



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102762590 B

(45) 授权公告日 2015. 11. 25

(21) 申请号 201080064262. 4

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2010. 12. 17

C07K 14/705(2006. 01)

A01K 67/027(2006. 01)

(30) 优先权数据

61/288, 562 2009. 12. 21 US

(56) 对比文件

US 6676927 B1 , 2004. 01. 13,

WO 1995/028959 A1 , 1995. 11. 02,

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2012. 08. 20

审查员 刘树柏

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2010/060925 2010. 12. 17

(87) PCT国际申请的公布数据

WO2011/084664 EN 2011. 07. 14

(73) 专利权人 瑞泽恩制药公司

地址 美国纽约

(72) 发明人 L·麦克唐纳 涂纳新 C·古尔

S·史蒂文斯 A·J·墨菲

(74) 专利代理机构 北京商专永信知识产权代理
事务所(普通合伙) 11400

代理人 郭玥 葛强

权利要求书3页 说明书23页

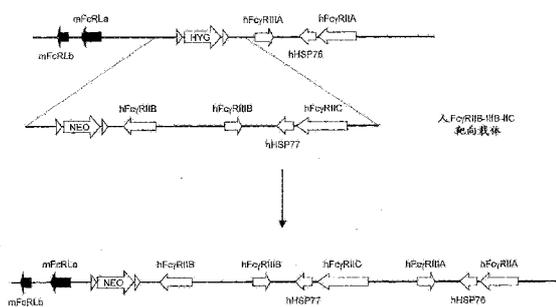
序列表9页 附图11页

(54) 发明名称

人源化的FcγR小鼠

(57) 摘要

提供了遗传修饰的非人动物和用于产生和使用它们的方法和组合物,其中所述遗传修饰包括内源低亲和力FcγR基因座的缺失,并且其中小鼠能够表达功能性Fcγ链。描述了遗传修饰的小鼠,包括从内源FcγR基因座表达低亲和力人FcγR基因的小鼠,并且其中所述小鼠包含功能性Fcγ链。提供了在宿主免疫系统的辅助细胞上表达至多5个低亲和力人FcγR基因的遗传修饰的小鼠。



1. 制备包含遗传修饰的小鼠的方法,包括以置于内源小鼠低亲和力 $Fc\gamma R$ 基因基因座上的至少两个低亲和力人 $Fc\gamma R\alpha$ 链基因替代内源低亲和力 $Fc\gamma R\alpha$ 链基因,并且其中所述小鼠包含功能性内源小鼠 $FcR\gamma$ 链。

2. 权利要求 1 所述的方法,其中至少两个低亲和力人 $Fc\gamma R\alpha$ 链基因选自下组:人 $Fc\gamma RIIA\alpha$ 链基因、人 $Fc\gamma RIIB\alpha$ 链基因、人 $Fc\gamma RIIC\alpha$ 链基因、人 $Fc\gamma RIIIA\alpha$ 链基因和人 $Fc\gamma RIIIB\alpha$ 链基因。

3. 权利要求 1 所述的方法,其中至少两个低亲和力人 $Fc\gamma R\alpha$ 链基因为人 $Fc\gamma RIIA\alpha$ 链基因和人 $Fc\gamma RIIIA\alpha$ 链基因。

4. 权利要求 3 所述的方法,其中人 $Fc\gamma RIIIA\alpha$ 链基因在小鼠的 NK 细胞上表达。

5. 权利要求 1 所述的方法,其中所述至少两个低亲和力人 $Fc\gamma R$ 基因为人 $Fc\gamma RIIB\alpha$ 链基因、人 $Fc\gamma RIIC\alpha$ 链基因和人 $Fc\gamma RIIIB\alpha$ 链基因。

6. 权利要求 3 所述的方法,其中所述 $Fc\gamma RIIA\alpha$ 链基因包含 131His 低应答者多态性或 131Arg 高应答者多态性,和 $Fc\gamma RIIIA\alpha$ 链基因包含 158Val 或 158Phe 等位基因变体。

7. 权利要求 2 所述的方法,其中所述小鼠包含人低亲和力 $Fc\gamma R$ 等位基因变体,并且所述等位基因变体选自 (a) 人 $Fc\gamma RIIA\alpha$ 链等位基因变体 131H, (b) 人 $Fc\gamma RIIIA\alpha$ 链等位基因变体 158V, (c) 人 $Fc\gamma RIIB\alpha$ 链等位基因变体 232I, (d) 人 $Fc\gamma RIIIB\alpha$ 链等位基因变体 NA2, 及 (e) 它们的组合。

8. 制备遗传修饰的小鼠的方法,包括以编码人 $Fc\gamma RIIIA\alpha$ 链和人 $Fc\gamma RIIA\alpha$ 链的基因替代编码 $Fc\gamma RIIB\alpha$ 链、 $Fc\gamma RIII\alpha$ 链和 $Fc\gamma RIV\alpha$ 链的内源小鼠基因,其中所述小鼠表达人 $Fc\gamma RIIIA\alpha$ 链蛋白、人 $Fc\gamma RIIA\alpha$ 链蛋白和内源小鼠 $FcR\gamma$ 亚基,其中所述人 $Fc\gamma RIIIA\alpha$ 链蛋白和所述人 $Fc\gamma RIIA\alpha$ 链蛋白与所述内源小鼠 $FcR\gamma$ 亚基结合,其中所述人 $Fc\gamma RIIIA\alpha$ 链蛋白在小鼠 NK 细胞的表面上表达。

9. 权利要求 8 的方法,其中小鼠 NK 细胞是小鼠血液中的循环 NK 细胞,并且在小鼠 NK 细胞表面上表达的人 $Fc\gamma RIIIA\alpha$ 链蛋白结合包含人 Fc 或修饰的人 Fc 的免疫粘附素或抗体,其中免疫粘附素或抗体特异性结合小鼠中的靶细胞,并且免疫粘附素或抗体对 NK 细胞表面上的人 $Fc\gamma RIIIA\alpha$ 链蛋白的结合介导靶细胞的 NK 细胞杀伤。

10. 权利要求 9 的方法,其中用人病原体感染靶细胞,并且免疫粘附素或抗体特异性结合人病原体的表位。

11. 权利要求 9 的方法,其中所述靶细胞是肿瘤细胞,并且免疫粘附素或抗体特异性结合肿瘤细胞的表位。

12. 遗传修饰的小鼠在制备用于测量治疗剂依赖性 NK 细胞杀伤的动物模型中的用途,其中所述测量包括:

(a) 给遗传修饰的小鼠施用特异性结合小鼠中的不是 NK 细胞的靶细胞的治疗剂,其中所述治疗剂包含人 Fc;

(b) 测量小鼠或小鼠的组织样品中的 NK 介导的靶细胞杀伤的水平;和

(c) 测定由所述治疗剂介导的靶细胞杀伤的量,从而测量治疗剂依赖性细胞杀伤;

其中所述遗传修饰的小鼠的基因组包含:

(a) 替代内源 $Fc\gamma RIIB$ 、 $Fc\gamma RIII$ 和 $Fc\gamma RIV\alpha$ 链基因的人 $Fc\gamma RIIA\alpha$ 链基因和人 $Fc\gamma RIIIA\alpha$ 链基因;或者

(b) 替代内源 Fc γ RIIB、Fc γ RIII 和 Fc γ RIV α 链基因的人 Fc γ RIIA α 链基因、人 Fc γ RIIB α 链基因、人 Fc γ RIIC α 链基因、人 Fc γ RIIIA α 链基因和人 Fc γ RIIIB α 链基因，

并且其中所述小鼠包含功能性内源小鼠 FcR γ 链。

13. 权利要求 12 的用途，其中所述靶细胞为人病原体，并且所述治疗剂特异性结合人病原体的表位。

14. 权利要求 12 的用途，其中靶细胞为被人病原体感染的小鼠细胞，并且所述治疗剂特异性结合所述人病原体的表位。

15. 权利要求 12 的用途，其中所述靶细胞为被人病原体感染的人细胞，并且所述治疗剂特异性结合所述人病原体的表位。

16. 权利要求 12 的用途，其中靶细胞为人肿瘤细胞，并且所述治疗剂特异性结合所述人肿瘤细胞的表位。

17. 权利要求 12 的用途，其中所述组织样品为血液样品。

18. 权利要求 12 的用途，其中所述治疗剂为抗体。

19. 权利要求 18 的用途，其中所述抗体为人抗体。

20. 在内源 Fc γ R 基因座表达低亲和力人 Fc γ R 基因的遗传修饰的小鼠在制备用于测定低亲和力 Fc γ R 是否与人疾病或障碍相关的动物模型中的用途，其中所述测定包括测定所述小鼠中与人疾病或障碍相关的性状的步骤，其中在所述遗传修饰的小鼠中，以置于内源小鼠低亲和力 Fc γ R 基因基因座上的至少两个低亲和力人 Fc γ R α 链基因替代内源低亲和力 Fc γ R α 链基因，并且其中所述小鼠包含功能性内源小鼠 FcR γ 链。

21. 在小鼠中制备抗 - 人 FcR α 链抗体的方法，包括将在内源 Fc γ R 基因座表达低亲和力人 Fc γ R 基因的遗传修饰的小鼠与人 FcR 接触，其中在所述遗传修饰的小鼠中，以置于内源小鼠低亲和力 Fc γ R 基因基因座上的至少两个低亲和力人 Fc γ R α 链基因替代内源低亲和力 Fc γ R α 链基因，并且其中所述小鼠包含功能性内源小鼠 FcR γ 链。

22. 遗传修饰的小鼠在制备用于测定抗 - 人 FcR 抗体将分子靶向表达 FcR 的细胞以吞噬靶分子的能力的动物模型中的用途，所述遗传修饰的小鼠的基因组包含 (a) 替代内源 Fc γ RIIB、Fc γ RIII 和 Fc γ RIV α 链基因的人 Fc γ RIIA α 链基因和人 Fc γ RIIIA α 链基因；或者 (b) 替代内源 Fc γ RIIB、Fc γ RIII 和 Fc γ RIV α 链基因的人 Fc γ RIIA α 链基因、人 Fc γ RIIB α 链基因、人 Fc γ RIIC α 链基因、人 Fc γ RIIIA α 链基因和人 Fc γ RIIIB α 链基因，并且其中所述小鼠包含功能性内源小鼠 FcR γ 链；其中所述测定包括将所述小鼠与包含抗 - 人 FcR 抗体的试剂接触，并且测量靶分子的吞噬。

23. 用于在遗传修饰的小鼠中产生针对抗原的抗体的方法，所述抗原在对于表达一种或多种内源 Fc γ R α 链基因的小鼠中具有差的免疫原性，所述方法包括将缺失小鼠低亲和力 FcR 但表达 Fc γ R γ 链的遗传修饰的小鼠与抗原接触，并鉴定识别所述差抗原性的抗原的抗体，其中在所述遗传修饰的小鼠中，以置于内源小鼠低亲和力 Fc γ R 基因基因座上的至少两个低亲和力人 Fc γ R α 链基因替代内源低亲和力 Fc γ R α 链基因，并且其中所述小鼠包含功能性内源小鼠 FcR γ 链。

24. 用于产生能够产生包含人可变区的抗体的小鼠的方法，包括将第一小鼠与第二小鼠交配的步骤，所述第一小鼠的基因组包含 (a) 替代内源 Fc γ RIIB、Fc γ RIII 和

Fc γ RIV α 链基因的人 Fc γ RIIA α 链基因和人 Fc γ RIIIA α 链基因 ;或者 (b) 替代内源 Fc γ RIIB、Fc γ RIII 和 Fc γ RIV α 链基因的人 Fc γ RIIA α 链基因、人 Fc γ RIIB α 链基因、人 Fc γ RIIC α 链基因、人 Fc γ RIIIA α 链基因和人 Fc γ RIIIB α 链基因,并且其中所述第一小鼠包含功能性内源小鼠 FcR γ 链 ;所述第二小鼠的基因组包含 (a) 一个或多个人免疫球蛋白可变区基因区段和一个或多个人恒定区基因 ;或 (b) 可操作地连接于小鼠恒定区基因的一个或多个人免疫球蛋白可变区基因区段,其中所述人基因区段在小鼠可变区基因区段的基因座上替代可变区基因区段。

25. 遗传修饰的小鼠在制备用于选择抗肿瘤抗体的动物模型中的用途,所述遗传修饰的小鼠的基因组包含 (a) 替代内源 Fc γ RIIB、Fc γ RIII 和 Fc γ RIV α 链基因的人 Fc γ RIIA α 链基因和人 Fc γ RIIIA α 链基因 ;或者 (b) 替代内源 Fc γ RIIB、Fc γ RIII 和 Fc γ RIV α 链基因的人 Fc γ RIIA α 链基因、人 Fc γ RIIB α 链基因、人 Fc γ RIIC α 链基因、人 Fc γ RIIIA α 链基因和人 Fc γ RIIIB α 链基因,并且其中所述小鼠包含功能性内源小鼠 FcR γ 链 ;其中所述选择包括测定抗体介导 ADCC 的能力的步骤,其中通过测定所述小鼠的细胞介导的 ADCC 来测试抗体介导 ADCC 的能力,如果抗体利用所述遗传修饰的小鼠的细胞介导 ADCC,则选择该抗体。

26. 遗传修饰的小鼠在制备用于鉴定抗肿瘤抗体的动物模型中的用途,所述遗传修饰的小鼠的基因组包含 (a) 替代内源 Fc γ RIIB、Fc γ RIII 和 Fc γ RIV α 链基因的人 Fc γ RIIA α 链基因和人 Fc γ RIIIA α 链基因 ;或者 (b) 替代内源 Fc γ RIIB、Fc γ RIII 和 Fc γ RIV α 链基因的人 Fc γ RIIA α 链基因、人 Fc γ RIIB α 链基因、人 Fc γ RIIC α 链基因、人 Fc γ RIIIA α 链基因和人 Fc γ RIIIB α 链基因,并且其中所述小鼠包含功能性内源小鼠 FcR γ 链 ;其中与通过野生型小鼠细胞的抗肿瘤抗体介导 ADCC 的能力相比较,通过所述小鼠细胞的增强的介导 ADCC 的能力,来进行鉴定所述抗肿瘤抗体。

人源化的 Fc γ R 小鼠

发明领域

[0001] 本发明领域是缺失内源鼠 Fc γ R 基因的遗传修饰的非人动物,包括内源 Fc γ R 基因被人 Fc γ R 基因替代的遗传修饰的动物,包括能够表达至少 2、3、4 或 5 种功能性人低亲和力 Fc γ R 基因的小鼠,以及包括包含不表达内源低亲和力 Fc γ R 基因的免疫细胞的遗传修饰的小鼠。

[0002] 背景

[0003] Fc 受体 (FcR) 是在哺乳动物的进行免疫系统的多种功能的免疫系统的细胞的表面上发现的蛋白质。FcR 以多种类型存在于多种细胞上,并且介导多种免疫功能,例如结合附着至被感染的细胞或侵袭性病原体的抗体、刺激吞噬细胞或细胞毒性细胞以通过抗体介导的吞噬作用或抗体依赖性细胞介导的细胞毒性 (ADCC) 破坏微生物或感染的细胞。

[0004] ADCC 是这样的过程:免疫系统的效应细胞裂解被抗体结合的靶细胞。该过程依赖于对外源抗原或细胞的先行接触,从而产生抗体应答。ADCC 可通过效应细胞例如天然杀伤 (NK) 细胞,通过效应细胞表面上表达的 FcR 对本身结合至外源抗原或细胞的抗体的 Fc 部分的结合来介导。由于 FcR 在免疫应答中起着中心作用,因此需要有共表达多种人 FcR 的有用的非人动物,包括共表达多种人低亲和力 FcR 的非人动物。存在对用于研究和阐明人疾病治疗(特别是抗肿瘤治疗和用于治疗自身免疫疾病的治疗)和药物开发(特别是在人抗体药剂的开发、设计和测试中)的人 FcR 功能和人的 ADCC 过程的非人动物模型。

[0005] 附图概述

[0006] 图 1 是小鼠的野生型低亲和力 Fc γ R 基因座的示意图,显示了小鼠 Fc γ RIIB, Fc γ RIV 和 Fc γ RIII 基因以及用于这些基因的靶向缺失的小鼠 Fc γ R 靶向载体,其包括侧翼连接有位点特异性重组位点的新霉素盒。

[0007] 图 2 显示了就 B 细胞(抗-CD19), NK 细胞(抗-NKp46) 和巨噬细胞(抗-F4/80) 门控的脾细胞的直方图,包括野生型和低亲和力 Fc γ R α 链基因缺陷型小鼠 (mFc γ R KO) 的内源 mFc γ RII 和 mFc γ RIII 基因的表达。

[0008] 图 3A-3D 显示了在人源化 CD20 小鼠 (hCD20) 和培育成 Fc γ R 敲除小鼠的人源化 CD20 小鼠 (hCD20/Fc γ R KO) 中在几个淋巴细胞区室 (lymphocyte compartment):骨髓(图 3A)、血液(图 3B)、淋巴结(图 3C) 和脾(图 3D) 中利用具有小鼠 Fc(Ab 168) 或人 Fc(Ab 735) 的人抗-人 CD20 抗体对 B 细胞进行的体内耗尽。对于每一个图, y-轴显示门控的 B 细胞 (B220⁺/IgM⁺或 B220⁺/CD19⁺) 的百分比, x-轴显示每一个动物组的抗体剂量:10mg/kg 对照抗体 (C), 2mg/kg 人抗-人 CD20 抗体 (2Ab 和 10mg/kg 人抗-人 CD20 抗体 (10Ab))。

[0009] 图 4 是低亲和力小鼠 Fc γ R 基因座的新霉素靶向缺失和用于将两个人低亲和力 Fc γ R 基因 (hFc γ RIIIA 和 hFc γ RIIA) 插入缺失的小鼠基因座的第二靶向载体的示意性描述,所述第二靶向载体包括侧翼连接有位点特异性重组位点的潮霉素盒。为了在血小板上表达 hFc γ RIIA,使用了可操作地连接于人 Fc γ RIIIA-IIA 靶向载体的 hFc γ RIIA 基因的延长的启动子区域;为了阻止在血小板上表达 hFc γ RIIA,删除或实质上删除所述启动子区域。

[0010] 图 5A 显示针对 NK 细胞 (抗 -NKp46 和巨噬细胞 (抗 -F4/80) 的门控的脾细胞的直方图,包括野生型和人 Fc γ RIIIA-IIA 纯合子小鼠 (人 Fc γ RIIIA/Fc γ RIIA HO) 的人 Fc γ RIIIA 的表达。

[0011] 图 5B 显示针对嗜中性粒细胞 (抗 -Ly6G) 和巨噬细胞 (抗 -F4/80) 的门控的脾细胞的直方图,包括野生型和人 Fc γ RIIIA-IIA 纯合子小鼠 (人 Fc γ RIIIA/Fc γ RIIA HO) 的人 Fc γ RIIA 的表达。

[0012] 图 6 为包括两个低亲和力人 Fc γ R 基因 (hFc γ RIIIA 和 hFc γ RIIA) 的插入的低亲和力小鼠 Fc γ R 基因座的潮霉素靶向缺失以及用于插入 3 个额外的低亲和力人 Fc γ R 基因 (hFc γ RIIB、hFc γ RIIIB 和 hFc γ RIIC) 的第三靶向载体和侧翼连接有位点特异性重组位点的新霉素盒的示意图。

[0013] 图 7 显示针对 B 细胞 (抗 -CD19) 和嗜中性粒细胞 (抗 -Ly6G) 的门控的脾细胞的直方图,包括野生型和人 Fc γ RIIIA-IIIB-IIA-IIB-IIIC 纯合子小鼠 (人 Fc γ RIIIA/Fc γ RIIIB/Fc γ RIIA/Fc γ RIIB/Fc γ RIIC HO) 的人 Fc γ RIIB 和人 Fc γ RIIIB 的表达。

[0014] 概述

[0015] 提供了遗传修饰的细胞、非人胚胎、非人动物以及用于产生和使用它们的方法和组合物。在不同的方面,非人动物包含人 Fc γ R 受体、内源低亲和力 Fc γ R 受体的缺失和/或人 Fc γ R 受体在内源小鼠低亲和力 Fc γ R 基因座上对内源 Fc γ R 受体的替代。

[0016] 在一个方面,提供了包含功能性 Fc γ 链的遗传修饰的细胞、非人胚胎和非人动物,其中所述细胞、胚胎和动物包含进一步修饰,包括用一个或多个低亲和力人 Fc γ R 基因序列 (例如,选自 Fc γ RIIA、Fc γ RIIB、Fc γ RIIC、Fc γ RIIIA、Fc γ RIIIB 及其组合) 对低亲和力内源非人 Fc γ R 基因序列 (例如,Fc γ RIIB、Fc γ RIV 和 Fc γ RIII) 的替代。

[0017] 在一个实施方案中,细胞、非人胚胎和非人动物为鼠。在一个实施方案中,功能性 Fc γ 链为小鼠 Fc γ 链。在一个实施方案中,小鼠 Fc γ 链为对于小鼠、细胞或胚胎而言是内源性的 Fc γ 链。

[0018] 在一个实施方案中,细胞、胚胎和动物为小鼠,并且小鼠表达人低亲和力 Fc γ R 受体的功能性 α 链和功能性内源小鼠 γ 链。

[0019] 在一个方面,提供了遗传修饰的小鼠,其中小鼠不表达选自 Fc γ RIIB α 链、Fc γ RIV α 链、Fc γ RIII α 链及其组合的内源 α 链;其中小鼠表达功能性内源小鼠 γ 链。

[0020] 在具体的实施方案中,小鼠不表达功能性 Fc γ RIIB α 链,不表达功能性 Fc γ RIV α 链,并且不表达功能性 Fc γ RIII α 链。

[0021] 在一个实施方案中,小鼠基因组包含内源 Fc γ RIIB α 链的缺失、内源 Fc γ RIV α 链的缺失和内源 Fc γ RIII α 链的缺失。

[0022] 在一个实施方案中,小鼠包括内源 Fc γ RIIB α 链的缺失、内源 Fc γ RIV α 链的缺失和内源 Fc γ RIII α 链的缺失,并且还包括与野生型小鼠对于相同抗原的能力相比较减小的对抗原产生免疫应答的能力。在一个实施方案中,减小的免疫应答包括减小的抗体依赖性细胞介导的细胞毒性 (ADCC)。在一个实施方案中,减小的免疫应答包括在细胞杀伤测定中减小的实现抗体依赖性 NK 细胞杀伤的能力。在具体的实施方案中,ADCC 或抗体依赖性 NK 细胞杀伤的减小为至少 50%,在一个实施方案中是至少 75%,在一个实施方案中是至少 90%。

[0023] 在一个实施方案中,小鼠包含内源 Fc γ RIIB α 链的缺失、内源 Fc γ RIV α 链的缺失和内源 Fc γ RIII α 链的缺失,以及还包括在用抗原免疫后与野生型小鼠例如不包含缺失的相同或相似品系的小鼠相比较,增强的体液抗体应答。在一个实施方案中,增强的体液抗体应答为野生型小鼠的 2 倍。在一个实施方案中,增强的体液抗体应答为野生型小鼠的 3 倍。在一个实施方案中,增强的体液抗体应答为野生型小鼠的 5 倍。在一个实施方案中,增强的体液抗体应答为野生型小鼠的 7 倍。在一个实施方案中,增强的体液抗体应答为野生型小鼠的 10 倍。在具体的实施方案中,体液抗体应答通过每微克小鼠的血清蛋白特异性结合抗原(已用其免疫小鼠的)的抗体的微克数来测量。在一个实施方案中,增强的体液抗体应答是就野生型小鼠对其展示耐受性的抗原或野生型小鼠对其展示较弱或最小的体液免疫应答的抗原而言的。在具体的实施方案中,抗原是小鼠抗原。在具体的实施方案中,抗原是展示与小鼠蛋白具有至少约 95%、96%、97%、98% 或 99% 的同一性的人抗原。

[0024] 在一个方面,提供了包含低亲和力人 Fc γ R α 链基因对低亲和力小鼠 Fc γ R α 链基因的替代的遗传修饰的小鼠,其中所述替代在内源小鼠 Fc γ R α 链基因基因座上。在一个实施方案中,低亲和力小鼠 Fc γ R α 链基因选自 Fc γ RIIB、Fc γ RIV 和 Fc γ RIII α 链基因。在具体的实施方案中,提供了遗传修饰的小鼠,其中所述小鼠表达内源 FcR γ 链,并且其中低亲和力人 Fc γ R α 链基因为 Fc γ RIII α 链。在另一个具体的实施方案中,遗传修饰的小鼠在 NK 细胞上表达内源 FcR γ 链和功能性人 Fc γ RIII α 链。在具体的实施方案中,NK 细胞上的 Fc γ RIII α 链的功能性反映在人抗体介导的 NK 杀伤(例如,由人抗体介导的 ADCC)。

[0025] 在一个方面,提供了遗传修饰的细胞、非人胚胎或非人动物,其中所述遗传修饰包括人 Fc γ R α 链基因对至少一个内源低亲和力 Fc γ R α 链基因的替代,并且所述细胞、胚胎或动物表达功能性 FcR γ 链。在一个实施方案中,功能性 FcR γ 链为内源 FcR γ 链。在一个实施方案中,低亲和力人 Fc γ R α 链基因选自 Fc γ RIIA α 链基因、Fc γ RIII α 链基因及其组合。在具体的实施方案中,人 Fc γ RIIA 基因包含多态性,其中多态性选自 131His 低应答者多态性和 131Arg 高应答者多态性。在具体的实施方案中,Fc γ RIIA 多态性为 131His 低应答者多态性。在一个实施方案中,Fc γ RIII α 基因为特定等位基因变体,其中等位基因变体选自 158Val 变体和 158Phe 变体。在具体的实施方案中,Fc γ RIII α 等位基因变体为 158Val 变体。

[0026] 在一个实施方案中,低亲和力人 Fc γ R 基因选自 Fc γ RIIB、Fc γ RIIC、Fc γ RIIIB 基因及其组合。在具体的实施方案中,人 Fc γ RIIB 基因包含氨基酸置换,其中所述置换选自 232Ile 或 232Thr 置换。在另一个具体的实施方案中,氨基酸置换为 232Ile 置换。在具体的实施方案中,Fc γ RIIIB 基因为特定等位基因变体,其中所述等位基因变体选自 NA1 变体和 NA2 变体。在另一个具体的实施方案中,Fc γ RIIIB 等位基因变体为 NA2 变体。

[0027] 在一个实施方案中,低亲和力人 Fc γ R α 链基因选自 Fc γ RIIA、Fc γ RIIB、Fc γ RIIC、Fc γ RIII α 、Fc γ RIIIB α 链基因及其组合。

[0028] 在一个实施方案中,低亲和力小鼠 Fc γ RIV α 链基因和 Fc γ RIII α 链基因被至少一个低亲和力人 Fc γ R α 链基因替代。在一个实施方案中,低亲和力小鼠 Fc γ RIV α 链基因和 Fc γ RIIB α 链基因被至少一个低亲和力人 Fc γ R α 链基因替代。在一个实施方案中,低亲和力小鼠 Fc γ RIIB α 链基因和 Fc γ RIII α 链基因被至少一个低亲和力人 Fc γ R α

链基因替代。在具体的实施方案中,至少一个低亲和力人 $Fc\gamma R\alpha$ 链基因选自 $Fc\gamma RIIA$ 、 $Fc\gamma RIIB$ 、 $Fc\gamma RIIC$ 、 $Fc\gamma RIIIA$ 、 $Fc\gamma RIIIB\alpha$ 链基因及其组合。在另一个具体的实施方案中,至少一个低亲和力人 $Fc\gamma R\alpha$ 链基因选自 $Fc\gamma RIIA\alpha$ 链基因、 $Fc\gamma RIIIA\alpha$ 链基因及其组合。在另一个具体的实施方案中,至少一个低亲和力人 $Fc\gamma R\alpha$ 链基因选自 $Fc\gamma RIIB$ 、 $Fc\gamma RIIC$ 、 $Fc\gamma RIIIB\alpha$ 链基因及其组合。在另一个具体的实施方案中,低亲和力小鼠 $Fc\gamma R$ 基因被人 $Fc\gamma RIIA\alpha$ 链基因和人 $Fc\gamma RIIIA\alpha$ 链基因替代。在另一个具体的实施方案中,低亲和力人 $Fc\gamma RIIA$ 和 $Fc\gamma RIIIA\alpha$ 链基因包含变体,其中 $Fc\gamma RIIA\alpha$ 链基因包含 131His 变体并且 $Fc\gamma RIIIA\alpha$ 链基因包含 158Val 变体。在另一个具体的实施方案中,低亲和力小鼠 $Fc\gamma R\alpha$ 链基因被下列低亲和力人 $Fc\gamma R\alpha$ 链基因替代: $Fc\gamma RIIB$ 、 $Fc\gamma RIIC$ 和 $Fc\gamma RIIIB$ 。在另一个具体的实施方案中,低亲和力人 $Fc\gamma RIIB\alpha$ 链基因和 $Fc\gamma RIIIB\alpha$ 链基因包含变体,其中 $Fc\gamma RIIB\alpha$ 链基因包含 232Ile 变体并且 $Fc\gamma RIIIB\alpha$ 链基因包含 NA2 变体。

[0029] 在一个实施方案中,遗传修饰包括小鼠和人染色体 1 的共线 (syntenic) 基因组序列的替代。在具体的实施方案中,遗传修饰包括:包含低亲和力人 $Fc\gamma R$ 基因的基因组片段对包含内源低亲和力小鼠 $Fc\gamma R$ 基因的基因组片段的替代。在另一个具体的实施方案中,来自染色体 1:172,889,983 至染色体 1:172,989,911 的小鼠基因组被包含人染色体 1:161,474,729 至染色体 1:161,620,458 的人基因组片段替代。

[0030] 在一个方面,提供了遗传修饰的细胞、非人胚胎或非人动物,其中遗传修饰包括一个或多个内源低亲和力受体 α 链基因的敲除、包含一个或多个人 $Fc\gamma R\alpha$ 链基因的附加体的存在。在具体的实施方案中,所述细胞、胚胎或动物表达功能性 $FcR\gamma$ 链。在具体的实施方案中,附加体为微小染色体。在一个实施方案中,功能性 $FcR\gamma$ 链对于所述细胞、胚胎或动物是内源的。

[0031] 在一个方面,提供了遗传修饰的小鼠,包括用低亲和力人 $Fc\gamma R\alpha$ 链基因替代低亲和力小鼠 $Fc\gamma R\alpha$ 链基因,小鼠包含小鼠 $FcR\gamma$ 链基因,并且小鼠表达功能性人低亲和力 $Fc\gamma R$ 受体。在一个实施方案中,功能性低亲和力 $Fc\gamma R$ 受体在其中低亲和力 $Fc\gamma R$ 受体在人中表达的细胞类型上表达。在具体的实施方案中,功能性人低亲和力 $Fc\gamma R$ 受体为 $Fc\gamma RIIIA$ 并且 $Fc\gamma RIIIA$ 在 NK 细胞上表达。

[0032] 在一个实施方案中,小鼠包含两个小鼠 $Fc\gamma R\alpha$ 链基因的缺失。在另一个实施方案中,小鼠包含 3 个小鼠 $Fc\gamma R\alpha$ 链基因的缺失。

[0033] 在一个实施方案中,小鼠包括用至少 1 个人 $Fc\gamma R\alpha$ 链基因对 3 个小鼠 $Fc\gamma R\alpha$ 链基因的替代。在另一个实施方案中,小鼠包括用至少 1 个 $Fc\gamma R\alpha$ 链基因对 2 个小鼠 $Fc\gamma R\alpha$ 链基因的替代。在具体的实施方案中,小鼠包括用至少 2 个人 $Fc\gamma R\alpha$ 链基因对 3 个小鼠 $Fc\gamma R\alpha$ 链基因的替代。在另一个具体的实施方案中,用 3 个人 $Fc\gamma R\alpha$ 链基因替代 3 个小鼠 $Fc\gamma R\alpha$ 链基因。在另一个具体的实施方案中,小鼠包括用至少 2 个人 $Fc\gamma R\alpha$ 链基因对 2 个小鼠 $Fc\gamma R\alpha$ 链基因的替代。在另一个具体的实施方案中,用至少 3 个人 $Fc\gamma R\alpha$ 链基因替代 2 个小鼠 $Fc\gamma R\alpha$ 链基因。

[0034] 在一个实施方案中,低亲和力小鼠 $Fc\gamma R\alpha$ 链基因选自 $Fc\gamma RIIB$ 、 $Fc\gamma RIV$ 、 $Fc\gamma RIII\alpha$ 链基因及其组合。

[0035] 在一个实施方案中,低亲和力人 $Fc\gamma R\alpha$ 链基因选自 $Fc\gamma RIIA$ 、 $Fc\gamma RIIB$ 、

Fc γ RIIC、Fc γ RIIIA、Fc γ RIIIB α 链基因及其组合。在一个实施方案中,低亲和力人 Fc γ R α 链基因选自 Fc γ RIIA、**Fc γ RIIIA α** 链基因及其组合。在一个实施方案中,低亲和力人 Fc γ R α 链基因选自 Fc γ RIIB、Fc γ RIIC、Fc γ RIIIB α 链基因及其组合。

[0036] 在一个实施方案中,用至少 1 个人 Fc γ R α 链基因替代低亲和力小鼠 Fc γ RIV α 链基因和 Fc γ RIII α 链基因。在一个实施方案中,用至少 1 个人 Fc γ R α 链基因替代低亲和力小鼠 Fc γ RIV α 链基因和 Fc γ RIIB α 链基因。在一个实施方案中,用至少 1 个人 Fc γ R α 链基因替代低亲和力小鼠 Fc γ RIIB α 链基因和 Fc γ RIIIB α 链基因。在具体的实施方案中,至少 1 个人 Fc γ R α 链基因选自 Fc γ RIIA、Fc γ RIIB、Fc γ RIIC、Fc γ RIIIA、Fc γ RIIIB α 链基因及其组合。在另一个具体的实施方案中,至少 1 个人 Fc γ R α 链基因选自 Fc γ RIIA、Fc γ RIIIA α 链基因及其组合。在另一个具体的实施方案中,至少 1 个人 Fc γ R α 链基因选自 Fc γ RIIB、Fc γ RIIC、Fc γ RIIIB α 链基因及其组合。在另一个具体的实施方案中,用下列人 Fc γ R α 链基因 :Fc γ RIIA 和 Fc γ RIIIA 替代小鼠 α 链基因。在另一个具体的实施方案中,用下列人 Fc γ R α 链基因 :Fc γ RIIB、Fc γ RIIC 和 Fc γ RIIIB 替代小鼠 α 链基因。

[0037] 在一个方面,提供了包含低亲和力人 Fc γ R α 链和小鼠 FcR γ 链亚基的遗传修饰的小鼠,其中所述小鼠在选自嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、单核细胞、巨噬细胞、血小板、朗格汉斯细胞、树突细胞、NK 细胞、肥大细胞、B 细胞、T 细胞及其组合的细胞上表达人 Fc γ R α 链。在一个实施方案中,小鼠在选自嗜中性粒细胞、巨噬细胞、嗜酸性粒细胞、血小板、树突细胞、朗格汉斯细胞及其组合的细胞上表达人 Fc γ RIIA α 链。在一个实施方案中,小鼠能够进行通过表达的人 **Fc γ RIIA α** 链起始或介导的吞噬作用、ADCC 和细胞活化。在一个实施方案中,小鼠表达在选自巨噬细胞、NK 细胞、单核细胞、肥大细胞、嗜酸性粒细胞、树突细胞、朗格汉斯细胞、至少一种 T 细胞类型及其组合的细胞上表达人 Fc γ RIIIA α 链。在一个实施方案中,小鼠能够进行通过在 NK 细胞上表达的人 **Fc γ RIIIA α** 链介导的 ADCC。在具体的实施方案中,小鼠展示响应于包含人 Fc 的抗体的 hFc γ RIIIA- 介导的 ADCC。

[0038] 在一个实施方案中,小鼠表达人 Fc γ RIIA α 链和人 Fc γ RIIIA α 链。在一个实施方案中,人 Fc γ RIIA α 链在血小板上表达并且人 Fc γ RIIIA α 链在 NK 细胞上表达。在一个实施方案中,小鼠能够进行由包含人 Fc 的抗体介导的 ADCC,其中所述介导通过在辅助细胞表面上表达的人 Fc γ RIIA α 链或人 Fc γ RIIIA α 链来进行。在一个实施方案中,人 Fc γ RIIA α 链不在血小板上表达。在其中人 Fc γ RIIA α 链不在血小板上表达的具体实施方案中,小鼠缺失或实质上缺失可操作地连接于人基因组中的人 Fc γ RIIA α 链的人启动子序列。

[0039] 在一个实施方案中,小鼠在选自 B 细胞、肥大细胞、嗜碱性粒细胞、巨噬细胞、嗜酸性粒细胞、嗜中性粒细胞、树突细胞、朗格汉斯细胞及其组合的细胞上表达人 Fc γ RIIB α 链。在具体的实施方案中,小鼠在 B 细胞和肥大细胞上表达人 Fc γ RIIB α 链。在另一个具体的实施方案中,小鼠能够进行通过表达的人 Fc γ RIIB α 链介导的免疫复合物的吞噬作用。在一个实施方案中,小鼠在选自嗜中性粒细胞、巨噬细胞、嗜酸性粒细胞、血小板、树突细胞、朗格汉斯细胞及其组合的细胞上表达人 Fc γ RIIC α 链。在具体的实施方案中,小鼠

能够进行通过表达的人 Fc γ RIIC α 链启始的吞噬作用、ADCC 和细胞活化。

[0040] 在一个实施方案中,小鼠在嗜中性粒细胞和嗜酸性粒细胞上表达人 **Fc γ RIIB α** 链。在具体的实施方案中,小鼠能够进行细胞活化、吞噬作用、ADCC 和脱粒,其中活化、吞噬作用、ADCC 和脱粒通过表达的人 **Fc γ RIIB α** 链介导。

[0041] 在一个方面,提供了包含内源 Fc γ RIIB、Fc γ RIV 和 Fc γ RIII 基因的缺失和人 Fc γ RIIA、Fc γ RIIB、Fc γ RIIC、Fc γ RIIIA 和 Fc γ RIIIB 基因的插入的小鼠,其中所述小鼠包含功能性小鼠 FcR γ 链基因。

[0042] 在一个实施方案中,小鼠包含由内源 Fc γ RIIB、Fc γ RIV 和 Fc γ RIII 基因编码的 α 链的缺失和由人 Fc γ RIIA、Fc γ RIIB、Fc γ RIIC、Fc γ RIIIA 和 Fc γ RIIIB 基因编码的 α 链的插入。

[0043] 在一个实施方案中,人 Fc γ RIIA、Fc γ RIIB、Fc γ RIIC、Fc γ RIIIA 和 Fc γ RIIIB α 链基因的插入位于小鼠基因组的随机位置。

[0044] 在一个实施方案中,人 Fc γ RIIA、Fc γ RIIB、Fc γ RIIC、Fc γ RIIIA 和 Fc γ RIIIB α 链基因的插入位于内源小鼠低亲和力 Fc γ R α 链基因座。

[0045] 在一个实施方案中,小鼠在 NK 细胞和巨噬细胞上表达人 Fc γ RIIIA。在具体的实施方案中,来自小鼠的脾细胞样品的所有或大体上所有 NK 细胞表达人 Fc γ RIIIA。在具体的实施方案中,来自小鼠的脾细胞样品的所有或大体上所有巨噬细胞表达人 Fc γ RIIIA。

[0046] 在一个实施方案中,小鼠在选自嗜中性粒细胞、巨噬细胞及其组合的细胞类型上表达选自人 Fc γ RIIA、人 Fc γ RIIIA 及其组合的人 Fc γ R。在具体的实施方案中,小鼠在小鼠的脾细胞样品的全部或大体上全部嗜中性粒细胞和巨噬细胞上表达人 Fc γ RIIA 和人 Fc γ RIIIA。

[0047] 在一个实施方案中,小鼠在来自小鼠的 B 细胞门控的脾细胞样品的 B 细胞和 B 细胞的嗜中性粒细胞上表达人 Fc γ RIIB 和人 Fc γ RIIIB。在具体的实施方案中,小鼠在来自小鼠的 B 细胞门控的脾细胞样品的全部或大体上全部 B 细胞和嗜中性粒细胞上表达 Fc γ RIIIB 和 Fc γ RIIB。

[0048] 在一个实施方案中,小鼠还包含人源化 CD20 基因。在一个实施方案中,还包含人源化 CD20 基因的小鼠在用包含 Fc 的抗-CD20 结合蛋白处理后展示 B 细胞的(体内)耗尽。在一个实施方案中,所述耗尽存在于选自骨髓、血液、淋巴结、脾及其组合的区室中。在一个实施方案中,Fc 为人 Fc。在一个实施方案中,Fc 为小鼠 Fc。在一个实施方案中,抗-CD20 结合蛋白为抗-CD20 抗体。

[0049] 在一个方面,提供了包含本文中描述的遗传修饰的细胞。在一个实施方案中,所述细胞选自胚胎干细胞(ES)、多能细胞、诱导的多能细胞和全能细胞。在一个实施方案中,细胞选自小鼠细胞和大鼠细胞。在具体的实施方案中,细胞为 ES 细胞。在更具体的实施方案中,细胞为小鼠 ES 细胞。

[0050] 在一个方面,提供了包含本文中描述的遗传修饰的非人胚胎。在一个实施方案中,非人胚胎选自小鼠胚胎和大鼠胚胎。

[0051] 在一个方面,提供了测定治疗剂的功效的方法。在一个实施方案中,治疗剂为包含人 Fc 的抗体(例如,单、双、三、多特异性的)。在一个实施方案中,治疗剂为人抗体。在一

个实施方案中,功效为治疗剂介导的细胞杀伤(例如,ADCC)的功效。在具体的实施方案中,人治疗剂是包含人免疫球蛋白重链的Fc的融合蛋白。在一个实施方案中,给本文中描述的小鼠施用治疗剂并且测量治疗剂依赖性ADCC的水平。在一个实施方案中,通过给小鼠施用治疗剂,随后检测(例如,从获自动物的样品(例如,血液)进行体外检测)治疗剂对表达Fc γ R的细胞上的人低亲和力Fc γ R的结合来将小鼠用于评估治疗剂的ADCC活性。在具体的实施方案中,从小鼠分离小鼠的辅助细胞,并且测试其在治疗剂存在和不存在的条件下介导治疗剂依赖性ADCC的能力。

[0052] 在一个方面,提供了用于确定低亲和力Fc γ R是否与人疾病或障碍相关的方法,包括测定根据本发明的小鼠的与人疾病或障碍相关的性状的步骤。在一个实施方案中,所述性状为与一个或多个低亲和力Fc γ R的功能的不存在或丧失相关的表型。在具体的实施方案中,疾病或障碍为自身免疫疾病或障碍。在具体的实施方案中,自身免疫疾病或障碍选自类风湿关节炎(RA)、系统性红斑狼疮(SLE)、I型糖尿病、Guillain-Barré综合征、硬化症、多发性硬化、Goodpasture's综合征、Wegener's肉芽肿病和实验性自身免疫脑脊髓炎(EAE)。在具体的实施方案中,小鼠包含低亲和力Fc γ R中的多态性,并且性状选自与大部分不具有多态性的人群相比较增强的介导ADCC的能力以及与大部分不具有多态性的人群相比较减小的介导ADCC的能力。

[0053] 在一个方面,提供了用于在小鼠中产生抗-人FcR α 链抗体的方法,包括将根据本发明的小鼠与本文中描述的人FcR接触。在一个实施方案中,识别人的FcR的抗体分离自小鼠。在另一个实施方案中,鉴定和克隆了编码识别人FcR的抗体的全部或部分可变区的核酸序列。

[0054] 在一个方面,提供了用于测定抗-人FcR抗体将分子靶向表达FcR的细胞以吞噬靶分子的能力的方法,包括将本文中描述的小鼠与包含抗-人FcR抗体的试剂接触,并且测量靶分子的吞噬。

[0055] 在一个方面,提供了用于在小鼠中产生针对抗原的抗体的方法,所述抗原在对于一种或多种Fc γ R为野生型的小鼠中具有差的免疫原性,所述方法包括将本文中描述的缺失小鼠低亲和力FcR但表达Fc γ R γ 链的小鼠与在对于一种或多种Fc γ R为野生型的小鼠中具有差免疫原性的抗原接触,并鉴定识别所述差抗原性的抗原的抗体。在一个实施方案中,所述方法包括从小鼠分离抗体。在另一个实施方案中,鉴定和克隆了编码抗体的全部或部分可变区的核酸序列。

[0056] 在一个方面,提供了用于产生能够产生包含人可变区的抗体的小鼠的方法,包括将本文中描述的第一小鼠与第二小鼠交配的步骤,所述第二小鼠包含(a)一个或多个个人免疫球蛋白可变区基因区段和一个或多个个人恒定区基因;或(b)可操作地连接于小鼠恒定区基因的一个或多个个人免疫球蛋白可变区基因区段,其中所述人基因区段在小鼠可变区基因区段的基因座上替代可变区基因区段。

[0057] 在一个实施方案中,第二小鼠(a)包含含有一个或多个个人免疫球蛋白轻链可变区基因区段和人轻链恒定基因的转基因和含有一个或多个个人免疫球蛋白重链可变区基因区段和一个或多个个人重链恒定基因的转基因。在一个实施方案中,包含一个或多个个人免疫球蛋白重链可变区基因区段的转基因包两个或更多个重链恒定基因并且能够进行类别转换(class switching)。在具体的实施方案中,小鼠包含失活的内源轻链基因座和/或失活的

内源重链基因座。在具体的实施方案中,小鼠包含内源轻链基因座的缺失和/或内源重链基因座的缺失。

[0058] 在一个实施方案中,第二小鼠 (b) 分别在小鼠重链和轻链基因座上包含人重链和人轻链可变区基因区段。

[0059] 在一个方面,提供了用于选择抗肿瘤抗体的方法,包括测定抗体介导 ADCC 的能力的步骤,其中通过测定由本文中描述的小鼠的细胞介导的 ADCC 来测试抗体介导 ADCC 的能力,如果抗体利用本文中描述的遗传修饰的小鼠的细胞介导 ADCC,则选择该抗体。在具体的实施方案中,测定抗体对遗传修饰的小鼠的细胞的结合,并且就其结合细胞上的人 Fc γ R 的能力选择抗肿瘤抗体。在具体的实施方案中,人 Fc γ R 为低亲和力 Fc γ R。

[0060] 在一个实施方案中,抗肿瘤抗体通过与抗肿瘤抗体通过野生型小鼠的细胞介导 ADCC 的能力相比较的增强的通过小鼠的细胞介导 ADCC 的能力来进行鉴定。在具体的实施方案中,抗肿瘤抗体通过其通过 NK 细胞介导 ADCC 的能力来进行鉴定。在具体的实施方案中,所述 NK 细胞表达人 Fc γ RIIIA。

[0061] 在一个实施方案中,提供了用于选择抗肿瘤试剂的方法,包括给第一非人动物施用包含人 Fc 或修饰的人 Fc 的试剂的步骤,其中第一非人动物按照本发明进行了遗传修饰并且包含人肿瘤;给包含肿瘤的第二非人动物施用试剂的步骤;和测定第一非人动物和第二非人动物在施用试剂后延缓人肿瘤生长的能力,其中如果试剂在第一非人动物中但非在第二非人动物中展示增强的延缓人肿瘤生长的能力,则其被选择为抗肿瘤试剂。

[0062] 在一个实施方案中,第一非人动物经修饰包含内源 FcR α -亚基的缺失,并且经修饰包含选自 Fc γ RIIA α -亚基、Fc γ RIIB α -亚基、Fc γ RIIC α -亚基、Fc γ RIIIA α -亚基、Fc γ RIIIB α -亚基及其组合的人 FcR α -亚基。在一个实施方案中,第二动物为野生型动物。在一个实施方案中,第一非人动物表达内源 FcR γ 链。

[0063] 在一个实施方案中,第一非人动物表达功能性内源 Fc γ RI。

[0064] 在一个方面,提供了用于产生小鼠的方法,所述小鼠缺失低亲和力小鼠 Fc γ R,表达功能性 FcR γ 链并且包含编码人 Fc γ RIIA、Fc γ RIIB、Fc γ RIIC、Fc γ RIIIA 和 Fc γ RIIIB 的 α 链的基因,包括用人 Fc γ R α 链在小鼠 Fc γ R α 链基因座上替代低亲和力小鼠 Fc γ R α 链的步骤。

[0065] 在一个实施方案中,第一步骤包括缺失内源 Fc γ RIIB、Fc γ RIV 和 Fc γ RIII 基因的 α 链和插入人 Fc γ RIIA 和 Fc γ RIIIA 基因的 α 链;第二步骤包括将人 Fc γ RIIB、Fc γ RIIC 和 Fc γ RIIIB 基因的 α 链插入由第一步骤产生的小鼠的基因组;其中所述小鼠包含功能性小鼠 FcR γ 链基因。在具体的实施方案中,第二步骤的人 Fc γ RIIB、Fc γ RIIC 和 Fc γ RIIIB 基因的 α 链插入在相对于第一步骤的人 Fc γ RIIA 和 Fc γ RIIIA 基因的 α 链的 5'。

[0066] 在一个方面,提供了用于测定人治疗剂在非灵长类动物中的细胞杀伤的方法,包括将细胞、非人胚胎或非人动物与包含人 Fc 的人治疗剂接触的步骤,其中所述细胞、胚胎或动物包含功能性 FcR γ 链并包含一个或多个 Fc γ R α 链对一个或多个内源低亲和力 Fc γ R α 链基因的替代,以及测定人治疗剂通过细胞、胚胎或动物的低亲和力人 Fc γ R 介导细胞杀伤的能力。

[0067] 在一个实施方案中,非灵长类动物为小鼠。在具体的实施方案中,内源小鼠

Fc γ R α 链基因 Fc γ RIIB、Fc γ RIV 和 Fc γ RIII 被人 Fc γ R α 链基因 Fc γ RIIA、Fc γ RIIB、Fc γ RIIC、Fc γ RIIIA 和 Fc γ RIIIB 替代。

[0068] 在一个实施方案中,细胞选自 B 细胞、肥大细胞、嗜碱性粒细胞、巨噬细胞、嗜酸性粒细胞、嗜中性粒细胞、树突细胞、朗格汉斯细胞及其组合。在具体的实施方案中,细胞为 NK 细胞并且测定通过人或人源化抗体产生的 NK 细胞介导的 ADCC。在具体的实施方案中,低亲和力人 Fc γ R 为人 Fc γ RIIIA。

[0069] 在一个方面,提供了用于测定治疗剂依赖性血栓形成的方法,包括将在血小板上表达人 Fc γ RIIA 的第一非人动物与治疗剂接触;将不在血小板上表达人 Fc γ RIIA 的第二非人动物与所述治疗剂接触;在第一非人动物和第二非人动物中测量治疗剂依赖性血栓形成的量;和测定治疗剂依赖性血栓形成的差异。

[0070] 在一个实施方案中,非人动物选自小鼠和大鼠。

[0071] 在一个实施方案中,将治疗剂依赖性血栓形成的测定的差异用于鉴定与向人施用该治疗剂相关的风险。在一个实施方案中,测定的差异导致治疗剂给有此需要的人患者的施用的改变。

[0072] 发明详述

[0073] 本发明不限于描述的特定方法和实验条件,因为这样方法和条件可改变。本文中使用的术语仅为了描述特定的实施方案,无意起限制作用,因为本发明的范围将仅由权利要求限定。

[0074] 除非另外定义,否则本文中使用的全部技术和科学术语具有与本发明所属领域内的技术人员通常理解的相同的含义。虽然与本文中描述的方法和材料相似或等同的任何方法和材料可用于实施或测试本发明,但现在描述特定的方法和材料。本文中提及的所有出版物通过引用方式全文并入本文。

[0075] 短语“靶向构建体”包括含有靶向区域的多核苷酸分子。靶向区域包含与靶细胞、组织或动物中的序列实质上同源的序列并且提供了靶向构建体至细胞、组织或动物的基因组内的位置的整合。在具体的实施方案中,靶向构建体还包括特定目标核酸序列或基因、选择标记、控制和 / 或调节序列以及允许通过蛋白质的外源添加介导的重组的其它核酸序列,所述蛋白质帮助或促进牵涉这类序列的重组。在另一个具体的实施方案中,靶向构建体还包含目标基因,其中所述目标基因为编码与由内源序列编码的蛋白质具有相似功能的蛋白质的异源基因。

[0076] 除非另外明确地指出,否则术语“替代”包括其中将 DNA 序列以这样的方式置于细胞的基因组内:用异源序列(例如,小鼠中的人序列)在基因组序列的基因座上替代基因组中的序列。这样放置的 DNA 序列可包括作为用于获得这样放置的序列的源 DNA 的一部分的一个或多个调控序列(例如,启动子、增强子、5' - 或 3' - 非翻译区等)。例如,在不同的实施方案中,替代是异源序列对内源序列的置换,该置换导致基因产物从这样放置的 DNA 序列(包括异源序列)产生,但不表达内源序列;替代是用 DNA 序列置换内源基因组序列,所述 DNA 序列编码具有与内源基因组序列编码的蛋白质相似的功能的蛋白质(例如,内源基因组序列编码低亲和力小鼠 Fc γ R 受体,DNA 片段编码一种或多种人低亲和力 Fc γ R 受体,例如 Fc γ RIIC 和 / 或 Fc γ RIIIB)。

[0077] 术语“Fc γ R”包括 Fc、例如 IgG 免疫球蛋白的 Fc 部分的受体。Fc γ R 基因包括

α 链,所述 α 链在细胞表面上表达并且用作配体结合结构域,并与 FcR γ 链的同二聚体或 FcR γ 链与 δ 链的异二聚体结合。存在几种不同的 Fc γ R 基因并且可根据在免疫复合物中与 IgG 的优先结合将它们分成低亲和力和高亲和力类型。人的低亲和力 Fc γ R 基因包括 Fc γ RIIA、Fc γ RIIB、Fc γ RIIC、Fc γ RIIIA 和 Fc γ RIIIB,并且已在患有自身免疫疾病的人受试者中描述了在大多数此类基因内天然存在的遗传差异或多态性。在阅读本公开内容后本领域技术人员将认识到基因组中的一个或多个内源低亲和力 Fc γ R 基因(或全部)可被一个或多个异源低亲和力 Fc γ R 基因(例如,变体或多态性例如等位基因形式、来自另一物种的基因、嵌合形式等)替代。

[0078] 术语“等位基因变体”包括基因的正常序列的变异,其导致同一基因的一系列不同形式。所述不同形式可在来自基因的蛋白质序列中包含至多 20 个氨基酸的差异。例如,等位基因可被理解为相同物理基因基因座上的可选择 DNA 序列,其可以导致或不导致不同的性状(例如,可遗传的表型特征)、例如对某些疾病或病况的易感性,其不导致相同基因的其它等位基因或在不同程度上导致其它等位基因。

[0079] “辅助细胞”包括参与免疫应答的效应子功能的免疫细胞。示例性免疫细胞包括淋巴样或骨髓样来源的细胞,例如淋巴细胞、天然杀伤(NK)细胞、单核细胞、巨噬细胞、中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、血小板、朗格汉斯细胞、树突细胞、肥大细胞等。辅助细胞通过在它们的表面上表达的受体例如 FcR 进行免疫系统的特定功能。在具体的实施方案中,辅助细胞能够触发通过在细胞表面上表达的 FcR 例如低亲和力 Fc γ R 介导的 ADCC。例如,表达 FcR 的巨噬细胞参与吞噬作用和破坏抗体包被的细菌。辅助细胞还可能释放介导其它免疫过程的试剂。例如,肥大细胞可被结合至 FcR 的抗体激活以在感染的部位释放颗粒例如炎症分子(例如,细胞因子)。在不同的其它实施方案中,FcR 在辅助细胞上的表达可受其它因子(例如,细胞因子)调节。例如,Fc γ RI 和 Fc γ RIII 表达可通过利用干扰素- γ (IFN- γ) 的刺激诱导。

[0080] 小鼠和人 FcR

[0081] 免疫球蛋白的 Fc 区(即,恒定区)的受体(FcR)在免疫应答的调节中起着重要作用。FcR 存在于宿主免疫系统的辅助细胞上以有效地除去被抗体结合的外源抗原。FcR 也在平衡免疫系统的辅助细胞的激活和抑制应答中起着重要作用。FcR 参与巨噬细胞的吞噬作用、肥大细胞的脱粒、抗体-抗原复合物的摄取和免疫应答的调节以及其它免疫系统过程。

[0082] 在小鼠和人中,不同的 FcR 在不同辅助细胞的表面上差异性表达,所述辅助细胞各自对于存在于表达的抗体库中的免疫球蛋白同种型是特异性的。例如,免疫球蛋白 G(IgG) 抗体通过 IgG 受体(Fc γ R) 介导效应子功能。Fc γ R 已被分成 3 类:高亲和力激活性 Fc γ RI(CD64)、低亲和力抑制性 Fc γ RII(CD32) 和低亲和力激活性 Fc γ RIII(CD16)。虽然每一类都存在于小鼠和人中,但它们所存在于的免疫细胞的同种型和亚组的数目不同。例如,Fc γ RIIA 和 Fc γ RIIIB 在人的辅助细胞上表达但据报道不存在于小鼠中。此外,不同 IgG 同种型(例如,IgG1) 对每一种 Fc γ R 的亲和力在人和小鼠中不同。

[0083] 通过 Fc γ R 的细胞信号转导的激活或抑制和与抗体对 Fc γ R 的结合相关的效应子功能据认为由 Fc γ R 的细胞内结构域的特定序列基序或共受体(co-receptor) 的亚基的特定序列基序介导。激活受体最常见地与包含免疫受体酪氨酸活化基序(ITAM) 的常见 γ 链(FcR γ 链) 相关。ITAM 包含约 9-12 个氨基酸的特定序列,该序列包括响应

于抗体对 FcR 的结合而被磷酸化的酪氨酸残基。磷酸化导致信号转导级联。已报道了缺失编码 FcR γ 链的基因的小鼠 (FcR γ 链 KO) (例如, 参见 Takai 等人 (1994) FcR γ chain Depletion Results in Pleiotrophic Effector Cell Defects, *Cell* 76:519-529; van Vugt 等人 (1996) FcR γ -chain Is Essential for Both Surface Expression and Function of Human Fc γ RI (CD64) In Vivo, *Blood* 87(9):3593-3599; 和 Park 等人 (1998) Resistance of Fc Receptor-deficient Mice to Fatal Glomerulonephritis, *J. Clin. Invest.* 102(6):1229-1238)。FcR γ 链据报道为大多数 FcR 的正确表面表达和功能 (例如, 信号转导、吞噬作用等) 所必需的; 根据一些报道 FcR γ 链 KO 小鼠缺失 Fc γ RI。然而, 其它报道显示 FcR γ 链 KO 小鼠确实在某些辅助细胞的表面上表达 Fc γ RI, 并且表达的 Fc γ RI 据报道显示具有功能, 功能在于其在表达的 FcR γ 链不存在的情况下在小鼠中结合 IgG (Barnes 等人 (2002) Fc γ RI-Deficient Mice Show Multiple Alterations to Inflammatory and Immune Responses, *Immunity* 16:379-389)。

[0084] 相反地, Fc γ RIIB 是在其细胞质结构域中包含免疫受体基于酪氨酸的抑制性基序 (ITIM) 的抑制性受体。与 ITAM 一样, ITIM 是包含可磷酸化的酪氨酸残基的序列基序。然而, 在 ITIM 的磷酸化后的下游事件导致免疫细胞功能的抑制而非激活。Fc γ RIIB 缺陷型小鼠据报道展示与野生型小鼠相比较增强的抗体应答 (Takai 等人 (1996) Augmented humoral and anaphylactic responses in Fc γ RII-deficient mice, *Nature* 379:346-349), 此为支持 Fc γ RIIB 作为 B 细胞抗体应答的下游调节剂的观察。

[0085] 在人中, Fc γ RIIA、Fc γ RIIB、Fc γ RIIC、Fc γ RIIEA 和 Fc γ RIIEB 被认为是经典低亲和力 Fc γ R 基因并且一起位于相同染色体上 (Su 等人 (2002) Genomic organization of classical human low-affinity Fc γ receptor genes, *Genes and Immunity* 3(Supple 1):S51-S56)。这些基因展示出几个与独特表型例如受体的配体结合和功能的改变相关的多态性。一些多态性与自身免疫疾病例如系统性红斑狼疮 (SLE)、类风湿关节炎 (RA) 和多发性硬化 (MS) 相关。针对不同的人 Fc γ R (hFc γ R) 的转基因小鼠已被开发并且用作疾病模型、产生高亲和力抗体、测试治疗性抗体引发特异性细胞应答的能力、筛选缓解异常免疫应答的化合物 (例如, 参见 Heijnen 等人 (1996) A Human Fc γ RI/CD64 Transgenic Model for InVivo Analysis of (Bispecific) Antibody Therapeutics, *J. Hematother.* 4:351-356; Heijnen 和 van de Winkel (1996) Antigen Targeting to Myeloid-specific Human Fc γ RI/CD64 Triggers Enhanced antibody Responses in Transgenic, *J. Clin. Invest.* 97(2):331-338; 美国专利 No. 6, 111, 166, 6, 676, 927, 7, 351, 875, 7, 402, 728 和 7, 416, 726)。

[0086] 尽管 FcR 在提供免疫系统的抗体与辅助细胞之间的桥梁中起着重要作用, 但目前仍然不存在其中所有低亲和力 hFc γ R 都表达的模型系统。其中所有低亲和力 hFc γ R 共表达的小鼠 (包括缺失内源小鼠 Fc γ R 的小鼠) 在不同的实施方案中可用于精确地反映人抗体治疗剂的效应, 包括 ADCC 介导的效应。这样的小鼠可在用于治疗人疾病例如 RA、I 型糖尿病、SLE 和自身免疫性的治疗性抗体的工程改造、分析和评估中用作至关重要的工具: 提供能够实现人的免疫过程的更精确评估 (特别地在测试人抗体治疗剂的情景中) 的动物模型。小鼠还可以是具有低亲和力受体的细胞的有价值的来源, 所述细胞可在体外测定中用于评估结合低亲和力受体的治疗剂的治疗剂依赖性细胞杀伤, 并因此而被用于鉴定有用的

人治疗剂。

[0087] 内源低亲和力 Fc γ R 基因缺陷型小鼠

[0088] 提供了不表达内源低亲和力小鼠 Fc γ R 基因但表达内源小鼠 FcR γ 链的遗传修饰的非人动物。在不同的实施方案中, FcR γ 链以与野生型小鼠中相同或大体上相同的分布(即,在细胞类型中)和水平在小鼠中表达。内源低亲和力 Fc γ R 基因可在免疫细胞的表面上表达或在动物的周围组织中以可溶性方式表达。用于产生不表达内源低亲和力小鼠 Fc γ R 基因的非人动物的遗传修饰通过使用小鼠为例子来方便地说明。可以以多种方式,特别是实施方案已在本文中进行了描述的方式产生根据本发明的遗传修饰的小鼠。

[0089] 图 1 中(顶部)提供了显示 Fc γ R 基因在内源基因座中的排列的低亲和力小鼠 Fc γ R 基因基因座的示意图(未按比例的)。如图所示,低亲和力小鼠 Fc γ R 基因 Fc γ RIIB、Fc γ RIV 和 Fc γ RIII 一起紧密地存在于一条染色体上。这些基因中的每一个基因包含负责结合抗体分子的 Fc 部分的 α 链或配体结合结构域。

[0090] 缺失编码内源低亲和力 Fc γ R 基因的 α 链的核苷酸序列的遗传修饰的小鼠可通过本领域已知的任何方法来产生。例如,可制备缺失低亲和力小鼠 Fc γ R α 链基因的具有选择标记基因的靶向载体。图 1 举例说明了被靶向构建体靶向的小鼠基因组(底部),所述构建体具有包含内源低亲和力 Fc γ R α 链基因座的上游序列的 5' 同源臂,后接药物选择盒(例如,侧翼连接有 loxP 序列的新霉素抗性基因)和包含内源低亲和力 Fc γ R α 链基因座的下游序列的 3' 同源臂。于基因座上同源重组后,内源低亲和力 Fc γ R α 链基因座被药物选择盒替代(图 1 的底部)。内源低亲和力 Fc γ R α 链基因座因此被缺失,从而产生不表达内源低亲和力小鼠 Fc γ R α 链基因的细胞或非人动物。可作选地通过随后添加重组酶(例如,通过 Cre 处理)除去药物选择盒。

[0091] 在不同实施方案中,遗传修饰小鼠以使内源低亲和力小鼠 Fc γ R α 链基因失去功能,产生展示免疫应答的缺陷的小鼠,从而使得小鼠对于评估内源低亲和力小鼠 Fc γ R 基因在正常和紊乱的免疫功能、IgG- 介导的过程以及自身免疫疾病中的协同以及单独的作用是有用的。在不同的实施方案中,修饰内源低亲和力小鼠 Fc γ R 基因的 α 链但非 FcR γ 链,避免了需要 FcR γ 链以进行表面表达和功能的其它内源 FcR 基因(例如,高亲和力 Fc γ RI)的潜在减少,从而维持通过 γ 链依赖性过程介导的各种其它免疫功能和过程。

[0092] 根据一些方面,FcR γ 链缺陷型小鼠缺失 Fc γ RIII 和 Fc γ RI 的表面表达。然而,已报道在 FcR γ 链缺陷型小鼠的细胞表面上检测到 Fc γ RI,所述 Fc γ RI 据报道具有至少部分功能。相反地,根据本发明的小鼠包含未修饰的内源 FcR γ 链,其保持天然细胞表面表达模式和需要 FcR γ 链的其它 FcR 基因的细胞功能。

[0093] 在不同的实施方案,本发明的小鼠显示了优于其它 Fc γ R 基因-缺陷小鼠的有利方面,所述有利方面在于它们所具有的遗传修饰导致不完全贡献于低亲和力 Fc γ R 基因的其它免疫功能所必需的其它基因的维持。例如,通过功能性 FcR γ 链,其它 γ 链依赖性蛋白(例如,Fc γ RI)将能够与 FcR γ 链结合并且在免疫应答中参与效应细胞功能。在根据本发明的各种遗传修饰的小鼠中,据认为维持此类功能(归因于功能性 FcR γ 链的存在)同时缺失内源低亲和力 Fc γ R 基因(一个或多个 α -亚基)使得能够更精确地阐明 FcR 在自身免疫中的作用。

[0094] 低亲和力 Fc γ R 人源化小鼠

[0095] 提供了表达低亲和力人 Fc γ R 基因的遗传修饰的非人动物。低亲和力人 Fc γ R 基因可在动物免疫系统的辅助细胞的表面上表达或在动物的周围组织中以可溶性方式表达。

[0096] 在不同的实施方案中,遗传修饰包含一个或多个低亲和力小鼠 Fc γ R 基因的功能性 α 链的缺失,并且在一些实施方案中包含含有以两个或更多个、三个或更多个、四个或更多个或五个低亲和力人 Fc γ R α 亚基基因的替代的其它修饰,其中非人动物表达功能性小鼠 FcR γ 链基因。还提供了遗传修饰的非人胚胎、细胞和用于产生非人动物、非人胚胎和细胞的靶向构建体。

[0097] 提供了用于制备表达人 Fc γ R 基因(包括特定多态性形式或等位基因变体(例如,单个氨基酸的差异))的小鼠的组合物和方法,包括用于制备从人启动子和人调控序列表达此类基因的的小鼠的组合物和方法。所述方法包括选择性地使内源低亲和力小鼠 Fc γ R 基因失去功能(例如,通过其 α 链的缺失)以及在内源低亲和力小鼠 Fc γ R 基因的基因座上利用低亲和力人 Fc γ R 基因的 α 链在小鼠中表达低亲和力人 Fc γ R α -亚基基因。通过缺失一个或多个 α 链基因但非 FcR γ 链基因来产生低亲和力小鼠 Fc γ R 基因的缺失。所述方法选择性地使一个或多个内源低亲和力 Fc γ R α 链基因失去功能而同时保留功能性内源 FcR γ 链。

[0098] 在不同的实施方案中,内源 Fc γ R α 链替代方法对动物中的天然 Fc γ R 介导的信号转导产生的破坏相对最小,因为 Fc γ R α 链的基因组序列在单个片段中被替代,从而通过包含必需调控序列保留正常功能性。因此在这样的实施方案中,Fc γ R α 链修饰不影响其它依赖于功能性 FcR γ 链分子的内源 FcR。此外,在不同实施方案中,修饰不影响包括 Fc γ R α 链和内源 FcR γ 链的功能性受体复合物的装配,所述复合物据认为是一些 Fc γ R α 链在细胞表面上的正确表达以及由激活的受体产生的下游信号转导所需要的。因为 FcR γ 链未缺失,在不同实施方案中,包含人 Fc γ R α 链基因对内源 Fc γ R α 链基因的替代的动物应当能够通过 IgG 免疫球蛋白的 Fc 部分对存在于辅助细胞表面上的人 Fc γ R α 链的结合来处理来自抗体的正常效应子功能。

[0099] 在图 4 中(上部)提供了缺失的内源低亲和力小鼠 Fc γ R 基因的示意图(未按比例的)。如图所示,通过用包含人低亲和力人 Fc γ R α 和 Fc γ R β 基因的基因组片段以靶向构建体(人 Fc γ R α - β 靶向载体)将人低亲和力人 Fc γ R 基因 Fc γ R α 和 Fc γ R β 插入缺失的内源低亲和力小鼠 Fc γ R 基因的基因座。这些基因的每一个基因包含负责结合抗体分子的 Fc 部分的人 Fc γ R 基因的 α 链或配体结合结构域。

[0100] 在内源低亲和力小鼠 Fc γ R 基因座上表达低亲和力人 Fc γ R 基因的遗传修饰的小鼠可通过本领域内已知的任何方法来制图。例如,可制备引入低亲和力人 Fc γ R 基因(例如,Fc γ R α 和 Fc γ R β) 和选择标记基因的靶向载体。图 4(顶部)举例说明了包含内源低亲和力 Fc γ R 基因座的缺失的小鼠基因组。如图所示,靶向构建体包含含有内源低亲和力小鼠 Fc γ R 基因座的上游序列的 5' 同源臂、后接药物选择盒(例如,两侧连接有 loxP 序列的潮霉素抗性基因)、包含人 Fc γ R α 基因、人 HSP76 基因和人 Fc γ R β 基因的基因组片段以及包含内源低亲和力小鼠 Fc γ R 基因座的下游序列的 3' 同源臂。于缺失的基因座上同源重组后,药物选择盒被包含在靶向载体中的序列替代(图 4 的底部)。内源低亲和力 Fc γ R 基因基因座因此被低亲和力人 Fc γ R 基因替代,产生表达低亲和力人 Fc γ R 基因的细胞或动物。可任选地通过随后添加重组酶(例如,通过 Cre 处理)除去药物选择盒。

[0101] 为了在血小板上表达 hFc γ RIIA, 靶向构建体人 hFc γ RIIA-IIA 靶向载体包含延长的序列, 该序列包括例如与人基因组中的 hFc γ RIIA 基因可操作地连接的全部或大体上全部人启动子区域。为了阻止 hFc γ RIIA 在血小板上表达, 靶向构建体缺失可操作地连接于人的 hFc γ RIIA 基因的全部或大体上全部启动子区域。

[0102] 可使用对于利用两个人 Fc γ R 基因的替代所描述的相似技术实现对嵌合基因座的其它修饰 (图 4 的底部)。用两个人 Fc γ R 基因替代内源低亲和力 Fc γ R 基因基因座的修饰还可提供用于整合其它低亲和力人 Fc γ R 基因的起始点。例如, 图 6 (顶部) 中提供了用两个人低亲和力 Fc γ R 基因替代的内源低亲和力 Fc γ R 基因座的示意图 (未按比例的)。如图所示, 通过另一个具有包含低亲和力人 Fc γ RIIB、Fc γ RIIC 和 Fc γ RIIIB 基因的基因组片段的靶向构建体 (人 Fc γ RIIB-IIIB-IIC 靶向载体) 将低亲和力人 Fc γ R 基因 Fc γ RIIB、Fc γ RIIC 和 Fc γ RIIIB 插入修饰的内源低亲和力小鼠 Fc γ R 基因的基因座。这些基因的每一个基因包含负责结合抗体分子的 Fc 部分的人 Fc γ R 基因的 α 链或配体结合结构域。

[0103] 在内源低亲和力小鼠 Fc γ R 基因座上表达 5 个低亲和力人 Fc γ R 基因的遗传修饰的小鼠可通过本领域已知的任何方法来产生。例如, 可制备引入低亲和力人 Fc γ R 基因 (例如, Fc γ RIIB、Fc γ RIIC 和 Fc γ RIIIB) 的具有选择标记基因的靶向载体。图 6 (顶部) 举例说明了包含以 2 个低亲和力人 Fc γ R 基因对内源低亲和力 Fc γ R 基因座的替代的小鼠基因组。如图所示, 靶向构建体包含含有内源低亲和力小鼠 Fc γ R 基因座的上游序列的 5' 同源臂、后接药物选择盒 (例如, 两侧连接有 loxP 序列的新霉素抗性基因)、包含人 Fc γ RIIB 基因、人 Fc γ RIIIB、人 HSP77 基因、人 Fc γ RIIC 基因的基因组片段, 后跟含有存在于内源基因座上的低亲和力人 Fc γ RIIA 基因的下游序列的 3' 同源臂。于修饰的基因座上同源重组后, 人 Fc γ RIIB、Fc γ RIIIB 和 Fc γ RIIC 基因通过靶向载体中包含的序列被插入先前存在于内源低亲和力 Fc γ R 基因基因座上的人 Fc γ RIIA 和 Fc γ RIIA 基因的 5' (图 6 的底部)。因此对修饰的内源低亲和力 Fc γ R 基因基因座进一步修饰以整合 3 个额外的低亲和力人 Fc γ R 基因, 从而产生表达 5 个低亲和力人 Fc γ R 基因的细胞或动物。药物选择盒可任选通过随后添加重组酶 (例如, 通过 Cre 处理) 来除去。图 6 (底部分) 显示所得的基因座的结构, 其将表达可在动物的免疫系统的辅助细胞的表面上检测到的并且适当与内源 FcR γ 链独立结合的 5 个低亲和力人 Fc γ R 基因。

[0104] Fc γ R 缺陷型小鼠和 Fc γ R 人源化小鼠的实验模型

[0105] 不表达内源低亲和力小鼠 Fc γ R 基因的遗传修饰的非人动物是有用的, 其用于例如阐明单个低亲和力 Fc γ R 基因在免疫应答中的各种功能、通过细胞介导的免疫 (例如, ADCC) 测量人治疗性抗体的功效、测定 Fc γ R 在免疫疾病或障碍中的作用、用作免疫疾病或障碍的模型、产生抗一种或多种 Fc γ R 蛋白的抗体、以及用作产生其它目标遗传修饰的小鼠的交配配偶。

[0106] 在一个实施方案中, 根据本发明的小鼠可用于通过给不表达低亲和力 Fc γ R 基因的小鼠施用试剂来测定这样的小鼠的细胞毒性效应的丧失 (与野生型小鼠相比较), 其中已知所述试剂在野生型小鼠中触发 Fc γ R- 依赖性细胞毒性效应。在一个实施方案中, 将肿瘤细胞植入本发明的小鼠, 在随后的一段时间后, 用特异于在肿瘤细胞表面上表达的抗原的抗体注射小鼠。抗体的同种型在注射前是已知的并且通过与在野生型动物中观察到的

ADCC 相比较来分析动物的 Fc γ R- 依赖性 ADCC 的减弱。

[0107] 在另一个方面,可将内源低亲和力受体缺陷型小鼠与其它免疫缺陷型小鼠组合(例如,通过交配)以产生自身免疫疾病的体内模型。例如,重症联合免疫缺陷(SCID)小鼠在本领域常规地用作研究免疫系统的模型生物。SCID 小鼠具有受损的产生 T 或 B 淋巴细胞或激活补体系统的一些组分的能力,并且不能高效地抵抗感染、排斥肿瘤和排斥移植物。可将本发明的低亲和力 Fc γ R α - 亚基基因缺陷型小鼠培育成 SCID 小鼠以确定宿主动物响应于抗体治疗剂(例如,抗肿瘤抗体)的施用的细胞耗尽,这可测定 ADCC 和补体依赖的细胞毒性(CDC)在体内肿瘤细胞耗尽中的作用。

[0108] 在另一个方面,提供了包含低亲和力人 Fc γ R 基因对内源低亲和力 Fc γ R 基因的替代的遗传修饰的非人动物。此类动物对于研究完全人抗体和 hFc γ R 介导的 ADCC 的药代动力学是有用的。此外,已显示人 Fc γ R 基因展示与疾病(例如, SLE, RA, Wegener's 肉芽肿病、Guillain-Barré 综合征和多发性硬化)相关的多态性或等位基因变体。因此,包含人 Fc γ R 基因的特定等位基因或多态性形式对内源低亲和力 Fc γ R 基因的替代的遗传修饰的非人动物可用于在动物中研究人自身免疫疾病和与多态性相关的性状。在具体的实施方案中,人 Fc γ R 基因的等位基因形式与对于人 IgG 的增强的功效相关。

[0109] 在另一个具体的实施方案中,测定人低亲和力 Fc γ R 多态性对人抗体治疗剂的功效的影响。在具体的实施方案中,给包含人 Fc γ R 的第一多态性的第一人源化小鼠施用抗肿瘤抗体,也给包含人 Fc γ R 的第二多态性的第二人源化小鼠施用抗肿瘤抗体,其中第一和第二小鼠各自包含人肿瘤细胞;并且在第一小鼠和第二小鼠中评估抗肿瘤抗体的抗肿瘤活性。在具体的实施方案中,由医生基于抗肿瘤抗体在第一小鼠和第二小鼠中的功效的评估选择关于治疗具有第一或第二多态性和具有相应于人肿瘤细胞的肿瘤的人的治疗选择。

[0110] 人 Fc γ R 基因的适当多态性包括本领域已知的全部多态性。对于人 Fc γ R1IA 基因,多态性包括例如通过 T 细胞响应于 IgG 增殖的能力报道的高应答者表型和低应答者表型。高应答者多态性的特征在于位点 131 上的精氨酸残基(131Arg),而低应答者的特征在于位点 131 上的组氨酸残基(131His)。在具体的实施方案中,人 Fc γ R1IA 序列包含 131His 多态性。人 Fc γ R1IA α 链的代表性蛋白质序列示于 SEQ ID NO:32 中。

[0111] 人 Fc γ R1IB 基因的单核苷酸置换在配体结合结构域(α 链)中导致错义置换并且推定其影响 IgG 的 Fc 部分结合细胞表面上的 Fc γ R1IB 的 α 链的结合能力。例如,已显示小鼠的 Fc γ R1IB 基因的跨膜结构域内的位点 232 上的苏氨酸对异亮氨酸的置换(I1e232Thr)削弱了受体的信号转导能力。在具体的实施方案中,人 Fc γ R1IB 基因包含异亮氨酸变体(232I1e)。人 Fc γ R1IB α 链的代表性蛋白质序列示于 SEQ ID NO:33 中。

[0112] 有人提出人 Fc γ R1IIIA 基因的等位基因变体牵涉 SLE 和 RA 的易感性。该等位基因变体包括位点 158 上苯丙氨酸对缬氨酸的置换(Va1158Phe)。缬氨酸等位基因变体(158Va1)经表征具有比苯丙氨酸等位基因变体(158Phe)更高的对 IgG1 和 IgG3 的亲和力。已有人提出 158Phe 等位基因变体导致减少的免疫复合物的清除。在具体的实施方案中,人 Fc γ R1IIIA 基因包含 158Va1 等位基因变体。人 Fc γ R1IIIA α 链的代表性蛋白质序列示于 SEQ ID NO:35 中。

[0113] 人 Fc γ R1IIIB 基因的等位基因变体包括嗜中性粒细胞抗原 1(NA1) 和嗜中性粒细胞抗原 2(NA2) 等位基因。已有人提出这些等位基因变体牵涉输血反应、同种免疫嗜中性白

血球减少症 (alloimmune neutropaenia)、SLE 和 Wegener's 肉芽肿病。NA2 等位基因变体的特征在于减小的介导吞噬作用的能力。在具体的实施方案中,人 Fc γ RIIIB 基因包含 NA2 等位基因变体。人 Fc γ RIIIB α 链的代表性蛋白质序列示于 SEQ ID NO:36 中。

[0114] 在一个方面,遗传修饰的非人动物对于最优化通过治疗性抗体的 Fc 部分触发的 Fc γ R 介导的功能是有用的。可利用本领域已知的任何方法修饰抗体的 Fc 区域。例如,可修饰 Fc 部分 (例如,CH2 和 CH3 结构域) 中的氨基酸残基以选择性增强对人 Fc γ RIIIA 的结合亲和力。因此,所得的抗体应当具有增强的 Fc γ RIIIA 依赖性 ADCC。在具体的实施方案中,将表达本发明的人 Fc γ RIIIA 的动物用于评估修饰的人抗体的增强的 ADCC 能力 (通过给动物施用修饰的人抗体,检测 (例如,体外) 抗体对表达 Fc γ RIIIA 的细胞的结合和将观察到的 ADCC 活性与从野生型动物的测定观察到的 ADCC 活性相比较)。

实施例

[0115] 实施例 1: 低亲和力 Fc γ R 基因缺失型小鼠的产生

[0116] 构建用于引入内源低亲和力小鼠 Fc γ R 基因座的缺失的靶向构建体 (下文中描述的) (图 1)。

[0117] 使用 **VELOCIGENE®** 技术 (参见,例如,美国专利 No.6,586,251 和 Valenzuela 等人 (2003) High-throughput engineering of the mouse genome coupled with high-resolution expression analysis, Nature Biotech. 21(6):652-659) 制备靶向构建体以修饰细菌人工染色体 (BAC) RP23-395f6 (Invitrogen)。修饰 RP23-395f6 BAC DNA 以缺失内源低亲和力 Fc γ RIIB、Fc γ RIV 和 Fc γ RIII 基因 (包括每一个 Fc γ R 的 α 链)。

[0118] 简而言之,分别利用引物 mFcR5-up-1 (5' -ACCAGGATATGACCTGTAGAG; SEQ ID NO:1) 和 mFcR3-up-1a (GTCCATGGGTAAGTAGAAAC A; SEQ ID NO:2) 以及 mFcR5-DN (ATGCGAGCTCATGCATCTATG TCGGGTGC GG AGAAAGAGGT AATGCATTCTTGCCCAATAC TTAC; SEQ ID NO:3) 和 mFcR3-DN (ACTCATGGAGCCTCAACAGG A; SEQ ID NO:4) 产生上游和下游同源臂。这些同源臂被用于产生缺失内源低亲和力 Fc γ RIIB、Fc γ RIV 和 Fc γ RIII 基因的 α 链的盒。靶向构建体包括 lox 化的新霉素抗性基因,其包含相对于内源基因座的 5' 和 3' 区域同源的序列的同源臂。内源 Fc γ RIIB 基因的上游和内源 Fc γ RIII 基因的下游的基因和 / 或序列 (参见图 1) 不被该靶向构建体修饰。

[0119] 使用在缺失区域外部和在靶向构建体内部的引物,通过聚合酶链式反应 (PCR) 来确认靶向缺失。使用针对 mFcR-up-detect (ATCCTGAGTA TACTATGACA AGA; SEQ ID NO:5) 和 PGK-up-detect (ACTAGTGAGA CGTGCTACTT C; SEQ ID NO:6) 的引物通过 PCR 来确认缺失的基因座的上游区域;使用引物 pA-DN-detect (CTCCCACTCA TGATCTATAG A; SEQ ID NO:7) 和 mFcR-DN-detect (TGGAGCCTCA ACAGGACTCC A; SEQ ID NO:8) 来确认缺失的基因座的下游区域。横跨上游缺失点的核苷酸序列包括下列序列,所述序列表示与存在于缺失点上的盒序列连续连接的 Fc γ RIIB 基因的下游内源小鼠序列 (包括在下面的括号内): (GTCCATGGGTAAGTAGAAACA) TTCGCTACC TTAGGACCGT TA (SEQ ID NO:9)。横跨下游缺失点的核苷酸序列包括下列序列,其表示与 Fc γ RIII 基因上游的内源小鼠序列 (包括在下面的括号内) 连续的盒序列: CGGGTGC GG A GAAAGAGGTA AT (GCATTCTT GCCCAATACTTA) (SEQ ID NO:10)。

[0120] 通过将靶向 BAC DNA(上文中描述的)电穿孔入小鼠 ES 细胞来产生 Fc γ RIIB、Fc γ RIII 和 Fc γ RIV 缺陷小鼠。通过 TaqmanTM筛选和核型分析确认阳性 ES 细胞克隆。随后将阳性 ES 细胞克隆用于植入雌性小鼠以产生一窝低亲和力 Fc γ R 基因缺陷幼鼠。

[0121] 实施例 2: 低亲和力 Fc γ R 基因缺陷型小鼠的表征

[0122] 从 Fc γ R 缺陷型小鼠和野生型小鼠收获脾,在无菌一次性袋中用 10mL 的胶原酶-D 灌注。随后将每一只包含单个脾的袋子置于 **Stomacher**[®] (Seward) 中,在培养基环境中匀浆 30 分钟。将匀浆的脾转移至 10cm 培养皿,在 37 $^{\circ}$ C 温育 25 分钟。使用 1:50 稀释度的 0.5MEDTA,利用移液器分离细胞,随后在 37 $^{\circ}$ C 再温育另外 5 分钟。随后通过离心(1000rpm 进行 10 分钟)沉淀细胞,将红细胞在 4mL ACK 缓冲液 (Invitrogen) 中裂解 3 分钟。用 RPMI-1640(Sigma) 稀释脾细胞,再次离心。将沉淀的细胞重悬浮于 10mL RPMI-1640 中,利用 0.2 μ m 细胞过滤器进行过渡。

[0123] 流式细胞术。利用下列缀合有荧光团的细胞表面标记物:抗-CD19(B 细胞)、抗-CD3(T 细胞)、抗-NKp46(NK 细胞)和抗-F4/80(巨噬细胞)在 BD LSR II 系统(BD Bioscience)上通过 FACS 鉴定淋巴细胞群体。针对特定细胞谱系门控淋巴细胞,利用大鼠抗-小鼠 Fc γ RIII/II 抗体(克隆 2.4G2, BD Biosciences)分析内源 Fc γ RIII 和 Fc γ RIIB 的表达。克隆 2.4G2 识别鼠 Fc γ RIII 和 Fc γ RII 的细胞外结构域上的共同多态性表位。结果显示在 mFc γ R KO 小鼠的 B- 细胞、NK 细胞和巨噬细胞上不存在可检测的鼠低亲和力 Fc γ RIII 或 Fc γ RII(图 2)。

[0124] ADCC 测定。从 Fc γ R 基因缺陷型小鼠和野生型小鼠分离脾细胞,在细胞杀伤测定中分析它们进行 ADCC 的能力。使用 **MACS**[®] 技术 (Miltenyi Biotec) 分离和分开细胞群体。简而言之,使用磁性标记的抗-小鼠 CD3 珠粒从脾细胞耗尽 T 细胞。随后使用磁性标记的抗-小鼠 CD49B 珠粒就 NK 细胞富集 T 细胞耗尽的脾细胞。单独地,用不同浓度(范围从 0.1 至 10 μ g/mL)的小鼠抗-人 CD20 抗体(克隆 B1;BeckmanCoulter)在 4 $^{\circ}$ C 包被 Raji 细胞(表达人 CD20)30 分钟。以 100:1 和 50:1 的比率(NK:Raji)将抗体包被的 Raji 细胞与富集的 NK 细胞在 37 $^{\circ}$ C 温育 4 小时。使用 CytoTox-GloTM细胞毒性测定法(Promega)测量细胞死亡。发光信号来源于裂解的细胞并且与死亡细胞的数目成正比。就每一个比率的本底死亡细胞计数测定来自对照(无抗-CD20 抗体)的发光,从野生型和 KO 小鼠的测量扣除该发光。计算平均细胞死亡,通过与野生型相比较测定细胞杀伤的百分比减少(%ADCC)。结果示于表 1 中。

[0125] 表 1

	mFcyR KO	% ADCC		
		10 μ g/mL B1 抗体	1 μ g/mL B1 抗体	0.1 μ g/mL B1 抗体
NK 细胞:Raji 细胞	100:1	42	53	35
	50:1	15	0	0

[0127] 实施例 3: 低亲和力 Fc γ R 基因缺陷型小鼠的 B 细胞的体内耗尽

[0128] 使用人抗-人 CD20 抗体,对于经工程改造以表达人 CD20 的低亲和力 Fc γ R 基因缺陷小鼠的不同 B 细胞区室测定人或鼠 Fc 同种型通过 ADCC 途径对 B 细胞耗尽的作用。使

用本领域已知的技术对表达人 CD20 的小鼠单独进行工程改造。通过两个工程品系的标准交配技术产生在 B 细胞上表达人 CD20 并且缺失低亲和力 Fc γ R 基因（如实施例 1 中描述）的小鼠。

[0129] 表达人 CD20 并且具有内源低亲和力 Fc γ R 基因的完全互补序列的小鼠的单独组各自施用下列试剂之一：(1) 10mg/kg 对照抗体 (N=4；非特异于具有小鼠 IgG2a 的人 CD20 的人抗体)；(2) 2mg/kg Ab 168 (N=3；具有小鼠 IgG2a 的人抗-hCD20 抗体；分别在美国专利公布 No. 2009/0035322 的 SEQ ID NO:339 和 347 中记载其重链和轻链可变区序列)；(3) 10mg/kg Ab 168；(4) 2mg/kg Ab 735 (N=3；具有人 IgG1 的 Ab168)；(5) 10mg/kg Ab 735。在相似组的实验中，给表达人 CD20 并且具有内源低亲和力 Fc γ R 基因的缺失的小鼠的组施用对照和人抗-hCD20 抗体（上文中描述的）。

[0130] 通过腹膜内注射给每一个组中的小鼠施用抗体。注射后 7 天，无痛处死动物，通过在 LSR-II 流式细胞仪上进行多色 FACS 鉴定骨髓 (B220⁺/IgM⁺)、外周血 (B220⁺/CD19⁺)、淋巴结 (B220⁺/CD19⁺) 和脾 (B220⁺/CD19⁺) 中的剩余 B 细胞含量，使用 Flow-Jo 软件（如上所述的）进行分析。B 细胞耗尽实验的结果示于图 3A-3D 中。

[0131] 如图 3A-3D 中显示的，Ab 735 在包含低亲和力 Fc γ R 基因的完全互补序列的小鼠中以比 Ab 168 更低的效率耗尽 B 细胞。此外，对于两种抗体（小鼠和人 Fc），B 细胞耗尽在缺失低亲和力 Fc γ R 基因的完全互补序列的小鼠中显著减少。本实施例显示通过 ADCC 途径耗尽 B 细胞的能力需要低亲和力 Fc γ R 并且显示测量包含人恒定区的抗体在小鼠中的 ADCC 效率更适合通过使用包含人低亲和力 Fc γ R 基因的完全互补序列的遗传工程化的小鼠来进行。

[0132] 实施例 4:Fc γ RIIIA/Fc γ RIIA 人源化小鼠的产生

[0133] 构建用于将两个低亲和力人 Fc γ R 基因引入缺失的内源低亲和力小鼠 Fc γ R 基因座的靶向构建体（如下所述的）（图 4）。

[0134] 使用类似的方法（见实施例 1）通过修饰 BAC RP23-395f6 和 CTD-2514j12 (Invitrogen) 来制备包含人 Fc γ RIIA 和 Fc γ RIIIA 基因的靶向构建体。修饰两种 BAC 的 BAC DNA 以将低亲和力人 Fc γ RIIA 和 Fc γ RIIIA 基因的 α 链的缺失引入缺失的内源低亲和力 Fc γ R 基因座。

[0135] 以类似的方式，分别利用引物 h14 (GCCAGCCACAAAGGAGATAA TC; SEQ ID NO:11) 和 h15 (GCAACATTTAGGACAACCTCG GG; SEQ ID NO:12) 以及 h4 (GATTCCTAACCCACCTACCC C; SEQ ID NO:13) 和 h5 (TCTTTTCCAATGGCAGTTG; SEQ ID NO:14) 制备上游和下游同源臂。将这些同源臂用于制备将低亲和力人 Fc γ RIIA 和 Fc γ RIIIA 基因的 α 链引入内源小鼠低亲和力 Fc γ R 基因座的盒。靶向构建体包括 5' 同源臂（包括相对于缺失的内源低亲和力 Fc γ R 基因座在 5' 的序列）、FRT' ed 潮霉素抗性基因，后跟来自 BAC CTD-2514j12 的人基因组片段（其包含低亲和力人 Fc γ RIIA 和 Fc γ RIIIA α 链基因）和 3' 同源臂（包含相对于缺失的内源低亲和力 Fc γ R 基因座在 3' 的小鼠序列）（图 4 的中间）。对于在小鼠血小板上表达 Fc γ RIIA 的小鼠，除构建体包含可操作地连接于人基因组的人 Fc γ RIIA 基因的延长的启动子序列（例如达到约 18kb 或更长）外，以相似的方式（使用相同的 BAC），使用在两侧连接有 1ox2372 位点的潮霉素盒来制备靶向构建体，其中启动子区域与第一 1ox2372 位点的连接为 ATCGGGGATAGAGATGTTT (CC)GCGATCGCGGTACCGGGC (括号内为 SEQ ID

NO:37 人 /lox2372 连接), 并且其中第二 lox2372 位点与小鼠序列的连接为 TTATACGAAG TTATACCGG(TG)CATTCTTGC CCAATACTTA(括号内为 SEQ ID NO:38 lox2372/小鼠连接)。使用适当的引物对包含启动子区域的人源化进行基因分型。

[0136] 利用 PCR 确认人 Fc γ RIIA 和 Fc γ RIIIA α 链基因的靶向插入(如上所述的)。使用引物 h16(CCCAGGTAAG TCGTGATGAA ACAG;SEQ ID NO:15) 和 pA-DN- 检测(CTCCCACTCA TGATCTATAG A;SEQ ID NO:16) 通过 PCR 确认部分人源化的基因座的上游区域;使用引物 mFcRDN-detect-9(TGGAGCCTCA ACAGGACTCC A;SEQ ID NO:17) 和 h6(CACACATCTC CTGGTGACTT G;SEQ ID NO:18) 确认部分人源化的基因座的下游区域。横跨下游连接的核苷酸序列包括下列序列,其表示与缺失的低亲和力 Fc γ R 基因座的 3' 的内源小鼠序列连续的 hFc γ RIIA 基因的上游内源人序列(包含于下面的括号内)的新型插入点:(CAACTGCCAT TGGAAAAGA)C TCGAGTGCCA TTTCATTACCTC(SEQ ID NO:19)。上游连接包括两个新型序列。上游连接的一个点包括下列序列,其表示与包含插入的 hFc γ RIIIA 基因的上游区域的人基因组序列(包含于下面括号中)连续的潮霉素盒的核苷酸序列:TAAACCCGCG GTGGAGCTC(GCCAGCCACAA AGGAGATAATCA)(SEQ ID NO:20)。上游连接的第二个点包括下列序列,其表示与潮霉素盒内的核苷酸序列连续的缺失的低亲和力 Fc γ R 基因座的上游区域的内源小鼠序列(包含于下面括号中)的核苷酸序列:(CCATGGGTAAGTAGAAAC)TC TAGACCCCGG GCTCGATAA CT(SEQ ID NO:21)。

[0137] 通过将靶向的 BAC DNA(如上所述的)电穿孔入小鼠 ES 细胞来产生包含替代内源低亲和力小鼠 Fc γ R 基因座的 2 个低亲和力人 Fc γ R 基因(hFc γ RIIA, 缺失延长的启动子区域, 和 hFc γ RIIIA) 的小鼠。通过 Taqman™ 筛选和核型分析确认阳性 ES 细胞克隆。随后使用 **VELOCIMOUSE®** 法(在下文中描述的)将阳性 ES 细胞克隆用于植入雌性小鼠以产生一窝包含 2 个人低亲和力 Fc γ R 基因对内源低亲和力 Fc γ R 基因的替代的幼鼠。

[0138] 将上述靶向的 ES 细胞用作供体 ES 细胞, 通过 **VELOCIMOUSE®** 法(参见, 例如, 美国专利 No. 7, 294, 754 和 Poueymirou 等人 (2007) F0 generation mice that are essentially fully derived from the donor gene-targeted ES cells allowing immediate phenotypic analyses Nature Biotech. 25(1):91-99) 将其引入 8 细胞期小鼠胚胎。使用检测 hFc γ R 基因之存在的等位基因测定的改进法 (Valenzuela 等人, 同上) 通过基因分型鉴定具有 hFc γ RIIA 和 hFc γ RIIIA 的 **VELOCIMICE®** (完全来源于供体 ES 细胞的 F0 小鼠)。

[0139] 可将具有 hFc γ R 基因的小鼠与 Cre 删除小鼠品系(例如参见, 国际专利申请公布 No. WO 2009/114400) 交配以除去通过靶向构建体引入的、在例如 ES 细胞阶段或胚胎中未被除去的任何 lox 化的 neo 盒。任选地, 新霉素盒保留在小鼠中。

[0140] 对幼鼠进行基因分型, 选择对于 hFc γ R 基因是杂合的幼鼠用于表征 Fc γ RIIA 和 Fc γ RIIIA 人源化。

[0141] 实施例 5: Fc γ RIIIA/Fc γ RIIA 人源化小鼠的表征

[0142] 从人源化 Fc γ RIIIA/Fc γ RIIA(杂合子, 不存在延长的 Fc γ RIIA 启动子区域) 和野生型小鼠收获脾, 将其制备用于 FACS(如上文中所述的)。

[0143] 流式细胞术。就特定细胞谱系门控淋巴细胞, 分别使用小鼠抗-人 Fc γ RII 抗体(克隆 FLI8.26; BD Biosciences) 和小鼠抗-人 Fc γ RIII 抗体(克隆 3G8; BD Biosciences)

分析 hFc γ RII 和 hFc γ RIII 的表达。对于每一个淋巴细胞亚群体观察到的相对表达 (++, +) 或无表达 (-) 示于表 2 中。

[0144] 表 2

[0145]

淋巴细胞谱系	hFc γ RIII	hFc γ RII
B 细胞	-	-
NK 细胞	++	-
巨噬细胞	+	+
嗜中性粒细胞	-	+

[0146] 在相似的细胞中, 从人源化 Fc γ RIIIA/Fc γ RIIA (纯合子, 不存在延长的 Fc γ RIIA 启动子区域) 和野生型小鼠收获脾, 将其制备用于 FACS (如上所述的)。结果示于图 5A 和 5B 中。Fc γ RIIIA/Fc γ RIIA 纯合子小鼠中表达人 Fc γ RIIIA、Fc γ RIIA 或两者的单独的淋巴细胞群体的百分比示于表 3 中。

[0147] 表 3

[0148]

淋巴细胞谱系	hFc γ RIII	hFc γ RII	hFc γ RII/hFc γ RIII
NK 细胞	97	-	-
巨噬细胞	26	14	39
嗜中性粒细胞	-	94	-

[0149] 如本实施例中显示的, 按照实施例 3 产生的遗传修饰的小鼠 (杂合子和纯合子基因型) 在 NK 细胞和巨噬细胞上表达人 Fc γ RIIIA; 在嗜中性粒细胞和巨噬细胞上表达人 Fc γ RIIA, 但在血小板上表达 Fc γ RIIA。人 Fc γ RIIIA 在 NK 细胞上高度表达。本实施例中显示的人 Fc γ R 基因的表达模式与这些基因在人辅助细胞中的表达模式一致。

[0150] 实施例 6: 低亲和力 Fc γ R 人源化小鼠的产生

[0151] 构建用于将 3 个额外的低亲和力人 Fc γ R 基因引入部分人源化的内源低亲和力 Fc γ R 基因座的靶向构建体 (下文中描述的) (图 6)。

[0152] 使用类似的方法 (参见实施例 1) 通过 BAC RP-23 395f6 和 RP-11697e5 (Invitrogen) 的修饰制备包含人 Fc γ RIIB、Fc γ RIIIB 和 Fc γ RIIC 基因的靶向构建体。修饰两个 BAC 的 BAC DNA 以将低亲和力人 Fc γ RIIB、Fc γ RIIIB 和 Fc γ RIIC 基因的 α 链引入包含两个人低亲和力 Fc γ R 基因的部分人源化的内源低亲和力 Fc γ R 基因座。

[0153] 以相似的方式, 分别利用引物 mFcR up-1 (ACCAGGATATGACCTGTAGA G; SEQ ID NO:22) 和 mFcR2b NheI-2 (GTTTCTACTTACCCATGGAC; SEQ ID NO:23), 以及

h10(AAATACACACTGCCACAGAC AG;SEQ ID NO:24)和h11(CCTCTTTTGTGAGTTTCCTG TG;SEQ ID NO:25)来制备上游和下游同源臂。将这些同源臂用于制备引入编码低亲和力人Fc γ RIIB、Fc γ RIIIB和Fc γ RIIC的 α 链的DNA序列的盒。靶向构建体包括5'同源臂(包括相对于缺失的内源低亲和力Fc γ R基因座在5'的小鼠序列)、lox化的新霉素抗性基因,后跟来自BAC RP-11 697e5的人基因组片段(其包含低亲和力人Fc γ RIIB、Fc γ RIIIB和Fc γ RIIC α 链基因)和3'同源臂(包含相对于低亲和力人Fc γ RIIIA α 链基因在5'的人序列)(图6的中间)。

[0154] 通过PCR确认3个额外低亲和力人Fc γ R基因的靶向插入(如上所述的)。使用引物mFcR up-detect-3(GAGTATACTA TGACAAGAGCATC;SEQ ID NO:26)和PGK up-detect(ACTAGTGAGACGTGCTACTT C;SEQ ID NO:27)通过PCR确认完全人源化基因座的上游区域;使用引物neo detect(CTCCCACTCA TGATCTATAG A;SEQ ID NO:28)和h12(CTTTTTATGG TCCCACAATC AG;SEQ ID NO:29)确认完全人源化基因座的下游区域。横跨下游连接的核苷酸序列包括hFc γ RIIA α 链基因的上游的相同人基因组序列(参见实施例3;SEQ ID NO:19)。横跨上游连接的核苷酸序列包括下列序列,所述序列表示小鼠序列与盒序列以及盒序列与插入位点上的人基因组序列的两个新连接。基因组小鼠序列(包含于下面括号中)与neo盒序列的上游区域的连接为:(GTCCATGGGT AAGTAGAAAC A)TTCGCTACCTTAGGACCGT TA(SEQ ID NO:30)。第二新型连接包括neo盒的3'末端(包含于下面括号中)与hFc γ RIIB α 链基因的下游的人基因组序列的连接:(GCTTATCGAT ACCGTCGAC)A AATACACACTGCCACAGACA GG;SEQ ID NO:31)。这些连接示于图6中,在靶向构建体内。所得的完全人源化的低亲和力Fc γ R基因座的修饰的基因组示于图6(底部)中。

[0155] 通过将靶向的BAC DNA(如上所述的)电穿孔引入小鼠ES细胞产生了包含替代内源低亲和力小鼠Fc γ R基因座的5个低亲和力人Fc γ R基因的小鼠。通过Taqman™筛选和核型分析确认阳性ES细胞克隆。随后将阳性ES细胞克隆用于植入雌性小鼠(如上所述的)以产生一窝包含5个人低亲和力Fc γ R基因对内源低亲和力Fc γ R基因的替代的幼鼠。

[0156] 实施例7:低亲和力Fc γ R人源化小鼠的表征

[0157] 从完全人源化的Fc γ R(杂合子)和野生型小鼠收获脾,将其制备用于FACS(如上文中所述的)。

[0158] 流式细胞术。就特定细胞谱系门控淋巴细胞,分别使用小鼠抗-人Fc γ RII抗体(克隆FLI8.26;BD Biosciences)和小鼠抗-人Fc γ RIII抗体(克隆3G8;BD Biosciences)分析人Fc γ RIIA和Fc γ RIIIA的表达。对于每一个淋巴细胞亚群体观察到的相对表达(++,+)或无表达(-)示于表4中。

[0159] 表4

[0160]

淋巴细胞谱系	hFc γ RIII	hFc γ RII
B细胞	-	+
NK细胞	+	+

巨噬细胞	+	+
嗜中性粒细胞	+	+

[0161] 在类似的实验中,从完全人源化的 Fc γ R(纯合子)和野生型小鼠收获脾,将其制备用于 FACS(如上所述的)。结果示于图 7 中。完全人源化的 Fc γ R 纯合子小鼠中表达人 Fc γ R111A、人 Fc γ R111B、人 Fc γ R11A、人 Fc γ R11B、人 Fc γ R11C 或其组合的单独的淋巴细胞群体的百分比示于表 5 中。

[0162] 表 5

[0163]

淋巴细胞谱系	hFc γ R111	hFc γ R11	hFc γ R11/hFc γ R111
B 细胞		100	
NK 细胞	30	-	-
巨噬细胞	<1	55	26
嗜中性粒细胞	-		100

[0164] 如本实施例中显示的,根据实施例 5 产生的遗传修饰的小鼠(杂合子和纯合子基因型)在 NK 细胞和巨噬细胞上表达人 Fc γ R111A,在嗜中性粒细胞上表达人 Fc γ R111B,在嗜中性粒细胞和巨噬细胞上表达人 Fc γ R11A,在 B 细胞上表达人 Fc γ R11B,在 NK 细胞细胞上表达人 Fc γ R11C。本实施例中显示的人 Fc γ R 基因的表达模式与这些基因在人辅助细胞中的表达模式一致。

[0165] 实施例 8: 人源化 Fc γ R 小鼠中的 ADCC

[0166] 在细胞杀伤测定(如实施例 2 的上文中所述的)中分析从 Fc γ R 基因缺陷型(即敲除)、Fc γ R111A/Fc γ R11A(纯合子)、Fc γ R111A/Fc γ R111B/Fc γ R11A/Fc γ R11B/Fc γ R11C(纯合子)和野生型小鼠分离的脾细胞进行 ADCC 的能力。

[0167] 简而言之,使用 **MACS®** 技术(Miltenyi Biotec)分离和分开细胞群。简而言之,在小鼠 IL-2(500U/mL)存在的情况下将 T 和 B 细胞耗尽的脾细胞培养 2 周。以 50:1(NK:Raji)的比率在 ADCC 测定中将所得的扩增的 NK 细胞用作效应细胞。用 10ug/mL 的 Ab 168 或 Ab 735(如实施例 3 的上文中所述的)包被 Raji 细胞。结果示于表 6 中。

[0168] 表 6

[0169]

NK 细胞基因型	% ADCC	
	10 μ g/mL Ab 168	10 μ g/mL Ab 735
野生型	89	72
小鼠 Fc γ R KO	13	14
人 Fc γ RIIA-IIA HO	78	85
人 Fc γ RIIA-IIIB-IIA-IIIB-IIIC HO	81	59

[0170] 本发明不限于由本文中描述的特定实施方案确定的范围。事实上,根据上述说明和附图,除了本文中描述的变化外的本发明的各种变化对于本领域技术人员来说是显然的。此类变化意欲落在所附权利要求的范围内。

[0001]

序列表

- <110> MACDONALD, Lynn
TU, Naxin
GUBER, Cagan
STEVENS, Sean
MURPHY, Andrew J.
- <120> 人源化的FcγR小鼠
- <130> 3070A-WO
- <140> 待分配
- <141>
- <150> 61/288,562
<151> 2009-12-21
- <160> 38
- <170> FastSEQ for Windows Version 4.0
- <210> 1
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列
- <220>
<223> 合成的
- <400> 1
accaggatat gacctgtaga g 21
- <210> 2
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列
- <220>
<223> 合成的
- <400> 2
gtccatgggt aagtagaaac a 21
- <210> 3
<211> 65
<212> DNA
<213> 人工序列
- <220>
<223> 合成的
- <400> 3
atgcgagctc atgcatctat gtcgggtgcg gagaagagg taatgcatc ttgcccaata 60
ettac 65
- <210> 4
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列
- <220>
<223> 合成的
- <400> 4
actcatggag cctcaacagg a 21
- <210> 5
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列
- <220>
<223> 合成的

[0002]

<400> 5 atcctgagta tactatgaca aga	23
<210> 6 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 6 actagtgaga cgtgetactt c	21
<210> 7 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 7 ctcccactca tgaictatag a	21
<210> 8 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 8 tggagcctca acaggactcc a	21
<210> 9 <211> 42 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 9 gtccatgggt aagtagaac attcctace ttaggaccgt ta	42
<210> 10 <211> 42 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 10 cgggtgcgga gaaagagta atgcattctt gcccaatact ta	42
<210> 11 <211> 22 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 11 gccagccaca aaggagataa tc	22
<210> 12 <211> 22 <212> DNA <213> 人工序列	
<220>	

[0003]

<223> 合成的	
<400> 12 gcaacattta ggacaactcg gg	22
<210> 13 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 13 gatttcttaa ccactacc c	21
<210> 14 <211> 19 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 14 tcctttccaa tggcagttg	19
<210> 15 <211> 24 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 15 cccaggtaa tegtgaagaa acag	24
<210> 16 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 16 ctccactca tgatctatag a	21
<210> 17 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 17 tggagctca acaggactec a	21
<210> 18 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 18 cacacatctc cigtgactt g	21
<210> 19 <211> 42 <212> DNA <213> 人工序列	

[0004]

<220>		
<223>	合成的	
<400>	19	
	caactgccat tggaaaagac tegagigcca tttcattacc tc	42
<210>	20	
<211>	42	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	20	
	taaacccgcg gtcgagcctg ccagccacaa aggagataa ca	42
<210>	21	
<211>	42	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	21	
	ccatgggtaa gtagaaactc tagaccctcg ggcctgataa ct	42
<210>	22	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	22	
	accaggatat gacctgtaga g	21
<210>	23	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	23	
	gittctactt acccatggac	20
<210>	24	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	24	
	aaatacacac tgcacagac ag	22
<210>	25	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	25	
	cccttttgt gagttctctg tg	22
<210>	26	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	

[0005]

<220>		
<223>	合成的	
<400>	26	
	gagtatacta tgacaagage atc	23
<210>	27	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	27	
	actagtgaga cgtgctact c	21
<210>	28	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	28	
	ctcccactca tgatctatag a	21
<210>	29	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	29	
	ctttttatgg tcccacaatc ag	22
<210>	30	
<211>	42	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	30	
	gtccatgggt aagtagaaac attcctacc ttaggacct ta	42
<210>	31	
<211>	42	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	31	
	gcttategat accgtcgaca aatacaact gccacagaca gg	42
<210>	32	
<211>	317	
<212>	PRT	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	32	
	Met Thr Met Glu Thr Gln Met Ser Gln Asn Val Cys Pro Arg Asn Leu	
	1 5 10 15	
	Trp Leu Leu Gln Pro Leu Thr Val Leu Leu Leu Ala Ser Ala Asp	
	20 25 30	
	Ser Gln Ala Ala Ala Pro Pro Lys Ala Val Leu Lys Leu Glu Pro Pro	

[0006]

```

Trp Ile 35          40          45
50 Asn Val Leu Gln Glu Asp Ser Val Thr Leu Thr Cys Gln Gly
Ala Arg Ser Pro Glu Ser Asp Ser Ile Gln Trp Phe His Asn Gly Asn
65          70          75          80
Leu Ile Pro Thr His Thr Gln Pro Ser Tyr Arg Phe Lys Ala Asn Asn
85          90          95
Asn Asp Ser Gly Glu Tyr Thr Cys Gln Thr Gly Gln Thr Ser Leu Ser
100         105         110
Asp Pro Val His Leu Thr Val Leu Ser Glu Trp Leu Val Leu Gln Thr
115         120         125
Pro His Leu Glu Phe Gln Glu Gly Glu Thr Ile Met Leu Arg Cys His
130         135         140
Ser Trp Lys Asp Lys Pro Leu Val Lys Val Thr Phe Phe Gln Asn Gly
145         150         155         160
Lys Ser Gln Lys Phe Ser His Leu Asp Pro Thr Phe Ser Ile Pro Gln
165         170         175
Ala Asn His Ser His Ser Gly Asp Tyr His Cys Thr Gly Asn Ile Gly
180         185         190
Tyr Thr Leu Phe Ser Ser Lys Pro Val Thr Ile Thr Val Gln Val Pro
195         200         205
Ser Met Gly Ser Ser Ser Pro Met Gly Ile Ile Val Ala Val Val Ile
210         215         220
Ala Thr Ala Val Ala Ala Ile Val Ala Ala Val Val Ala Leu Ile Tyr
225         230         235         240
Cys Arg Lys Lys Arg Ile Ser Ala Asn Ser Thr Asp Pro Val Lys Ala
245         250         255
Ala Gln Phe Glu Pro Pro Gly Arg Gln Met Ile Ala Ile Arg Lys Arg
260         265         270
Gln Leu Glu Glu Thr Asn Asn Asp Tyr Glu Thr Ala Asp Gly Gly Tyr
275         280         285
Met Thr Leu Asn Pro Arg Ala Pro Thr Asp Asp Asp Lys Asn Ile Tyr
290         295         300
Leu Thr Leu Pro Pro Asn Asp His Val Asn Ser Asn Asn
305         310         315

```

<210> 33
 <211> 303
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的

```

<400> 33
Met Gly Ile Leu Ser Phe Leu Pro Val Leu Ala Thr Glu Ser Asp Trp
1          5          10          15
Ala Asp Cys Lys Ser Pro Gln Pro Trp Gly His Met Leu Leu Trp Thr
20         25         30
Ala Val Leu Phe Leu Ala Ala Pro Pro Lys Ala Val Leu Lys Leu Glu
35         40         45
Pro Gln Trp Ile Asn Val Leu Gln Glu Asp Ser Val Thr Leu Thr Cys
50         55         60
Arg Gly Thr His Ser Pro Glu Ser Asp Ser Ile Gln Trp Phe His Asn
65         70         75         80
Gly Asn Leu Ile Pro Thr His Thr Gln Pro Ser Tyr Arg Phe Lys Ala
85         90         95
Asn Asn Asn Asp Ser Gly Glu Tyr Thr Cys Gln Thr Gly Gln Thr Ser
100        105        110
Leu Ser Asp Pro Val His Leu Thr Val Leu Ser Glu Trp Leu Val Leu
115        120        125
Gln Thr Pro His Leu Glu Phe Gln Glu Gly Glu Thr Ile Val Leu Arg
130        135        140
Cys His Ser Trp Lys Asp Lys Pro Leu Val Lys Val Thr Phe Phe Gln
145        150        155         160
Asn Gly Lys Ser Lys Lys Phe Ser Arg Ser Asp Pro Asn Phe Ser Ile
165        170        175
Pro Gln Ala Asn His Ser His Ser Gly Asp Tyr His Cys Thr Gly Asn
180        185        190
Ile Gly Tyr Thr Leu Tyr Ser Ser Lys Pro Val Thr Ile Thr Val Gln
195        200        205
Ala Pro Ser Ser Ser Pro Met Gly Ile Ile Val Ala Val Val Thr Gly
210        215        220
Ile Ala Val Ala Ala Ile Val Ala Ala Val Val Ala Leu Ile Tyr Cys
225        230        235         240

```

[0007]

Arg Lys Lys Arg Ile Ser Ala Leu Pro Gly Tyr Pro Glu Cys Arg Glu
 245 250 255
 Met Gly Glu Thr Leu Pro Glu Lys Pro Ala Asn Pro Thr Asn Pro Asp
 260 265 270
 Glu Ala Asp Lys Val Gly Ala Glu Asn Thr Ile Thr Tyr Ser Leu Leu
 275 280 285
 Met His Pro Asp Ala Leu Glu Glu Pro Asp Asp Gln Asn Arg Ile
 290 295 300

<210> 34
 <211> 323
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的

<400> 34
 Met Gly Ile Leu Ser Phe Leu Pro Val Leu Ala Thr Glu Ser Asp Trp
 1 5 10 15
 Ala Asp Cys Lys Ser Pro Gln Pro Trp Gly His Met Leu Leu Trp Thr
 20 25 30
 Ala Val Leu Phe Leu Ala Pro Val Ala Gly Thr Pro Ala Ala Pro Pro
 35 40 45
 Lys Ala Val Leu Lys Leu Glu Pro Gln Trp Ile Asn Val Leu Gln Glu
 50 55 60
 Asp Ser Val Thr Leu Thr Cys Arg Gly Thr His Ser Pro Glu Ser Asp
 65 70 75 80
 Ser Ile Pro Trp Phe His Asn Gly Asn Leu Ile Pro Thr His Thr Gln
 85 90 95
 Pro Ser Tyr Arg Phe Lys Ala Asn Asn Asn Asp Ser Gly Glu Tyr Thr
 100 105 110
 Cys Gln Thr Gly Gln Thr Ser Leu Ser Asp Pro Val His Leu Thr Val
 115 120 125
 Leu Ser Glu Trp Leu Val Leu Gln Thr Pro His Leu Glu Phe Gln Glu
 130 135 140
 Gly Glu Thr Ile Val Leu Arg Cys His Ser Trp Lys Asp Lys Pro Leu
 145 150 155 160
 Val Lys Val Thr Phe Phe Gln Asn Gly Lys Ser Lys Lys Phe Ser Arg
 165 170 175
 Ser Asp Pro Asn Phe Ser Ile Pro Gln Ala Asn His Ser His Ser Gly
 180 185 190
 Asp Tyr His Cys Thr Gly Asn Ile Gly Tyr Thr Leu Tyr Ser Ser Lys
 195 200 205
 Pro Val Thr Ile Thr Val Gln Ala Pro Ser Ser Ser Pro Met Gly Ile
 210 215 220
 Ile Val Ala Val Val Thr Gly Ile Ala Val Ala Ala Ile Val Ala Ala
 225 230 235 240
 Val Val Ala Leu Ile Tyr Cys Arg Lys Lys Arg Ile Ser Ala Asn Ser
 245 250 255
 Thr Asp Pro Val Lys Ala Ala Gln Phe Glu Pro Pro Gly Arg Gln Met
 260 265 270
 Ile Ala Ile Arg Lys Arg Gln Pro Glu Gln Thr Asn Asn Asp Tyr Glu
 275 280 285
 Thr Ala Asp Gly Gly Tyr Met Thr Leu Asn Pro Arg Ala Pro Thr Asp
 290 295 300
 Asp Asp Lys Asn Ile Tyr Leu Thr Leu Pro Pro Asn Asp His Val Asn
 305 310 315 320
 Ser Asn Asn

<210> 35
 <211> 290
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的

<400> 35
 Met Gly Gly Gly Ala Gly Glu Arg Leu Phe Thr Ser Ser Cys Leu Val
 1 5 10 15
 Gly Leu Val Pro Leu Gly Leu Arg Ile Ser Leu Val Thr Cys Pro Leu
 20 25 30

[0008]

Gln Cys Gly Ile Met Trp Gln Leu Leu Leu Pro Thr Ala Leu Leu Leu
 35 40 45
 Leu Val Ser Ala Gly Met Arg Thr Glu Asp Leu Pro Lys Ala Val Val
 50 55 60
 Phe Leu Glu Pro Gln Trp Tyr Arg Val Leu Glu Lys Asp Ser Val Thr
 65 70 75 80
 Leu Lys Cys Gln Gly Ala Tyr Ser Pro Glu Asp Asn Ser Thr Gln Trp
 85 90 95
 Phe His Asn Glu Ser Leu Ile Ser Ser Gln Ala Ser Ser Tyr Phe Ile
 100 105 110
 Asp Ala Ala Thr Val Asp Asp Ser Gly Glu Tyr Arg Cys Gln Thr Asn
 115 120 125
 Leu Ser Thr Leu Ser Asp Pro Val Gln Leu Glu Val His Ile Gly Trp
 130 135 140
 Leu Leu Leu Gln Ala Pro Arg Trp Val Phe Lys Glu Glu Asp Pro Ile
 145 150 155 160
 His Leu Arg Cys His Ser Trp Lys Asn Thr Ala Leu His Lys Val Thr
 165 170 175
 Tyr Leu Gln Asn Gly Lys Gly Arg Lys Tyr Phe His His Asn Ser Asp
 180 185 190
 Phe Tyr Ile Pro Lys Ala Thr Leu Lys Asp Ser Gly Ser Tyr Phe Cys
 195 200 205
 Arg Gly Leu Phe Gly Ser Lys Asn Val Ser Ser Glu Thr Val Asn Ile
 210 215 220
 Thr Ile Thr Gln Gly Leu Ala Val Ser Thr Ile Ser Ser Phe Phe Pro
 225 230 235 240
 Pro Gly Tyr Gln Val Ser Phe Cys Leu Val Met Val Leu Leu Phe Ala
 245 250 255
 Val Asp Thr Gly Leu Tyr Phe Ser Val Lys Thr Asn Ile Arg Ser Ser
 260 265 270
 Thr Arg Asp Trp Lys Asp His Lys Phe Lys Trp Arg Lys Asp Pro Gln
 275 280 285
 Asp Lys
 290

<210> 36
 <211> 233
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的

<400> 36
 Met Trp Gln Leu Leu Leu Pro Thr Ala Leu Leu Leu Leu Val Ser Ala
 1 5 10 15
 Gly Met Arg Thr Gln Asp Leu Pro Lys Ala Val Val Phe Leu Glu Pro
 20 25 30
 Gln Trp Tyr Ser Val Leu Glu Lys Asp Ser Val Thr Leu Lys Cys Glu
 35 40 45
 Gly Ala Tyr Ser Pro Gln Asp Asn Ser Thr Gln Trp Phe His Asn Glu
 50 55 60
 Asn Leu Ile Ser Ser Gln Ala Ser Ser Tyr Phe Ile Asp Ala Ala Thr
 65 70 75 80
 Val Asn Asp Ser Gly Glu Tyr Arg Cys Gln Thr Asn Leu Ser Thr Leu
 85 90 95
 Ser Asp Pro Val Gln Leu Glu Val His Ile Gly Trp Leu Leu Leu Gln
 100 105 110
 Ala Pro Arg Trp Val Phe Lys Glu Glu Asp Pro Ile His Leu Arg Cys
 115 120 125
 His Ser Trp Lys Asn Thr Ala Leu His Lys Val Thr Tyr Leu Gln Asn
 130 135 140
 Gly Lys Asp Arg Lys Tyr Phe His His Asn Ser Asp Phe His Ile Pro
 145 150 155 160
 Lys Ala Thr Leu Lys Asp Ser Gly Ser Tyr Phe Cys Arg Gly Leu Val
 165 170 175
 Gly Ser Lys Asn Val Ser Ser Glu Thr Val Asn Ile Thr Ile Thr Gln
 180 185 190
 Gly Leu Ala Val Ser Thr Ile Ser Ser Phe Ser Pro Pro Gly Tyr Gln
 195 200 205
 Val Ser Phe Cys Leu Val Met Val Leu Leu Phe Ala Val Asp Thr Gly
 210 215 220
 Leu Tyr Phe Ser Val Lys Thr Asn Ile
 225 230

[0009]

<210> 37	
<211> 40	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 37	
atcggggata gagatgittg ccgcatcgc ggtaccgggc	40
<210> 38	
<211> 40	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 38	
ttatacgaag ttatacggg geattcittgc ceaatactta	40

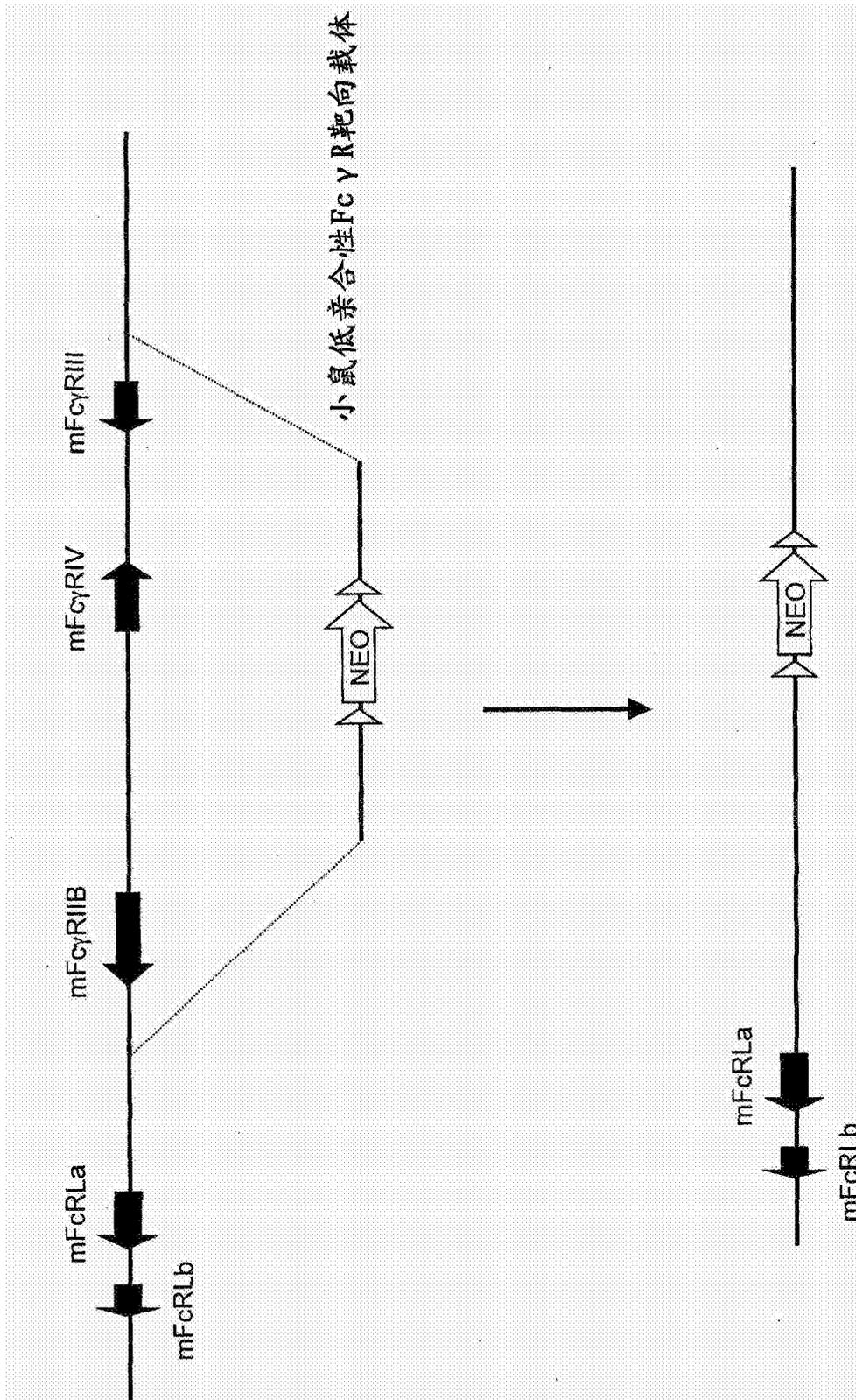


图 1

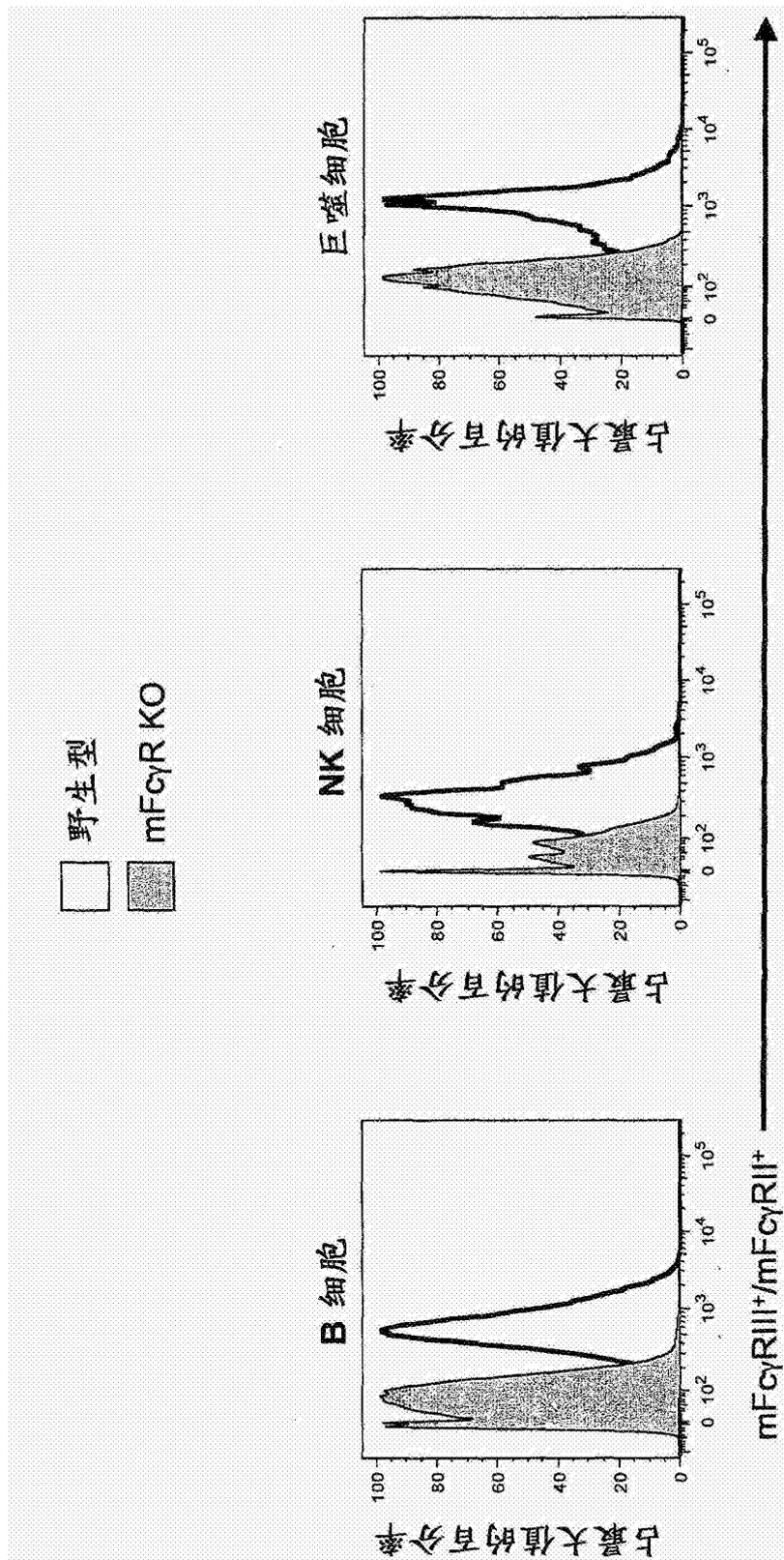


图 2

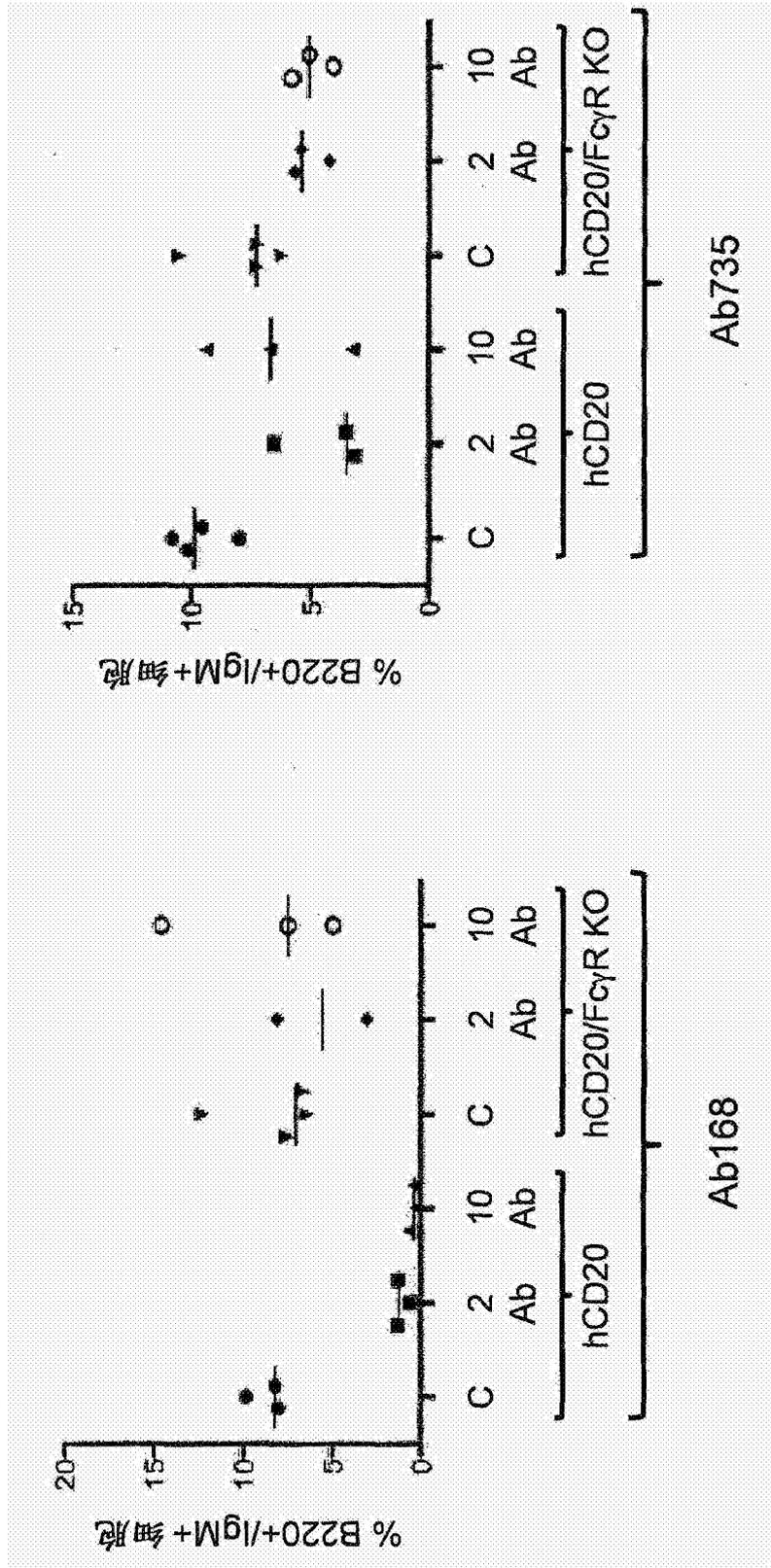


图 3A

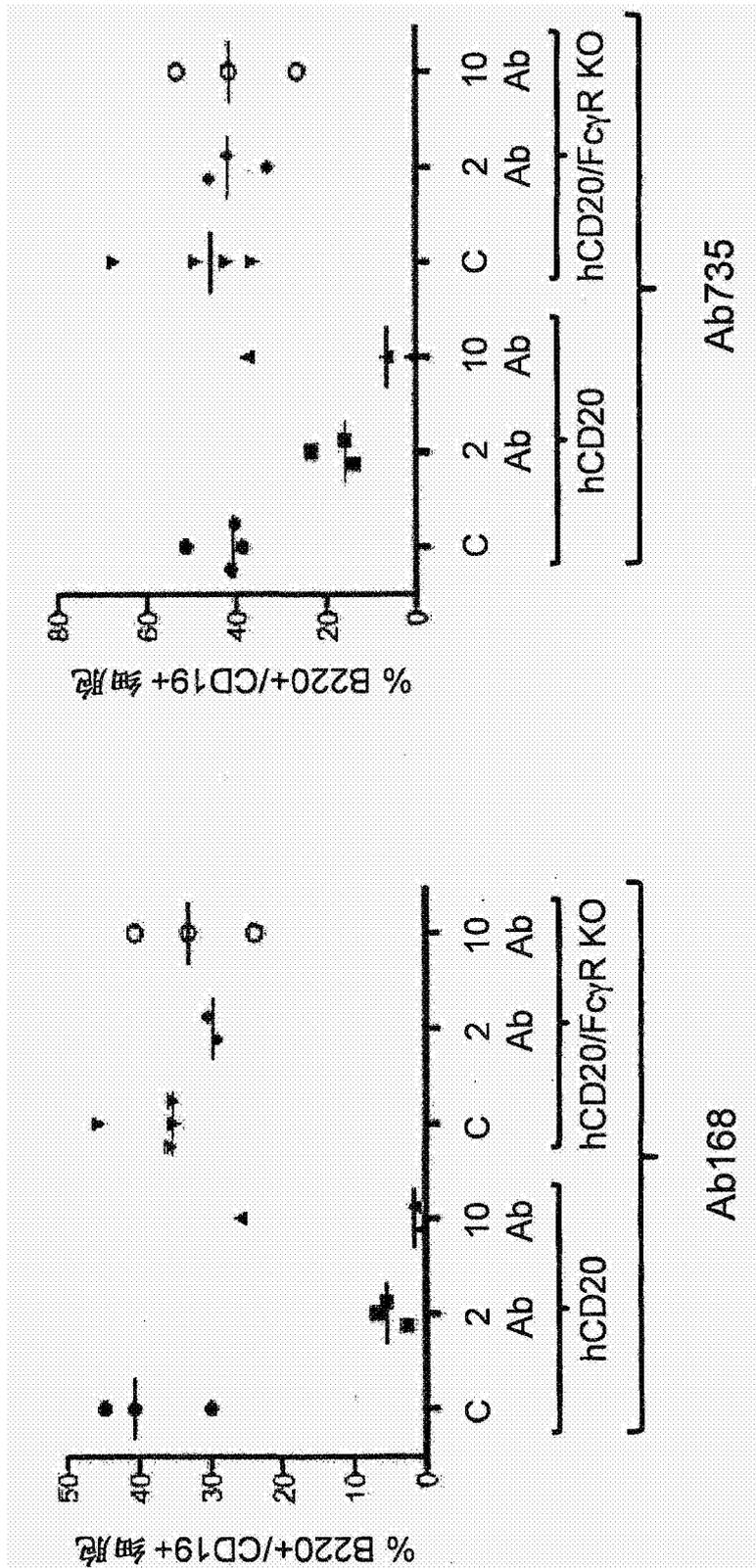


图 3B

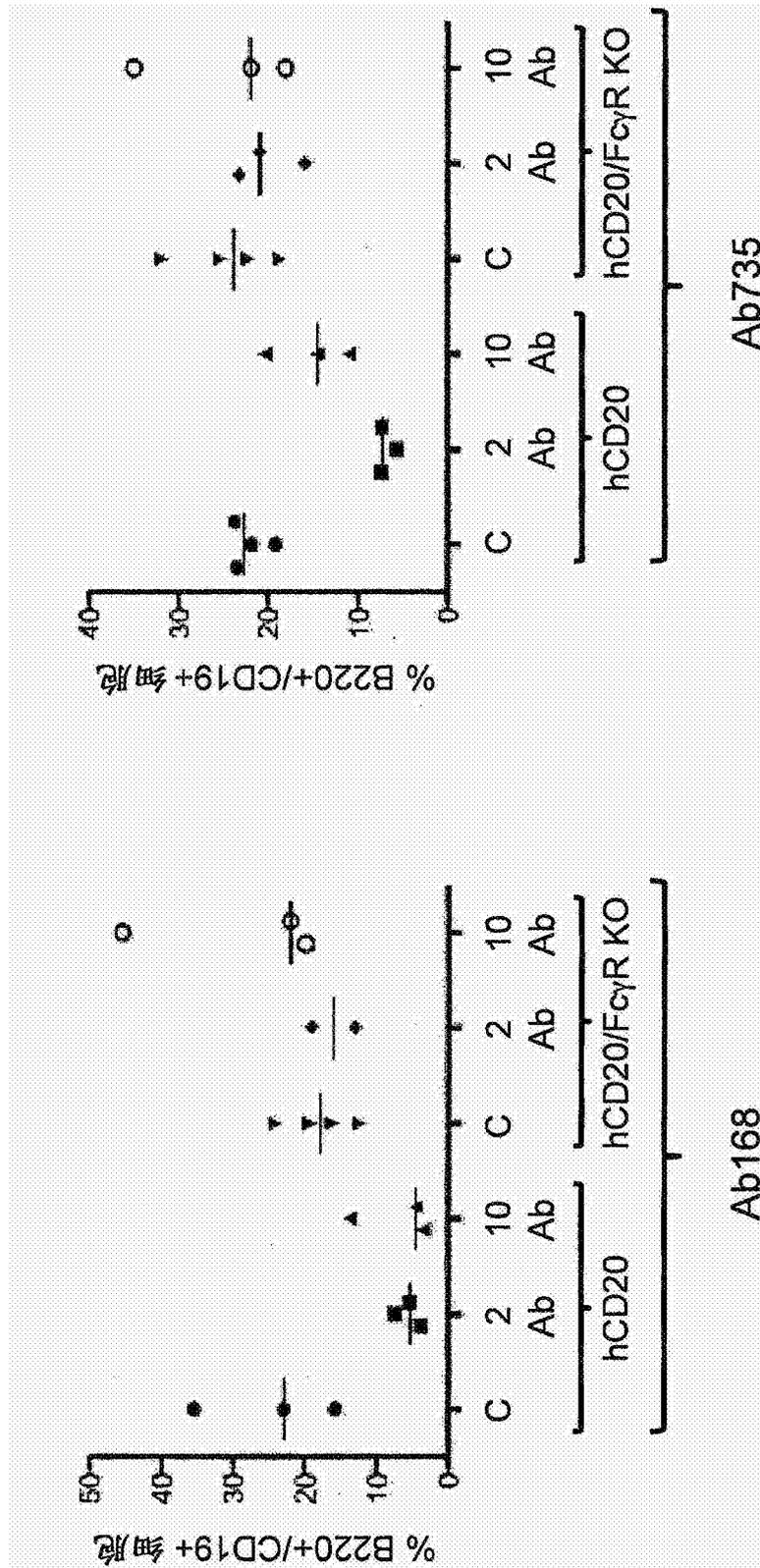


图 3C

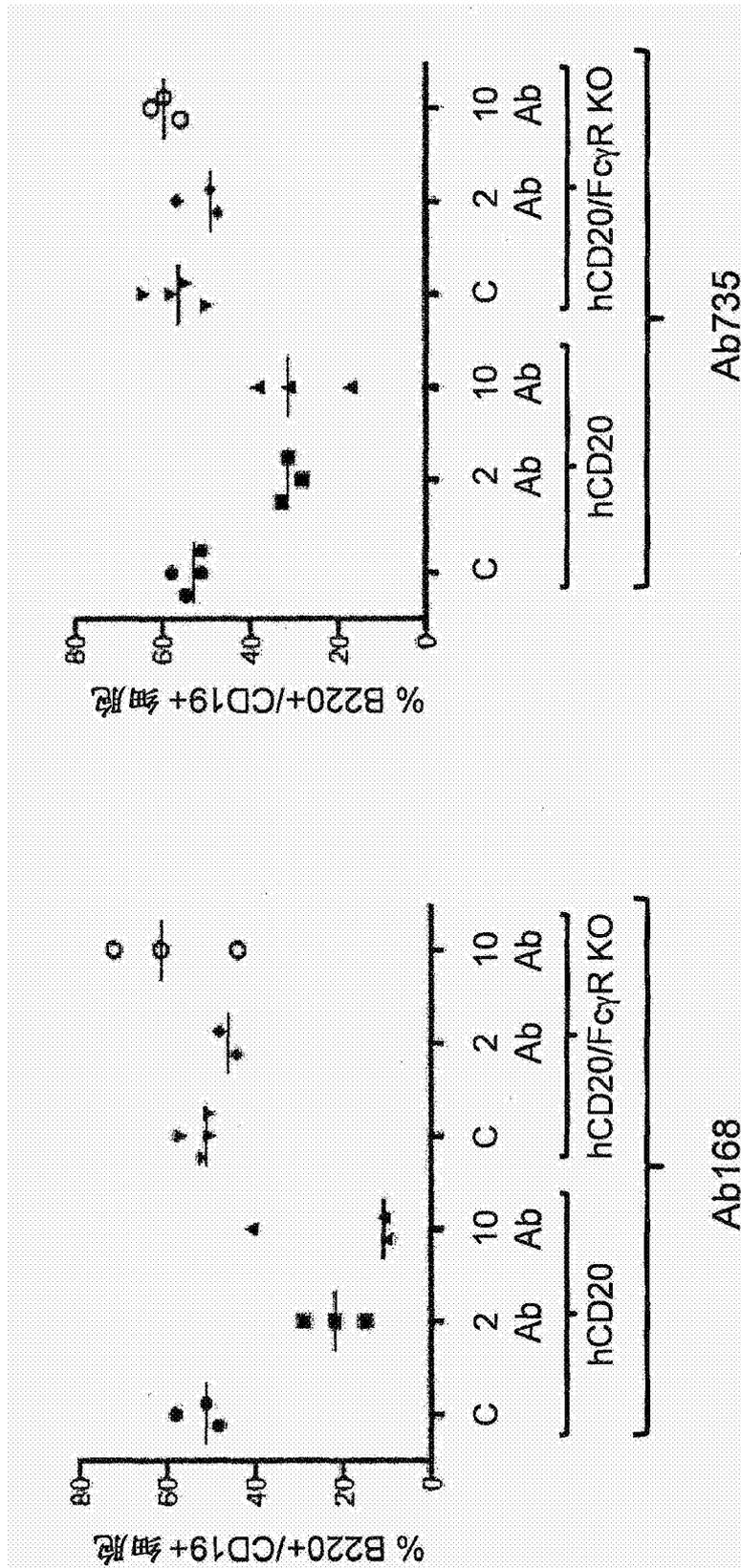


图 3D

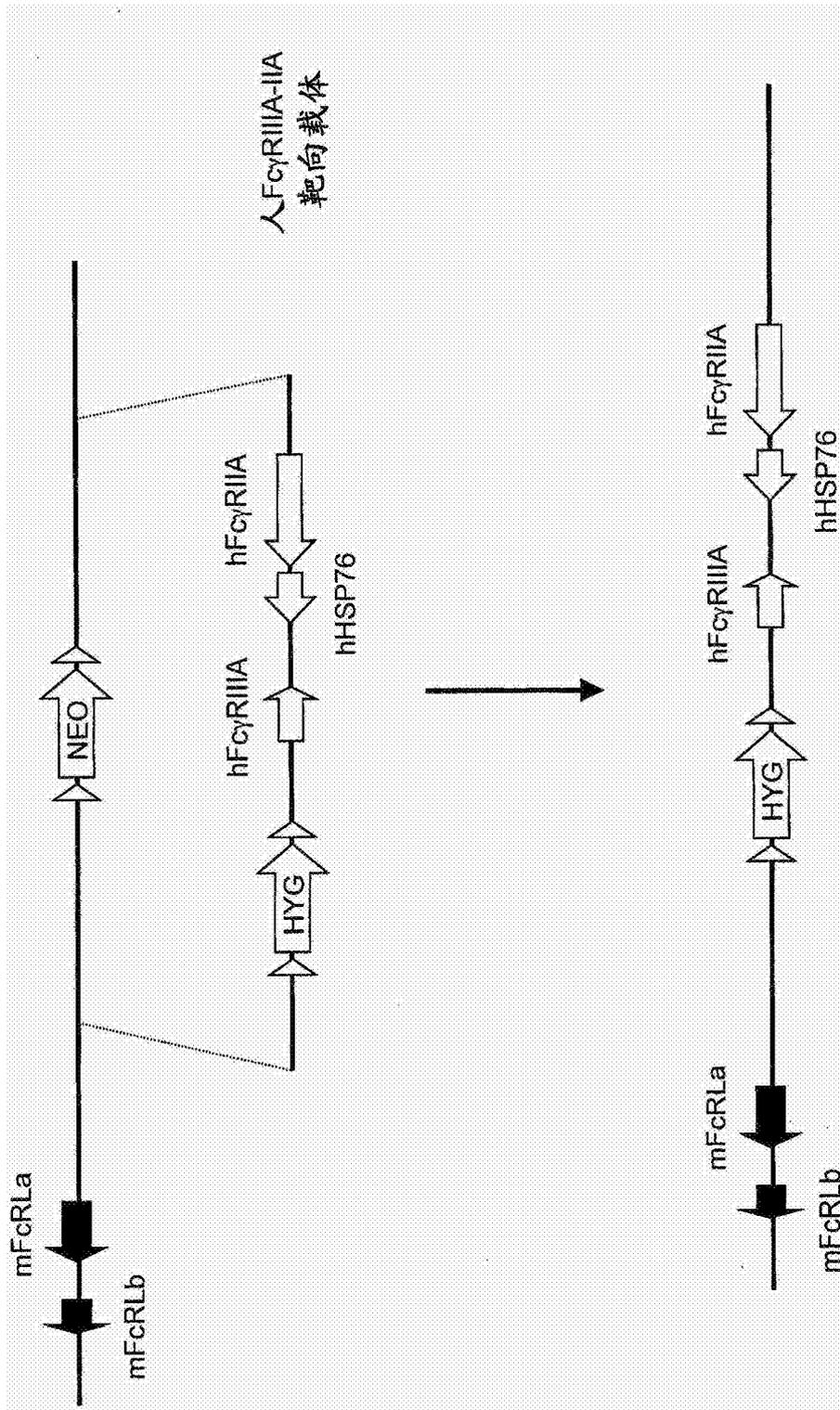


图 4

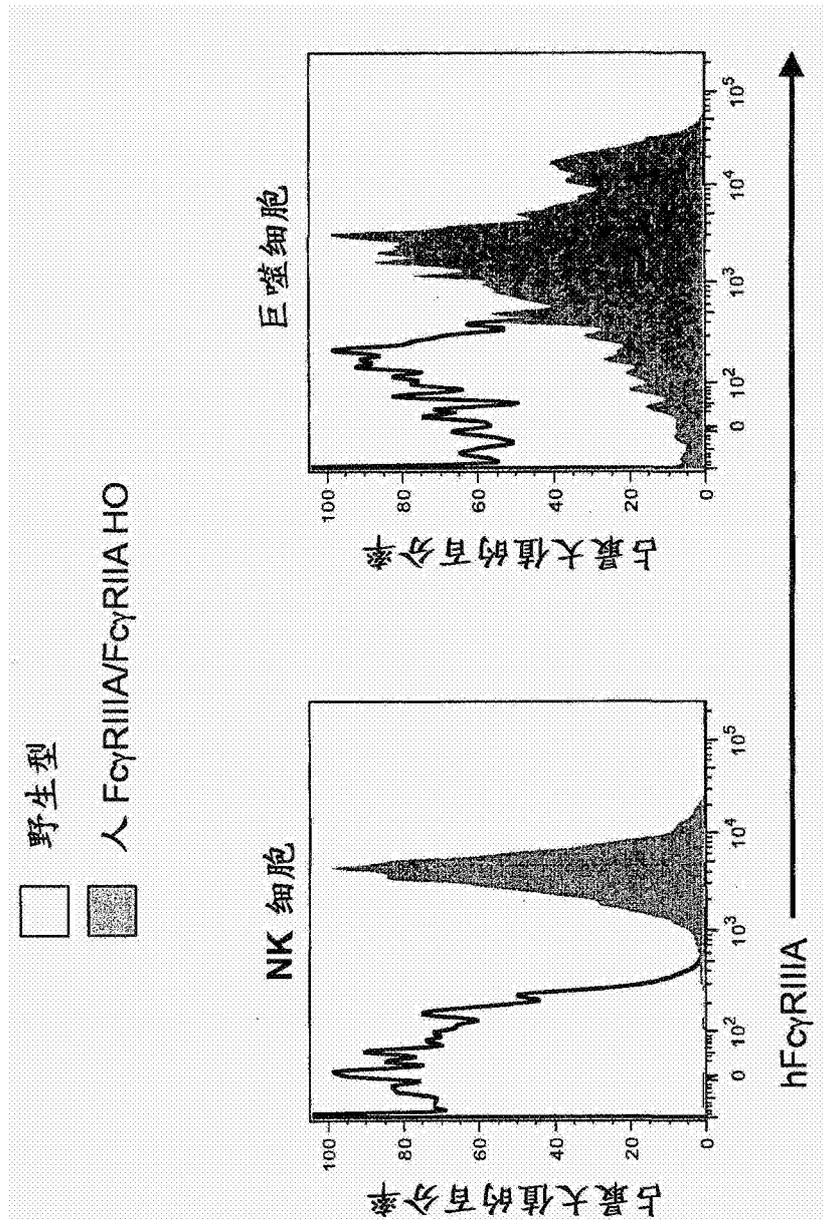


图 5A

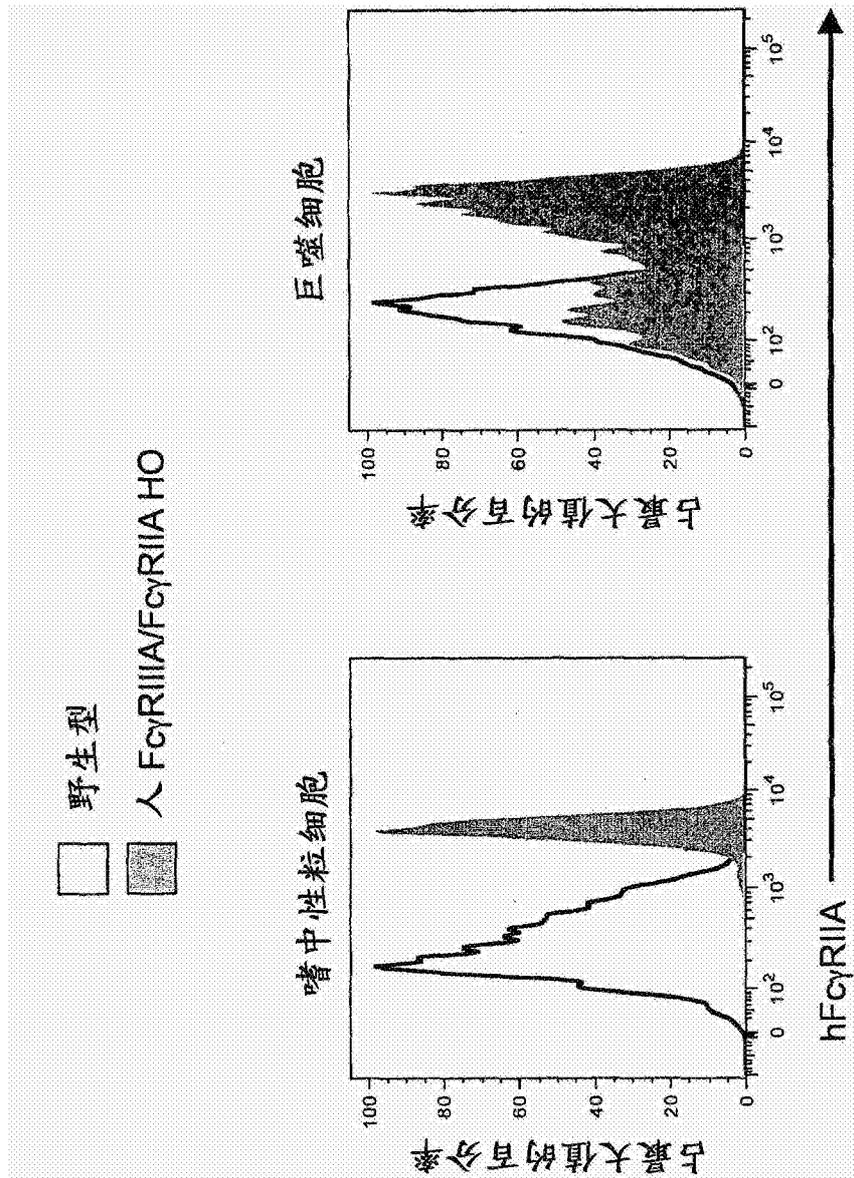


图 5B

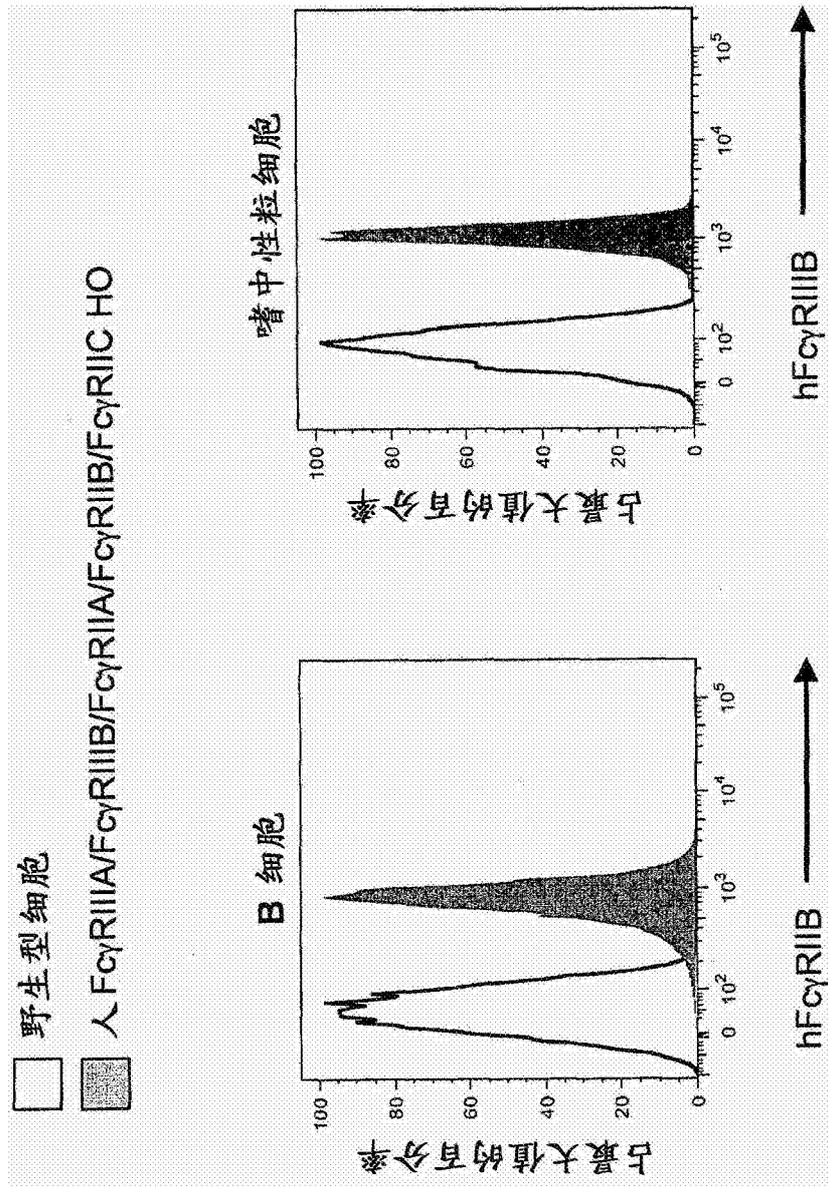


图 7