 100 105 110

45
 Thr Cys Glu Val Thr Glu Leu Thr Arg Glu Gly Glu Thr Ile Ile Glu
 115 120 125

50
 Leu Lys Tyr Arg Val Val Ser Trp Phe Ser Pro Asn Glu Asn Ile Leu
 130 135 140

55
 Ile Val Ile Phe Pro Ile Phe Ala Ile Leu Leu Phe Trp Gly Gln Phe
 145 150 155 160

60
 Gly Ile Lys Thr Leu Lys Tyr Arg Ser Gly Gly Met Asp Glu Lys Thr
 165 170 175

65
 Ile Ala Leu Leu Val Ala Gly Leu Val Ile Thr Val Ile Val Ile Val
 180 185 190

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

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

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

ES 2 716 735 T3

5	caagaaaagt aactggttgt cacctatgag acccttacgt gattgttagt taagttttta	1260
	ttcaaagcag ctgtaattta gtttaataaaa taattatgat ctatgttggt tgcccaattg	1320
	agatccagtt ttttgttggt atttttaatc aattaggggc aatagtagaa tggacaattt	1380
10	ccaagaatga tgcctttcag gtcctagggc ctctggcctc taggtaacca gtttaaattg	1440
	gttcagggtg ataactactt agcactgccc tggtgattac ccagagatat ctatgaaaac	1500
	cagtggcttc catcaaacct ttgccaaactc aggttcacag cagctttggg cagttatggc	1560
15	agtatggcat tagctgagag gtgtctgcca cttctgggtc aatggaataa taaattaagt	1620
	acaggcagga atttggttgg gagcatcttg tatgatctcc gtatgatgtg atattgatgg	1680
	agatagtggc cctcattctt gggggttgcc attcccacat tcccccttca acaaacagtg	1740
20	taacaggtcc ttcccagatt tagggtaactt ttattgatgg atatgttttc cttttattca	1800
	cataaccctt tgaaaccttg tcttgtcctc ctgttacttg cttctgctgt acaagatgta	1860
	gcaccttttc tcctctttga acatggtcta gtgacacggg agcaccagtt gcaggaagga	1920
25	gccagacttg ttctcagagc actgtgttca cacttttcag caaaaatagc tatggttgta	1980
	acatatgtat tcccttcctc tgatttgaag gcaaaaatct acagtgtttc ttcacttctt	2040
30	ttctgatctg gggcatgaaa aaagcaagat tgaatttga actatgagtc tcctgcatgg	2100
	caacaaaatg tgtgtcacca tcaggccaac aggccagccc ttgaatgggg atttattact	2160
	gttgtatcta tgttgcatga taaacattca tcaccttctt cctgtagtcc tgcctcgtac	2220
35	tccccctccc ctatgattga aaagtaaaca aaaccacat ttcctatcct ggttagaaga	2280
	aaattaatgt tctgacagtt gtgatcgctt ggagtacttt tagactttta gcattcgttt	2340
	tttacctggt tgtggatgtg tgtttgtatg tgcatacgta tgagataggc acatgcatct	2400
40	tctgtatgga caaaggtggg gtacctacag gagagcaaag gttaattttg tgcttttagt	2460
	aaaaacattt aaatacaaag ttctttattg ggtggaatta tatttgatgc aaatatttga	2520
	tcacttaaaa cttttaaaac ttctaggtaa tttgccacgc tttttgactg ctcaccaata	2580
45	ccctgtaaaa atacgtaatt cttcctgttt gtgtaataag atattcatat ttgtagttgc	2640
	attaataata gttatttctt agtccatcag atgttcccgt gtgcctcttt tatgccaaat	2700
50	tgattgtcat atttcatggt gggaccaagt agtttgccca tggcaaacct aaatttatga	2760
	cctgctgagg cctctcagaa aactgagcat actagcaaga cagctcttct tgaaaaaaaa	2820
	aatatgtata cacaaatata tacgtatatc tatatatacg tatgtatata cacacatgta	2880
55	tattcttcct tgattgtgta gctgtccaaa ataataacat atatagaggg agctgtattc	2940
	ctttatacaa atctgatggc tcctgcagca ctttttctt ctgaaaatat ttacattttg	3000
	ctaacctagt ttgttacttt aaaaatcagt tttgatgaaa ggagggaaaa gcagatggac	3060
60		
65		

ES 2 716 735 T3

5	ttgaaaaaga tccaagctcc tattagaaaa ggtatgaaaa tctttatagt aaaatTTTTT	3120
	ataaactaaa gttgtacctt ttaatatgta gtaaactctc atttatttgg ggttcgctct	3180
	tgatctcat ccatccattg tgttctcttt aatgctgcct gccttttgag gcattcactg	3240
10	ccctagacaa tgccaccaga gatagtgggg gaaatgccag atgaaaccaa ctcttgctct	3300
	cactagtgtg cagcttctct ggataagtga ccacagaagc aggagtcctc ctgcttgggc	3360
	atcattgggc cagttccttc tctttaaato agatttgtaa tggctcccaa attccatcac	3420
15	atcacattta aattgcagac agtgttttgc acatcatgta tctgttttgt cccataatat	3480
	gctttttact ccctgatccc agtttctgct gttgactctt ccattcagtt ttattttattg	3540
	tgtgttctca cagtgcacc atttgcctt ttctgcaaca acctttccag ctacttttgc	3600
20	caaattctat ttgtcttctc ctccaaaaca ttctcctttg cagttcctct tcactctgtgt	3660
	agctgctctt ttgtctctta acttaccatt cctatagtac tttatgcac tctgcttagt	3720
	tctattagtt ttttggcctt gctctctctc ttgattttaa aattccttct atagctagag	3780
25	cttttctttc tttcattctc tcttctgca gtgttttgca tacatcagaa gctaggtaca	3840
	taagttaa at gattgagagt tggctgtatt tagatttatc actttttaat aggggtgagct	3900
	tgagagtttt ctttctttct gttttttttt tttgtttttt tttttttttt tttttttttt	3960
30	ttttttgact aatttcacat gctctaaaaa ccttcaaagg tgattatttt tctcctggaa	4020
	actccaggtc cattctgttt aaatccctaa gaatgtcaga attaaaataa cagggctatc	4080
	ccgtaattgg aaatatttct tttttcagga tgcctatagtc aatttagtaa gtgaccacca	4140
35	aattgttatt tgcactaaca aagctcaaaa cacgataagt ttaactcctcc atctcagtaa	4200
	taaaaattaa gctgtaatca accttctagg tttctcttgt cttaaaatgg gtattcaaaa	4260
	atggggatct gtgggtgatg tatggaaaca catactcctt aatttacctg ttgttggaaa	4320
40	ctggagaaat gattgtcggg caaccgttta ttttttattg tattttattt ggttgagggg	4380
	tttttttata aacagtttta ctgtgtcat attttaaaat tactaaactgc catcacctgc	4440
	tggggtcctt tgtaggtca ttttcagtga ctaatagggg taatccaggt aactttgaag	4500
45	agatgagcag tgagtgacca ggcagttttt ctgccttttag ctttgacagt tcttaattaa	4560
	gatcattgaa gaccagcttt ctcataaatt tctctttttg aaaaaagaa agcatttgta	4620
50	ctaagctcct ctgtaagaca acatcttaa tcttaaaagt gttgttatca tgactggtga	4680
	gagaagaaaa cattttgttt ttattaaatg gagcattatt tacaaaaagc cattgttgag	4740
	aattagatcc cacatcgtat aaatatctat taaccattct aaataaagag aactccagtg	4800
55	ttgctatgtg caagatcctc tcttggagct tttttgcata gcaattaaag gtgtgctatt	4860
	tgtcagtagc catttttttg cagtgatttg aagaccaaag ttgttttaca gctgtgttac	4920
	cgttaaaggt tttttttttt atatgtatta aatcaattta tcaactgttta aagctttgaa	4980
60		
65		

ES 2 716 735 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

Asn

35 305

<210> 13

<211> 5078

<212> ADN

40 <213> Homo sapiens

<400> 13

45 agtgggagcg cgcgtgcgcg cggccgtgca gcctgggcag tgggtcctgc ctgtgacgcg 60

cggcggcggg cggtcctgcc tgtaacggcg gcggcggctg ctgctccgga cacctgcggc 120

50 ggcggcggcg accccgcggc gggcgcggag atgtggcccc tggtagcggc gctggtgctg 180

ggctcggcgt gctcgggatc agctcagcta ctatttaata aaacaaaatc tgtagaattc 240

acgttttgta atgacactgt cgtcattcca tgctttgta ctaatatgga ggcacaaaac 300

55 actactgaag tatacgtaaa gtggaaattt aaaggaagag atatttacac ctttgatgga 360

gctctaaaaca agtccactgt cccactgac tttagtagtg caaaaattga agtctcacia 420

ttactaaaag gagatgcctc tttgaagatg gataagagtg atgctgtctc acacacagga 480

60 aactacactt gtgaagtaac agaattaacc agagaaggtg aaacgatcat cgagctaaaa 540

tatcgtgttg tttcatggtt ttctccaaat gaaaatattc ttattggtat tttccaatt 600

65

ES 2 716 735 T3

5	tttgctatac tcctggtctg gggacagttt ggtattaaaa cacttaaata tagatccggt	660
	ggtatggatg agaaaacaat tgctttactt gttgctggac tagtgatcac tgtcattgtc	720
	attgttggag ccattctttt cgtcccaggt gaatattcat taaagaatgc tactggcctt	780
10	ggtttaattg tgacttctac agggatatta atattacttc actactatgt gtttagtaca	840
	gcgattgat taacctcctt cgtcattgcc atattggta ttcaggatgat agcctatatac	900
	ctcgctgtgg ttggactgag tctctgtatt gcggcgtgta taccaatgca tggccctctt	960
15	ctgatttcag gtttgagtat cttagctcta gcacaattac ttggactagt ttatatgaaa	1020
	tttggtgctt ccaatcagaa gactatacaa cctcctagga aagctgtaga ggaaccctt	1080
	aatgaataac tgaagtgaag tgatggactc cgatttggag agtagtaaga cgtgaaagga	1140
20	atacacttgt gtttaagcac catggccttg atgattcact gttggggaga agaaacaaga	1200
	aaagtaactg gttgtcacct atgagaccct tacgtgattg ttagttaagt ttttattcaa	1260
	agcagctgta atttagttaa taaaataatt atgatctatg ttgtttgcc aattgagatc	1320
25	cagttttttg ttgttatttt taatcaatta ggggcaatag tagaatggac aatttccaag	1380
	aatgatgcct ttcaggctct agggcctctg gcctctaggt aaccagttta aattggttca	1440
	gggtgataac tacttagcac tgccctggtg attaccaga gatatctatg aaaaccagtg	1500
30	gcttccatca aacctttgcc aactcagggt cacagcagct ttgggcagtt atggcagtat	1560
	ggcattagct gagaggtgtc tgccacttct gggccaatgg aataataaat taagtacagg	1620
	caggaatttg gttgggagca tcttgtatga tctccgatg atgtgatatt gatggagata	1680
35	gtggtcctca ttcttggggg ttgccattcc cacattcccc cttcaacaaa cagtgtaaaca	1740
	ggtccttccc agatttaggg tacttttatt gatggatatg ttttcctttt attcacataa	1800
	ccccttgaaa ccctgtcttg tccctctgtt acttgccttct gctgtacaag atgtagcacc	1860
40	ttttctcctc tttgaacatg gtctagtgac acggtagcac cagttgcagg aaggagccag	1920
	acttgttctc agagcactgt gttcacactt ttcagcaaaa atagctatgg ttgtaacata	1980
45	tgtattccct tcctctgatt tgaaggcaaa aatctacagt gtttcttcac ttcttttctg	2040
	atctggggca tgaaaaaagc aagattgaaa tttgaactat gagtctcctg catggcaaca	2100
	aaatgtgtgt caccatcagg ccaacaggcc agcccttgaa tggggattta ttactgttgt	2160
50	atctatgttg catgataaac attcatcacc ttccctctgt agtccctgcct cgtactcccc	2220
	ttcccctatg attgaaaagt aaacaaaacc cacatttcct atcctgggta gaagaaaatt	2280
	aatgttctga cagttgtgat cgcctggagt acttttagac ttttagcatt cgttttttac	2340
55	ctgtttgtgg atgtgtgttt gtatgtgcat acgtatgaga taggcacatg catcttctgt	2400
	atggacaaaag gtggggatacc tacaggagag caaaggttaa ttttgtgctt ttagtaaaaa	2460
	catttaaata caaagttcct tattgggtgg aattatattt gatgcaataa tttgatcact	2520
60		
65		

ES 2 716 735 T3

5 taaaactttt aaaacttcta ggtaatttgc cacgcttttt gactgctcac caataccctg 2580
 taaaaatcag taattcttcc tgtttggtga ataagatatt catatttgta gttgcattaa 2640
 taatagttat ttcttagtcc atcagatggt cccgtgtgcc tcttttatgc caaattgatt 2700
 10 gtcataatttc atgttgggac caagtagttt gcccatggca aacctaaatt tatgacctgc 2760
 tgaggcctct cagaaaactg agcatactag caagacagct cttcttgaaa aaaaaaatat 2820
 gtatacacia atatatacgt atatctatat atacgtatgt atatacacac atgtatattc 2880
 15 ttccttgatt gtgtagctgt ccaaaataat aacatatata gagggagctg tattccttta 2940
 tacaatctg atggctcctg cagcaactttt tccttctgaa aatatttaca ttttgtaac 3000
 ctagtttggt actttaaaaa tcagttttga tgaaaggagg gaaaagcaga tggacttgaa 3060
 20 aaagatocaa gctcctatta gaaaaggat gaaaatcttt atagtaaaat tttttataaa 3120
 ctaaagttgt accttttaat atgtagtaaa ctctcattta tttggggttc gctcctggat 3180
 ctcatccatc catttgtgtc tctttaatgc tgctgcctt ttgaggcatt cactgcctca 3240
 25 gacaatgcca ccagagatag tgggggaaat gccagatgaa accaactctt gctctcacta 3300
 gttgtcagct tctctggata agtgaccaca gaagcaggag tcctcctgct tgggcatcat 3360
 tgggccagtt ccttctcttt aaatcagatt tgtaatggct cccaaattcc atcacatcac 3420
 30 atttaaatg cagacagtgt tttgcacatc atgtatctgt tttgtccat aatattgcttt 3480
 ttactccctg atcccagttt ctgctgttga ctctccatt cagttttatt tattgtgtgt 3540
 35 tctcacagtg acaccatttg tccttttctg caacaacctt tccagctact tttgcaaat 3600
 tctatttgtc ttctccttca aacattctc ctttgacgtt cctcttcac tgtgtagctg 3660
 ctcttttgtc tcttaactta ccattcctat agtactttat gcatctctgc ttagttctat 3720
 40 tagttttttg gccttgctct tctccttgat tttaaaattc cttctatagc tagagctttt 3780
 cttcttttca ttctctctc ctgcagtgtt ttgcatacat cagaagctag gtacataagt 3840
 taaatgattg agagttggct gtatttagat ttatcacttt ttaatagggt gagcttgaga 3900
 45 gttttctttc tttctgtttt ttttttttgt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 3960
 tgactaattt cacatgctct aaaaacctc aaagggtgatt atttttctcc tggaaactcc 4020
 50 aggtccattc tgtttaaatc cctaagaatg tcagaattaa aataacaggg ctatcccgta 4080
 attgaaata tttctttttt caggatgcta tagtcaattt agtaagtgc caccaaattg 4140
 ttatttgcac taacaaagct caaacacga taagtttact cctccatctc agtaataaaa 4200
 55 attaagctgt aatcaacctt ctaggtttct cttgtcttaa aatgggtatt caaaaatggg 4260
 gatctgtggg gtatgtatgg aaacacatac tccttaattt acctgttggt ggaaactgga 4320
 gaaatgattg tcgggcaacc gtttattttt tattgtattt ttttgggtg agggattttt 4380

60

65

ES 2 716 735 T3

5 ttataaacag ttttacttgt gtcatatat tttt aaaattacta actgccatca cctgctgggg 4440
 tcctttgtta ggtcattttc agtgactaat agggataatc caggtaactt tgaagagatg 4500
 agcagtgagt gaccaggcag tttttctgcc ttttagctttg acagttctta attaagatca 4560
 10 ttgaagacca gctttctcat aaatttctct ttttgaaaaa aagaaagcat ttgtactaag 4620
 ctcctctgta agacaacatc ttaaacttta aaagtgtgtt tatcatgact ggtgagagaa 4680
 gaaaacattt tgtttttatt aaatggagca ttatttacia aaagccattg ttgagaatta 4740
 15 gatccccacat cgtataaata tctattaacc attctaaata aagagaactc cagtgttgct 4800
 atgtgcaaga tcctctcttg gagctttttt gcatagcaat taaaggtgtg ctattttgtca 4860
 gtagccattt ttttgacgtg atttgaagac caaagttggt ttacagctgt gttaccgtta 4920
 20 aaggtttttt tttttatatg tattaatca atttatcact gtttaaagct ttgaatatct 4980
 gcaatctttg ccaaggtact tttttattta aaaaaaaca taactttgta aatattaccc 5040
 25 tgtaatatta tatatactta ataaaacatt ttaagcta 5078

30 <210> 14
 <211> 312
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 14

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 716 735 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

60 Ala Val Glu Glu Pro Leu Asn Glu
305 310

<210> 15
<211> 5346
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 15

55 ggggagcagg cgggggagcg ggcgggaagc agtgggagcg cgcgtgcgcg cggccgtgca 60
gcctgggcag tgggtcctgc ctgtgacgcg cggcggcggt cggtcctgcc tgtaacggcg 120
60 gcggcggctg ctgctccaga cacctgcggc ggcggcggcg accccgcggc gggcgcggag 180
atgtggcccc tggtagcggc gctgttgctg ggctcggcgt gctgcggtac agctcagcta 240
ctatttaata aaacaaaatc tgtagaattc acgttttgta atgacactgt cgtcattcca 300

65

ES 2 716 735 T3

5	tgctttgtta ctaatatgga ggcacaaaac actactgaag tatacgtaaa gtggaaat	360
	aaaggaagag atatttacac ctttgatgga gctctaaaca agtccactgt cccactgac	420
	tttagtagtg caaaaattga agtctcacia ttactaaaag gagatgcctc tttgaagatg	480
10	gataagagtg atgctgtctc acacacagga aactacactt gtgaagtaac agaattaacc	540
	agagaaggtg aaacgatcat cgagctaaaa tatcgtgttg tttcatggtt ttctccaaat	600
	gaaaatattc ttattgttat tttccaatt tttgctatac tcctgttctg gggacagttt	660
15	ggtattaaaa cacttaaata tagatccggg ggtatggatg agaaaacaat tgctttactt	720
	gttgctggac tagtgatcac tgtcattgtc attgttgag ccattctttt cgtcccaggt	780
	gaatattcat taaagaatgc tactggcctt ggtttaattg tgacttctac agggatatta	840
20	atattacttc actactatgt gtttagtaca gcgattgat taacctcctt cgtcattgcc	900
	atattggtta ttcaggtgat agcctatata ctcgctgtgg ttggactgag tctctgtatt	960
	gggcgtgta taccaatgca tggccctctt ctgattcag gtttgagtat cttagctcta	1020
25	gcacaattac ttggactagt ttatatgaaa tttgtggctt ccaatcagaa gactatacaa	1080
	cctcctagga aagctgtaga ggaaccctt aatgcattca aagaatcaaa aggaatgatg	1140
	aatgatgaat aactgaagtg aagtgatgga ctccgatttg gagagtagta agacgtgaaa	1200
30	ggaatacact tgtgtttaag caccatggcc ttgatgattc actgttgggg agaagaaaca	1260
	agaaaagtaa ctggttgc cctatgagac ccttacgtga ttgtagtta agtttttatt	1320
35	caaagcagct gtaatttagt taataaaata attatgatct atgttgtttg cccaattgag	1380
	atccagtttt ttgtgttat ttttaataca ttaggggcaa tagtagaatg gacaatttcc	1440
	aagaatgatg cctttcaggt cctagggcct ctggcctcta ggtaaccagt ttaaattggg	1500
40	tcagggatg aactacttag cactgccttg gtgattacc agagatatct atgaaaacca	1560
	gtggcttcca tcaaaccttt gccaaactcag gttcacagca gctttgggca gttatggcag	1620
	tatggcatta gctgagaggt gtctgccact tctgggtcaa tggataata aattaagtac	1680
45	aggcaggaat ttggttggga gcatcttcta tgatctcctg atgatgtgat attgatggag	1740
	atagtgttcc tcattcttgg gggttgcat tcccacattc ccccttcaac aaacagtgta	1800
	acaggtcctt cccagattta gggactttt attgatgat atgttttctt tttattcaca	1860
50	taacccttg aaaccctgtc ttgtcctcct gtacttgct tctgctgtac aagatgtagc	1920
	accttttctc ctctttgaac atggctagt gacacggtag caccagttgc aggaaggagc	1980
55	cagactgtt ctcagagcac tgtgttcaca cttttcagca aaaatagcta tggttgtaac	2040
	atatgtattc cctcctctg atttgaaggc aaaaatctac agtgtttctt cacttctttt	2100
	ctgatctggg gcatgaaaa agcaagattg aaatttgaac tatgagtctc ctgcatggca	2160
60		
65		

ES 2 716 735 T3

5	acaaaatgtg tgtcaccatc aggccaacag gccagccctt gaatggggat ttattactgt	2220
	tgtatctatg ttgcatgata aacattcatc accttcctcc tgtagtccctg cctcgtactc	2280
	cccttcccct atgattgaaa agtaaaacaaa acccacattt cctatcctgg ttagaagaaa	2340
10	attaatgttc tgacagttgt gatcgccctg agtactttta gacttttagc attcgttttt	2400
	tacctgtttg tggatgtgtg tttgtatgtg catacgtatg agataggcac atgcatcttc	2460
	tgtatggaca aagggtgggt acctacagga gagcaaaggt taattttgtg cttttagtaa	2520
15	aaacatttaa atacaaagt ctttattggg tggaattata tttgatgcaa atatttgatc	2580
	acttaaaact tttaaaactt ctaggtaatt tgccacgctt tttgactgct caccaatacc	2640
	ctgtaaaaat acgtaattct tcctgtttgt gtaataagat attcatattt gtagttgcat	2700
20	taataatagt tatttccttag tccatcagat gttcccgtgt gcctctttta tgccaaattg	2760
	attgtcatat ttcattgttg gaccaagtag tttgcccatg gcaaacctaa atttatgacc	2820
	tgctgaggcc tctcagaaaa ctgagcatac tagcaagaca gctcttcttg aaaaaaaaa	2880
25	tatgtataca caaatatata cgtatatcta tatatacgta tgtatataca cacatgtata	2940
	ttcttccttg attgtgtagc tgtccaaaat aataacatat atagagggag ctgtattcct	3000
	ttatacaaat ctgatggctc ctgcagcact ttttccttct gaaaatattt acattttgct	3060
30	aacctagttt gttactttta aatcagttt tgatgaaagg agggaaaagc agatggactt	3120
	gaaaaagatc caagctccta ttagaaaagg tatgaaaatc tttatagtaa aattttttat	3180
	aaactaaagt tgtacotttt aatatgtagt aaactctcat ttatttgggg ttogctcttg	3240
35	gatctcatcc atccattgtg ttctctttta tgctgcctgc cttttgaggc attcactgcc	3300
	ctagacaatg ccaccagaga tagtggggga aatgccagat gaaaccaact cttgctctca	3360
	ctagttgtca gcttctctg ataagtgacc acagaagcag gagtcctcct gcttgggcat	3420
40	cattgggcca gttccttctc tttaaatcag atttgtaatg gctcccaaat tccatcacat	3480
	cacatttaa ttgcagacag tgttttgcac atcatgtatc tgttttgtcc cataatatgc	3540
45	tttttactcc ctgatccag tttctgctgt tgactcttcc attcagtttt atttattgtg	3600
	tgttctcaca gtgacaccat ttgtcctttt ctgcaacaac ctttccagct acttttgcca	3660
	aattctattt gtcttctcct tcaaaacatt ctcctttgca gttcctcttc atctgtgtag	3720
50	ctgctctttt gtctcttaac ttaccattcc tatagtactt tatgcatctc tgettagttc	3780
	tattagtttt ttggccttgc tcttctcctt gattttaaaa ttccttctat agctagagct	3840
	tttctttctt tcattctctc ttctctcagt gttttgcata catcagaagc taggtacata	3900
55	agttaaatga ttgagagttg gctgtattta gatttatcac tttttaatag ggtgagcttg	3960
	agagttttct ttctttctgt tttttttttt tgtttttttt tttttttttt tttttttttt	4020
	ttttgactaa tttcacatgc tctaaaaacc ttcaaagggtg attatttttc tcctggaaac	4080
60		
65		

ES 2 716 735 T3

5 tccaggtcca ttctgttta atccctaaga atgtcagaat taaaataaca gggctatccc 4140
 gtaattggaa atatttcttt tttcaggatg ctatagtcaa tttagtaagt gaccacccaaa 4200
 ttgttatttg cactaacaaa gctcaaaaaca cgataagttt actcctccat ctacagtaata 4260
 10 aaaattaagc tgtaatcaac cttctaggtt tctcttgtct taaaatgggt attcaaaaat 4320
 ggggatctgt ggtgatgta tggaaacaca tactccttaa tttacctgtt gttggaaact 4380
 ggagaaatga ttgtcgggca accgtttatt ttttattgta ttttatttgg ttgagggatt 4440
 15 tttttataaa cagttttact tgtgtcatat tttaaaatta ctaactgccca tcacctgctg 4500
 gggctccttg ttaggtcatt ttcagtgact aatagggata atccaggtaa ctttgaagag 4560
 atgagcagtg agtgaccagg cagtttttct gcctttagct ttgacagttc ttaattaaga 4620
 20 tcattgaaga ccagctttct cataaatttc tctttttgaa aaaaagaaag catttgtact 4680
 aagctcctct gtaagacaac atcttaaatc ttaaaagtgt tgttatcatg actggtgaga 4740
 25 gaagaaaaca ttttgTTTTT attaaatgga gcattattta caaaaagcca ttggtgagaa 4800
 ttagatccca catcgtataa atatctatta accattctaa ataaagagaa ctccagtgtt 4860
 gctatgtgca agatcctctc ttggagcttt tttgcatagc aattaaaggt gtgctatttg 4920
 30 tcagtagcca tttttttgca gtgatttgaa gaccaaagt gttttacagc tgtgttaccg 4980
 ttaaaggttt ttttttttat atgtattaaa tcaatttatc actgtttaaa gctttgaata 5040
 tctgcaatct ttgccaaggt acttttttat ttaaaaaaaa acataacttt gtaaataatta 5100
 35 ccctgtaata ttatatatac ttaataaaac attttaagct attttggttg gctatttcta 5160
 ttgctgctac agcagaccac aagcacattt ctgaaaaatt taatttatta atgtattttt 5220
 aagttgctta tattctaggt aacaatgtaa agaagattt aaaatattaa ttatgaattt 5280
 40 tttgagtata atacccaata agcttttaat tagagcagag ttttaattaa aagttttaaa 5340
 tcagtc 5346

45 <210> 16
 <211> 323
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 50 <400> 16

55 Met Trp Pro Leu Val Ala Ala Leu Leu Leu Gly Ser Ala Cys Cys Gly
 1 5 10 15
 Ser Ala Gln Leu Leu Phe Asn Lys Thr Lys Ser Val Glu Phe Thr Phe
 20 25 30
 60 Cys Asn Asp Thr Val Val Ile Pro Cys Phe Val Thr Asn Met Glu Ala
 35 40 45
 65

ES 2 716 735 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 716 735 T3

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

Asn Asp Glu

10 <210> 17
<211> 293
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: polipéptido sintético"

20 <400> 17

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

60

65

ES 2 716 735 T3

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

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

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

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

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

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

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

40 Met Lys Phe Val Glu
290

35 <210> 18
<211> 305
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: polipéptido sintético"

45 <400> 18

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

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

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

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

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

ES 2 716 735 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

55 Arg
305

60 <210> 19
<211> 312
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente

65 <223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: polipéptido sintético"

ES 2 716 735 T3

<400> 19

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

55

60

65

ES 2 716 735 T3

	210		215		220														
5	Tyr	Tyr	Val	Phe	Ser	Thr	Ala	Ile	Gly	Leu	Thr	Ser	Phe	Val	Ile	Ala			
	225					230					235					240			
10	Ile	Leu	Val	Ile	Gln	Val	Ile	Ala	Tyr	Ile	Leu	Ala	Val	Val	Gly	Leu			
					245					250					255				
15	Ser	Leu	Cys	Ile	Ala	Ala	Cys	Ile	Pro	Met	His	Gly	Pro	Leu	Leu	Ile			
				260					265					270					
20	Ser	Gly	Leu	Ser	Ile	Leu	Ala	Leu	Ala	Gln	Leu	Leu	Gly	Leu	Val	Tyr			
			275					280					285						
25	Met	Lys	Phe	Val	Ala	Ser	Asn	Gln	Arg	Thr	Ile	Gln	Pro	Pro	Arg	Lys			
		290					295					300							
30	Ala	Val	Glu	Glu	Pro	Leu	Asn	Glu											
	305					310													
35	<210>	20																	
	<211>	323																	
	<212>	PRT																	
	<213>	Secuencia artificial																	
40	<220>																		
	<221>	fuelle																	
	<223>	/nota="Descripción de la Secuencia Artificial: polipéptido sintético"																	
45	<400>	20																	
50	Met	Trp	Pro	Leu	Ala	Ala	Ala	Leu	Leu	Leu	Gly	Ser	Cys	Cys	Cys	Gly			
	1				5					10					15				
55	Ser	Ala	Gln	Leu	Leu	Phe	Asn	Lys	Thr	Lys	Ser	Val	Glu	Phe	Thr	Phe			
			20					25					30						
60	Cys	Asn	Asp	Thr	Val	Val	Ile	Pro	Cys	Phe	Val	Thr	Asn	Met	Glu	Ala			
			35				40					45							
65	Gln	Asn	Thr	Thr	Glu	Val	Tyr	Val	Lys	Trp	Lys	Phe	Lys	Gly	Arg	Asp			
	50					55					60								
70	Ile	Tyr	Thr	Phe	Asp	Gly	Ala	Leu	Asn	Lys	Ser	Thr	Val	Pro	Thr	Asp			
	65				70				75					80					
75	Phe	Ser	Ser	Ala	Lys	Ile	Glu	Val	Ser	Gln	Leu	Leu	Lys	Gly	Asp	Ala			
				85					90					95					
80	Ser	Leu	Lys	Met	Asp	Lys	Ser	Asp	Ala	Val	Ser	His	Thr	Gly	Asn	Tyr			

ES 2 716 735 T3

```

                100                105                110
5      Thr Cys Glu Val Thr Glu Leu Thr Arg Glu Gly Glu Thr Ile Ile Glu
           115                120                125
10     Leu Lys Tyr Arg Val Val Ser Trp Phe Ser Pro Asn Glu Asn Ile Leu
           130                135                140
15     Ile Val Ile Phe Pro Ile Phe Ala Ile Leu Leu Phe Trp Gly Gln Phe
           145                150                155
20     Gly Ile Lys Thr Leu Lys Tyr Arg Ser Gly Gly Met Asp Glu Lys Thr
           165                170                175
25     Ile Ala Leu Leu Val Ala Gly Leu Val Ile Thr Val Ile Val Ile Val
           180                185                190
30     Gly Ala Ile Leu Phe Val Pro Gly Glu Tyr Ser Leu Lys Asn Ala Thr
           195                200                205
35     Gly Leu Gly Leu Ile Val Thr Ser Thr Gly Ile Leu Ile Leu Leu His
           210                215                220
40     Tyr Tyr Val Phe Ser Thr Ala Ile Gly Leu Thr Ser Phe Val Ile Ala
           225                230                235
45     Ile Leu Val Ile Gln Val Ile Ala Tyr Ile Leu Ala Val Val Gly Leu
           245                250                255
50     Ser Leu Cys Ile Ala Ala Cys Ile Pro Met His Gly Pro Leu Leu Ile
           260                265                270
55     Ser Gly Leu Ser Ile Leu Ala Leu Ala Gln Leu Leu Gly Leu Val Tyr
           275                280                285
60     Met Lys Phe Val Ala Ser Asn Gln Arg Thr Ile Gln Pro Pro Arg Lys
           290                295                300
65     Ala Val Glu Glu Pro Leu Asn Ala Phe Lys Glu Ser Lys Gly Met Met
           305                310                315                320
       Asn Asp Glu
55     <210> 21
       <211> 22
       <212> ADN
       <213> Secuencia artificial
60     <220>
       <221> fuente
       <223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Iniciador sintético"
70     <400> 21
       tgcagaagtc actaggagga at      22

```

ES 2 716 735 T3

5
<210> 22
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Sonda sintética"

10
<400> 22
tcagtcaact tcttctgggt tgtttcc 27

15
<210> 23
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20
<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Iniciador sintético"

25
<400> 23
gtgccagact cactttctat cca 23

30
<210> 24
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

35
<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Iniciador sintético"

40
<400> 24
tgctgccaat atacggcttc tg 22

45
<210> 25
<211> 26
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

50
<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Sonda sintética"

55
<400> 25
cagctctcat agccaactat ggtgcc 26

60
<210> 26
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

65
<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Iniciador sintético"

70
<400> 26
tcaagcagag cctggttatc tg 22

75
<210> 27
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

80
<220>

ES 2 716 735 T3

<221> fuente
<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Iniciador sintético"

5 <400> 27
gtcgtcattc catgctttgt tac 23

<210> 28
<211> 30
<212> ADN
10 <213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Sonda sintética"

15 <400> 28
tggaggcaca aaacactact gaagtatacg 30

<210> 29
<211> 22
<212> ADN
20 <213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Iniciador sintético"

25 <400> 29
ggacagtgga ctgtttaga gc 22

30 <210> 30
<211> 21
<212> ADN
35 <213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Iniciador sintético"

40 <400> 30
ggcttggtgg ctgattgtc t 21

<210> 31
<211> 28
<212> ADN
45 <213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Sonda sintética"

50 <400> 31
agcacccaaa ctgatatgcc tgtattg 28

55 <210> 32
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

60 <220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Iniciador sintético"

65 <400> 32
tgggaactgg tgttcaagt cta 23

ES 2 716 735 T3

<210> 33
 <211> 158
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"
 10 gcgacatga ttacttcaga gctttcaaag ctagatactg taccttgcac attccaacac 60
 gcgatcgcac ttaagatth tccatcctag tggaaagata tgatttgatt catcctatth 120
 actttatata ttaaaatata ataaaccta ccacttht 158
 15
 <400> 33
 20
 <210> 34
 <211> 160
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"
 <400> 34
 30 ggatccatth taagtaatag aataggatth ttaattgttc cagtgtthct gtgatagac 60
 tgtcctgcac agacctgtht ctogagataa ctctgataa tgtatgctat acgaagttat 120
 atacataacc tccacaccac atthtaacc ctccacacc 160
 35
 <210> 35
 <211> 160
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"
 45
 <400> 35
 catgtctgga ataacttctg ataatgtatg ctatacgaag ttatgctagt aactataacg 60
 gtcctaaggt agcgactagc attagtatgg aaggctcctc cactgtccag gttcctcttg 120
 50 ccaactctt tctctctctc aactctatat acactactta 160
 <210> 36
 <211> 239
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 55
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"
 60
 <400> 36
 65

ES 2 716 735 T3

5
10

ggatccattt taagtaatag aataggattt ttaattgttc cagtgtttct gtgatagagc	60
tgtcctgcac agacctgttt ctcgagataa ctctgtataa tgtatgctat acgaagtat	120
gctagtaact ataacggtcc taaggtagcg actagcatta gtatggaagg tccgtccact	180
gtccaggttc ctcttgcgga gctctttgtc tctctggact ctgtatacac tgcttgcac	239

REIVINDICACIONES

1. Un roedor cuyo genoma comprende un gen de CD47 humanizado, en donde el gen de CD47 humanizado comprende el exón 1 de un gen de CD47 endógeno de roedor, los exones 2-7 de un gen de CD47 humano, y los exones corriente abajo del exón 7 del gen de CD47 endógeno de roedor, en donde el gen de CD47 humanizado se une operativamente a un promotor de CD47 endógeno de roedor.
2. El roedor de la reivindicación 1, en donde el roedor comprende además un gen de SIRP α que codifica un polipéptido de SIRP α que comprende el dominio extracelular de un polipéptido de SIRP α humano y el dominio intracelular de un polipéptido de SIRP α endógeno de roedor, en donde el polipéptido de SIRP α interactúa con CD47 y opcionalmente el gen de SIRP α comprende los exones 1, 5, 6, 7 y 8 de un gen de SIRP α endógeno de roedor y los exones 2-4 de un gen de SIRP α humano.
3. El roedor de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el roedor es un ratón o una rata.
4. Una célula o tejido aislado de roedor cuyo genoma comprende un gen de CD47 humanizado, en donde el gen de CD47 humanizado comprende el exón 1 de un gen de CD47 endógeno de roedor, los exones 2-7 de un gen de CD47 humano, y los exones corriente abajo del exón 7 del gen de CD47 endógeno de roedor, en donde el gen de CD47 humanizado se une operativamente a un promotor de CD47 endógeno de roedor, y opcionalmente la célula o tejido de roedor es célula de ratón o tejido de ratón, o una célula de rata o tejido de rata.
5. La célula de roedor de la reivindicación 4, en donde dicha célula es una célula madre embrionaria de roedor, y opcionalmente la célula madre embrionaria de roedor es una célula madre embrionaria de ratón o de rata.
6. Un embrión de roedor generado a partir de la célula madre embrionaria de conformidad con la reivindicación 5.
7. Un método para proporcionar un roedor cuyo genoma comprende un gen de CD47 que codifica una porción extracelular de un polipéptido de CD47 humano unido a una porción intracelular de un polipéptido de CD47 endógeno, el método que comprende modificar el genoma de un roedor de manera que comprenda un gen de CD47 humanizado, en donde el gen de CD47 humanizado comprende el exón 1 de un gen de CD47 endógeno de roedor, los exones 2-7 de un gen de CD47 humano, y los exones corriente abajo del exón 7 del gen de CD47 endógeno de roedor, en donde el gen de CD47 humanizado se une operativamente a un promotor de CD47 endógeno de roedor, que proporciona así dicho roedor.
8. Un método de obtener un roedor que expresa un polipéptido de CD47 a partir de un locus de CD47 endógeno, en donde el polipéptido de CD47 comprende una secuencia humana, el método que comprende:
 - (a) insertar un fragmento genómico en un locus de CD47 endógeno de roedor en una célula madre embrionaria de roedor, dicho fragmento genómico que comprende los exones 2-7 de un gen de CD47 humano, de esta manera forma el gen de CD47 humanizado en el locus de CD47 endógeno de roedor;
 - (b) obtener una célula madre embrionaria de roedor que comprende el gen de CD47 humanizado de (a); y
 - (c) crear un roedor mediante el uso de la célula madre embrionaria de roedor de (b).
9. El método de conformidad con la reivindicación 7 u 8, en donde el roedor es un ratón o una rata.
10. Un método para evaluar el injerto de células humanas, en donde dicho método comprende evaluar el injerto de células humanas en un roedor de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde opcionalmente las células humanas son células madre hematopoyéticas.
11. Un método para evaluar la eficacia terapéutica de un fármaco que se dirige a células humanas, el método comprende:
 - administrar un candidato a fármaco a un roedor de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3 en el cual se han trasplantado una o más células humanas; y
 - controlar las células humanas en el ratón para determinar la eficacia terapéutica del candidato a fármaco.
12. Un método para evaluar si el modulador candidato de una proteína CD47 humana induce aglutinación de los glóbulos rojos, dicho método que comprende
 - incubar los glóbulos rojos aislados de un roedor de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3 en presencia del modulador candidato; y
 - evaluar si el modulador candidato induce la aglutinación de los glóbulos rojos.

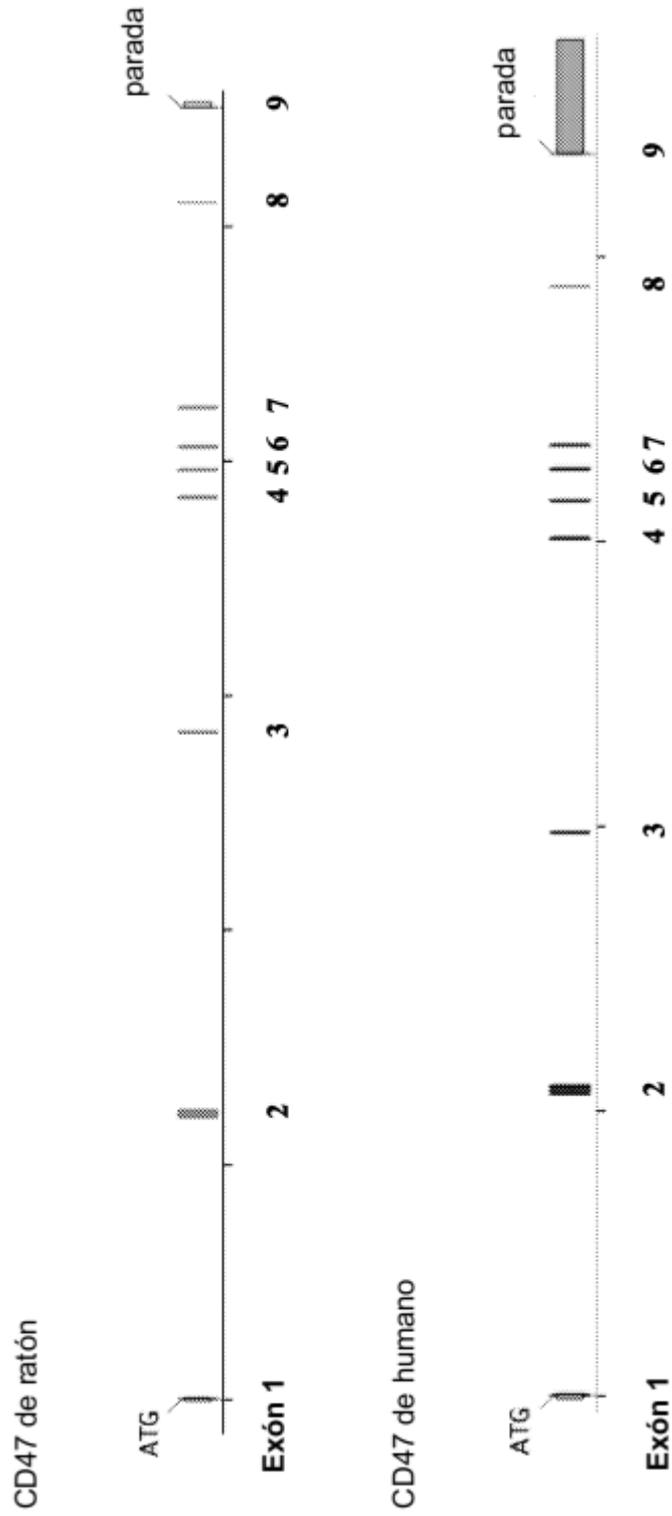
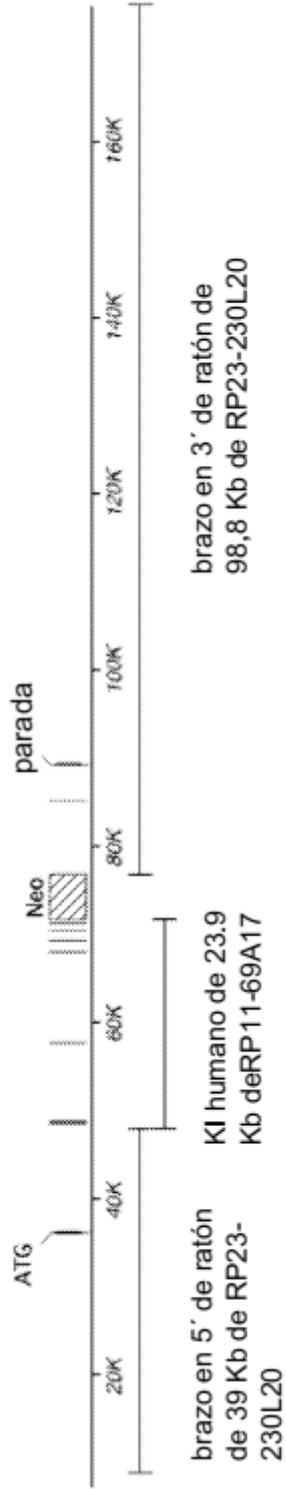


Figura 1

Gen de CD47 endógeno con los exones 2-7 insertados de CD47 humano y casete de neomicina intacto (~4995 pb)



Gen de CD47 endógeno con los exones 2-7 insertados de CD47 humano y casete de neomicina eliminado (permanecen 76 pb)

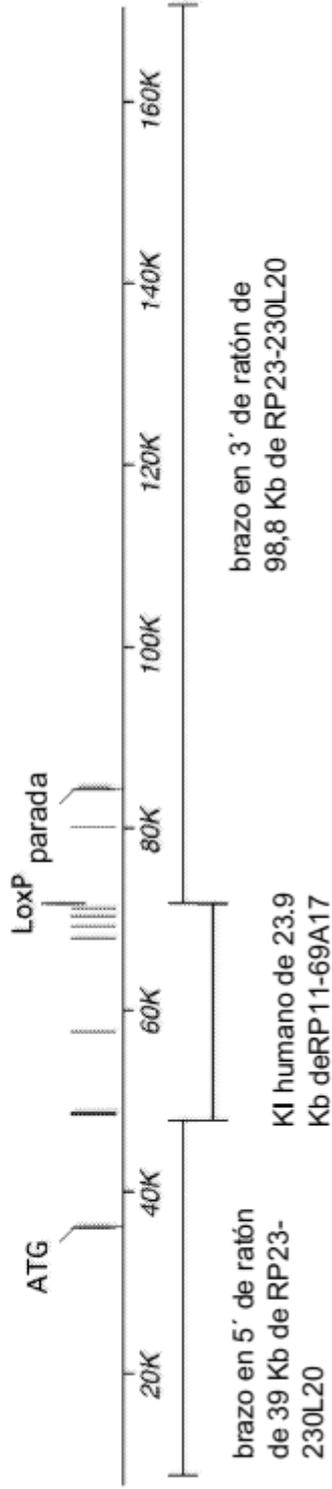


Figura 2

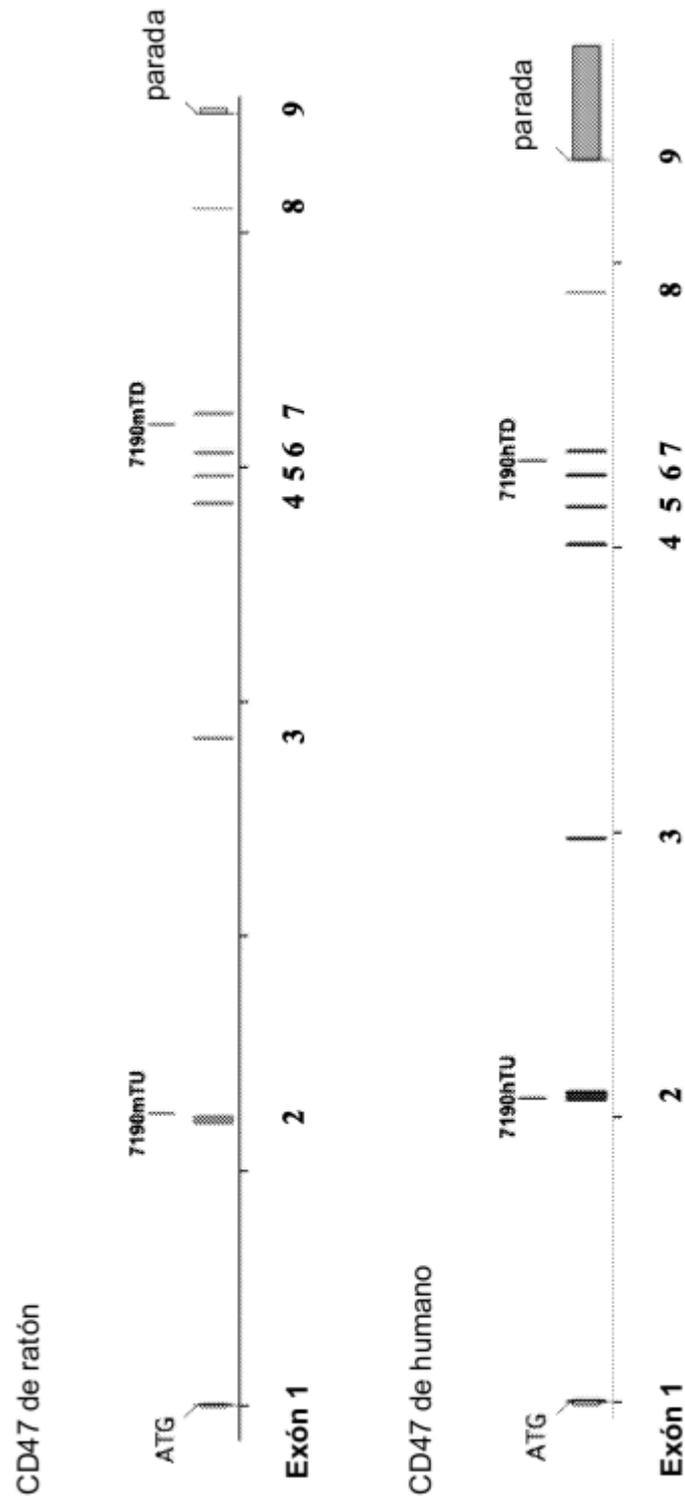


Figura 3

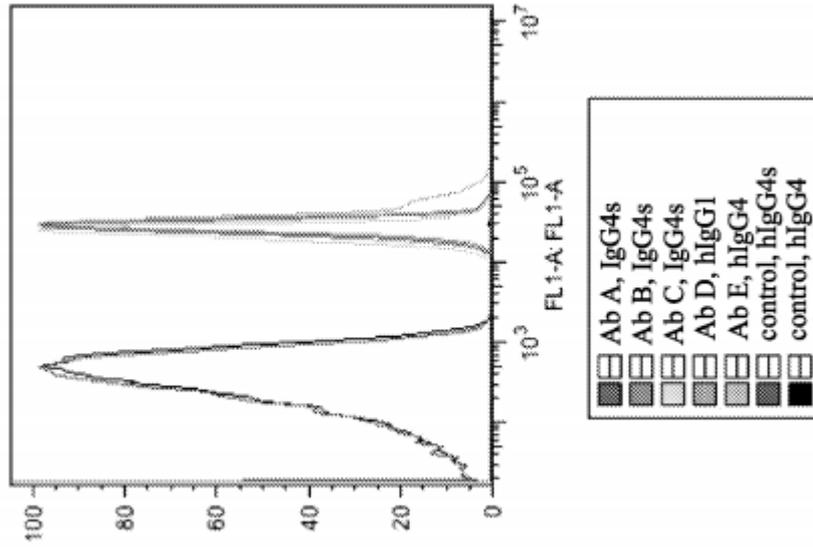


Figura 4

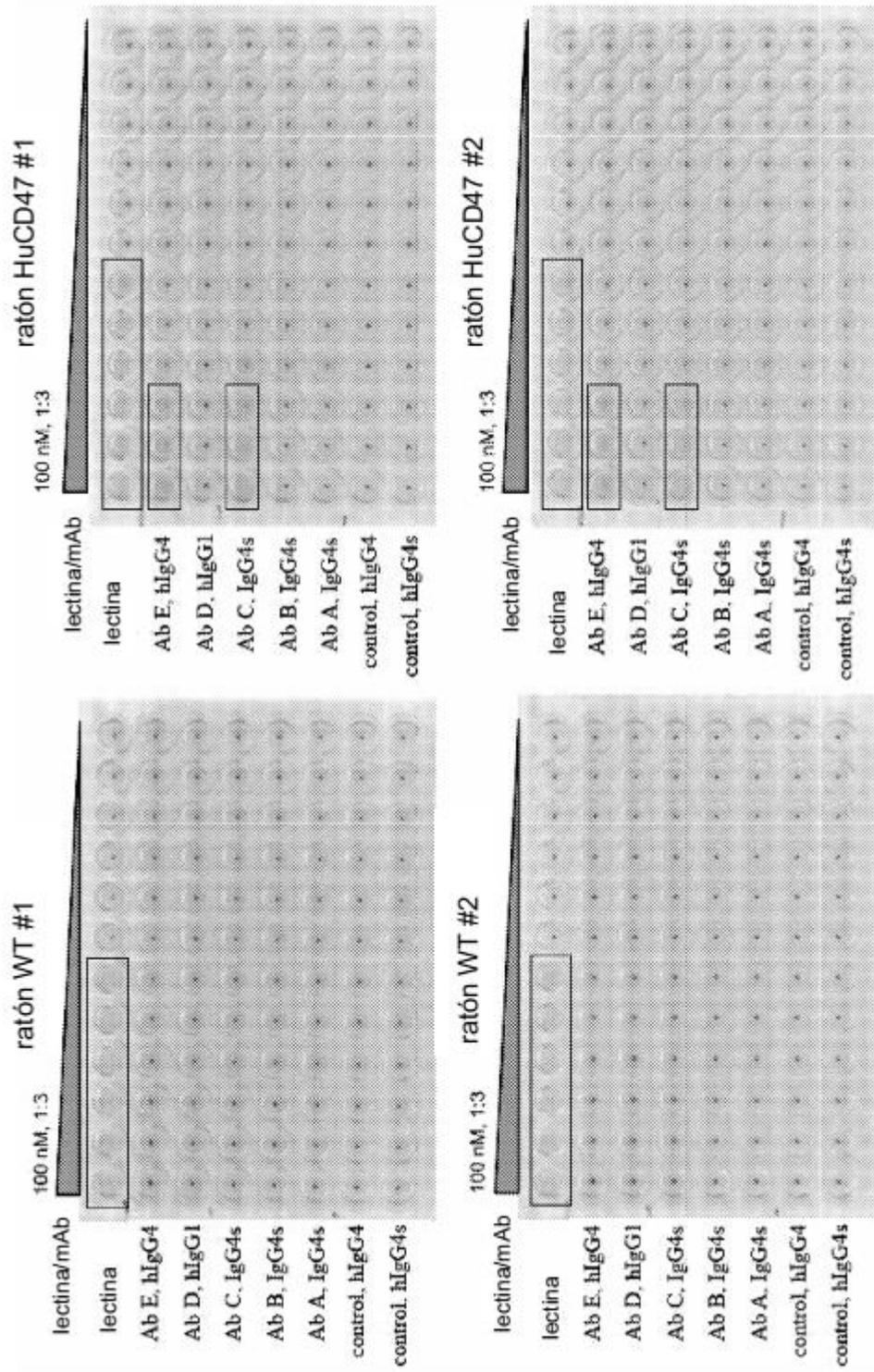


Figura 5

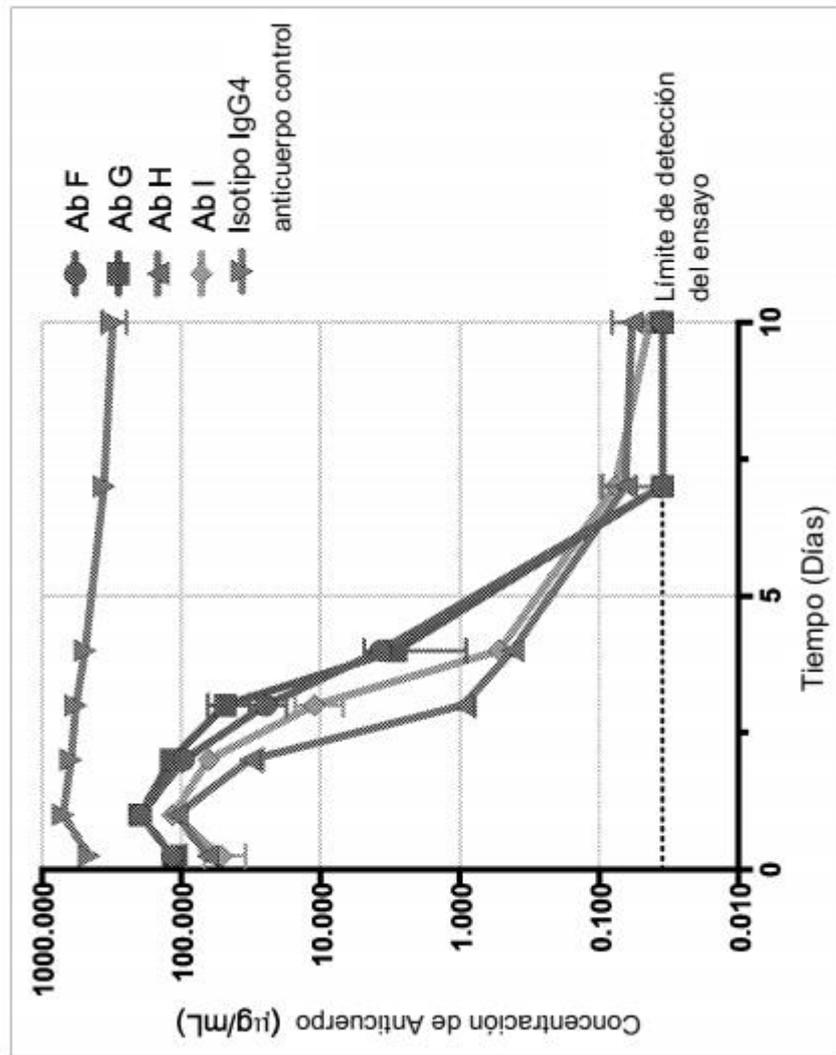


Figura 6

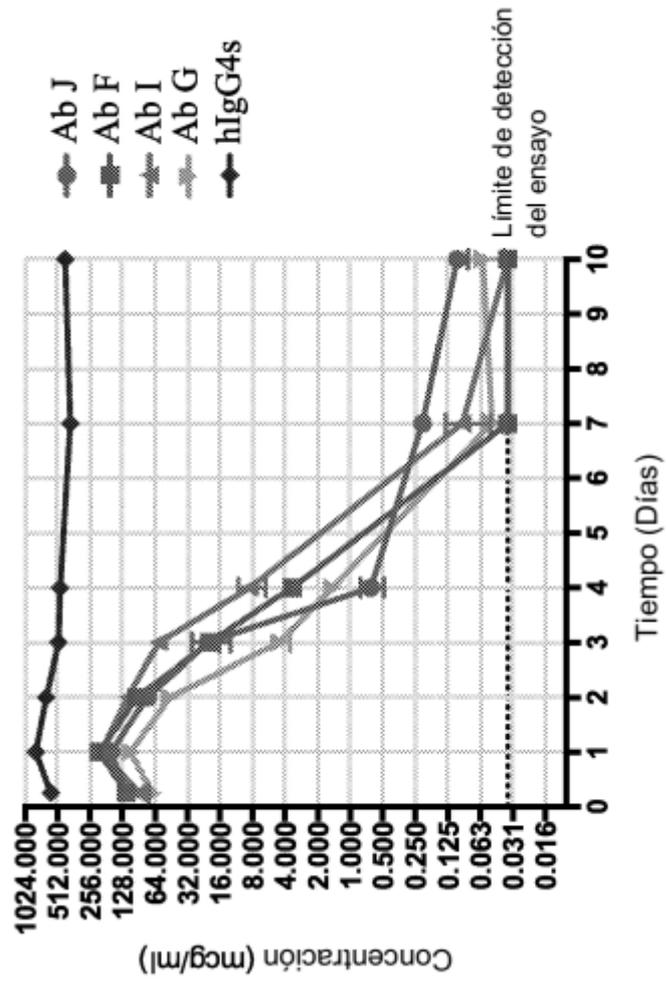


Figura 7

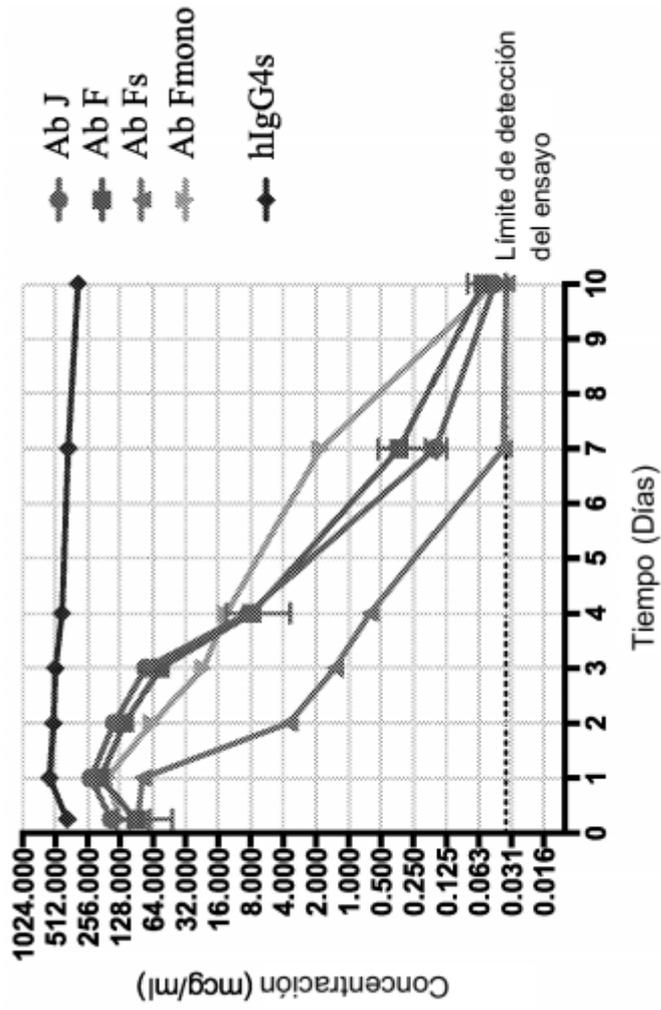


Figura 8

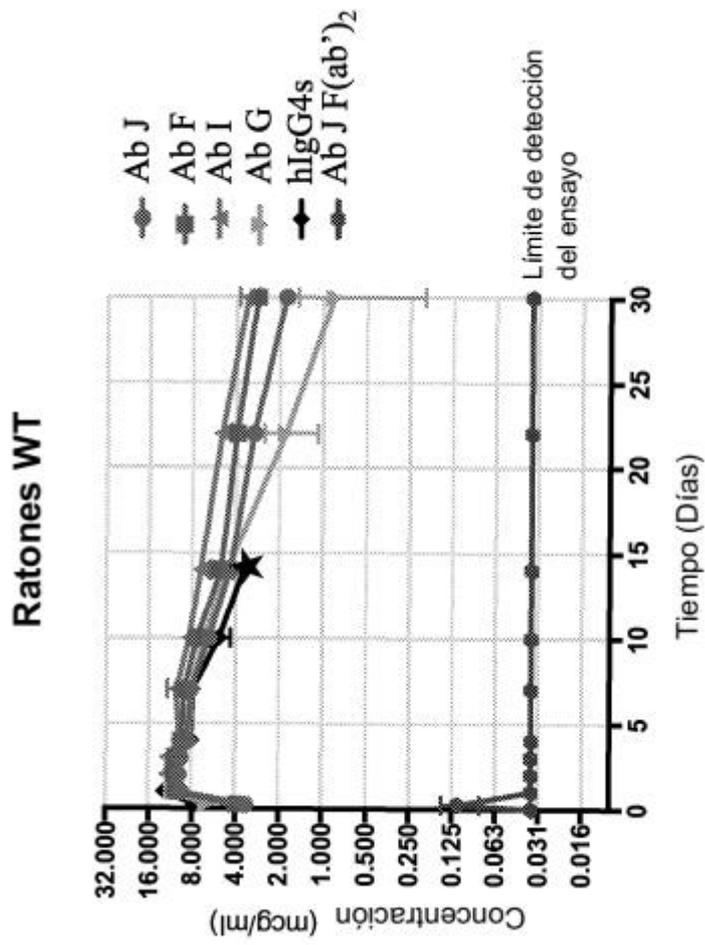


Figura 9