

[19] Patents Registry  
The Hong Kong Special Administrative Region  
香港特別行政區  
專利註冊處

[11] 1212552 B  
CN 104797132 B

[12]

**STANDARD PATENT SPECIFICATION**  
**標準專利說明書**

[21] Application No. 申請編號  
16100557.7

[51] Int.Cl.<sup>8</sup> C12N A01K C12P G01N  
C07K

[22] Date of filing 提交日期  
19.01.2016

---

[54] GENE KNOCK-IN NON-HUMAN ANIMAL 基因敲入非人動物

---

[30] Priority 優先權

13.09.2012 JP 2012-201299

[43] Date of publication of application 申請發表日期

17.06.2016

[45] Publication of the grant of the patent 批予專利的發表日期

29.03.2018

CN Application No. & Date 中國專利申請編號及日期

CN 201380047712.2 13.09.2013

CN Publication No. & Date 中國專利申請發表編號及日期

CN 104797132 22.07.2015

Date of Grant in Designated Patent Office 指定專利當局批予專利日期

30.06.2017

[73] Proprietor 專利所有人

CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA

5-1, UKIMA 5-CHOME

KITA-KU

TOKYO 115-8543

JAPAN

[72] Inventor 發明人

JISHAGE Koichi

UEDA Otoya

[74] Agent and / or address for service 代理人及/或送達地址

MARKS & CLERK

Level 9, Cyberport 1

100 Cyberport Road

Pok Fu Lam HONG KONG

---



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104797132 B

(45)授权公告日 2017.06.30

(21)申请号 201380047712.2  
 (22)申请日 2013.09.13  
 (65)同一申请的已公布的文献号  
 申请公布号 CN 104797132 A  
 (43)申请公布日 2015.07.22  
 (30)优先权数据  
 2012-201299 2012.09.13 JP  
 (85)PCT国际申请进入国家阶段日  
 2015.03.13  
 (86)PCT国际申请的申请数据  
 PCT/JP2013/074882 2013.09.13  
 (87)PCT国际申请的公布数据  
 W02014/042251 JA 2014.03.20  
 (73)专利权人 中外制药株式会社  
 地址 日本东京都  
 (72)发明人 寺社下浩一 上田乙也  
 (74)专利代理机构 中科专利商标代理有限责任  
 公司 11021  
 代理人 蒋亭

(51)Int.Cl.  
*C12N 15/09*(2006.01)  
*A01K 67/027*(2006.01)  
*C12P 21/08*(2006.01)  
*G01N 33/15*(2006.01)  
*G01N 33/50*(2006.01)  
*G01N 33/68*(2006.01)  
*C07K 16/28*(2006.01)  
*C07K 16/46*(2006.01)  
 (56)对比文件  
 CN 1849135 A,2006.10.18,  
 CN 1164194 A,1997.11.05,  
 CN 102245207 A,2011.11.16,  
 EP 1074268 A1,2001.02.07,  
 CN 102292106 A,2011.12.21,  
 US 5210075 A,1993.05.11,  
 张夏兰.兔IL-6基因真核表达载体的构建及其对pcDNA-VP60 DNA疫苗佐剂效应研究.《中国动物传染病学报》.2012,第20卷(第5期),第12-15页.

审查员 丁超

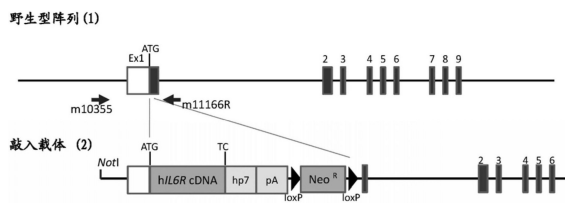
权利要求书2页 说明书16页  
序列表4页 附图11页

(54)发明名称

基因敲入非人动物

(57)摘要

非人动物,其特征在于,在存在于非人动物的基因组上的任意靶标基因的同阅读框中插入了DNA,所述DNA是在编码任意外来基因的DNA的3'侧添加了编码hp7序列的DNA和编码多聚A添加信号的DNA而成的。



1. 非人动物的制作方法,其特征在于,在存在于非人动物的基因组上的任意靶标基因的同阅读框中插入DNA,所述DNA是在编码任意外来基因的DNA的3'侧添加了编码hp7序列的DNA和编码多聚A添加信号的DNA而成的,所述hp7序列是序列表1所示的序列。

2. 根据权利要求1所述的非人动物的制作方法,所述外来基因是人白介素-6受体基因。

3. 根据权利要求1或2所述的非人动物的制作方法,所述存在于非人动物的基因组上的任意靶标基因是白介素-6受体基因。

4. 根据权利要求2所述的非人动物的制作方法,非人动物以与健常人中的可溶型白介素-6受体的血中浓度同等的血中浓度表达可溶型人白介素-6受体。

5. 根据权利要求1或2所述的非人动物的制作方法,非人动物是啮齿类。

6. 根据权利要求1或2所述的非人动物的制作方法,非人动物是小鼠。

7. 根据权利要求1或2所述的非人动物的制作方法,非人动物过表达人白介素-6。

8. 受试物质的药物代谢动力学特性的评价方法,该方法包括:

工序(a),将受试物质施与通过权利要求1~7的任一项所述的方法制作的非人动物,和  
工序(b),测定施与了所述受试物质的非人动物中的受试物质的血中浓度。

9. 受试物质的从血中除去可溶型人白介素-6受体的活性的评价方法,该方法包括:

工序(a),将受试物质施与通过权利要求2~7的任一项所述的方法制作的非人动物,  
工序(b),测定施与了所述受试物质的非人动物中的可溶型人白介素-6受体的血中浓度。

10. 根据权利要求8或9所述的方法,受试物质是针对人白介素-6受体的抗体。

11. 具有所期望的药物代谢动力学特性的、针对人白介素-6受体的抗体的生产方法,该方法包括:

工序(a),生产针对人白介素-6受体的抗体,

工序(b),将所述抗体施与通过权利要求2~7的任一项所述的方法制作的非人动物,

工序(c),测定施与了所述抗体的非人动物中的所述抗体的血中浓度,和

工序(d),筛选具有所期望的血中浓度的抗体。

12. 具有从血中除去可溶型人白介素-6受体的活性的、针对人白介素-6受体的抗体的生产方法,该方法包括:

工序(a),生产针对人白介素-6受体的抗体,

工序(b),将所述抗体施与通过权利要求2~7的任一项所述的方法制作的非人动物,

工序(c),测定施与了所述抗体的非人动物中的可溶型人白介素-6受体的血中浓度,和

工序(d),筛选使可溶型人白介素-6受体的血中浓度降低的抗体。

13. 根据权利要求11或12所述的抗体的生产方法,进一步包括:工序(e),将筛选出的抗体嵌合化或人源化。

14. 用于权利要求1~7的任一项所述的非人动物的制作方法的DNA,该DNA是在编码任意外来基因的DNA的3'侧添加了编码hp7序列的DNA和编码多聚A添加信号的DNA而成的,所述hp7序列是序列表1所示的序列。

15. 用于权利要求1~7的任一项所述的非人动物的制作方法的载体,是保持在编码任意外来基因的DNA的3'侧添加了编码hp7序列的DNA和编码多聚A添加信号的DNA而成的DNA的敲入载体,所述hp7序列是序列表1所示的序列。

16. 用于权利要求1~7的任一项所述的非人动物的制作方法的转化细胞,是导入了权利要求15所述的敲入载体的转化细胞。

## 基因敲入非人动物

### 技术领域

[0001] 本发明涉及基因敲入非人动物和使用基因敲入非人动物的化合物的评价方法。

### 背景技术

[0002] 抗体药物等对分子靶标的特异性高的治疗药被大量开发,为了在之前更确切地进行临床评价,而对人源化小鼠等人源化非人动物的要求提高。作为制成人源化小鼠的方法,使小鼠表达人的基因的所谓转基因小鼠、和将小鼠基因替换为人基因的基因打靶法广为人知,通过上述方法制成的人源化小鼠被大量报告。然而,在像转基因小鼠这样单纯地导入了使人的基因表达的载体的小鼠中,大多不呈现所期待的表达模式。例如报告了使用pCAGGS载体使人白介素-6 (IL-6) 受体基因过表达而得的小鼠(非专利文献1),但该转基因小鼠由于启动子强,因而人IL-6 (hIL-6) 受体的表达水平高,在除了本来的表达部位以外的组织和/或细胞中也异位性地表达。另外,小鼠内源性的IL-6受体也表达。另一方面,在通过将小鼠基因替换为人基因的基因打靶法而制作的所谓敲入小鼠中,在将全长的人基因的编码序列插入到靶标的小鼠基因中的情况下,在转录出的mRNA中,形成在小鼠基因的终止密码子的远上游存在插入的人基因的终止密码子(提前终止密码子,premature termination codon,PTC)、并且在该终止密码子的下游存在来源于小鼠基因的外显子-外显子结合部这样的结构。由于该结构被无义介导的mRNA降解机制(NMD机制)识别而mRNA受到分解,因而多得不到目的的基因表达量。作为其对策,进行了在编码序列的紧下方添加多聚A添加信号而插入小鼠中。由此,在转录的mRNA中,形成在PTC的下游不产生来源于靶标基因的外显子-外显子结合部的结构,因此不发生NMD。然而,一般已知未被剪除的mRNA的表达量降低(非专利文献2)。这样,制成能够抑制非人动物内源性的基因表达、且以生理上妥当的水平表达外来基因的非人动物是非常困难的。

[0003] 此外,已知hp7序列是GC丰富的碱基序列,被转录成RNA时形成强固的茎环。关于hp7序列的功能,到目前为止在2篇论文中被报告。第1篇论文中报告了,在翻译起始位点的5'上游侧存在该序列的情况下,40S核糖体亚基在发夹的5'侧停止,翻译被阻碍(非专利文献3)。在最近报告的另1篇论文中记载,如果hp7序列存在于成为NMD的对象的PTC与外显子-外显子结合部之间,则NMD被抑制(非专利文献4),但其效果弱。

[0004] 现有技术文献

[0005] 非专利文献

[0006] 非专利文献1:J.Exp.Med.1995,Nov.1;182(5):1461-1468

[0007] 非专利文献2:Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.85:836-840.

[0008] 非专利文献3:Mol.Cell.Biol.1989;9:5134-5142.

[0009] 非专利文献4:Nucleic Acid Research.2012,doi:10.1093/nar/gks344

### 发明内容

[0010] 发明所要解决的课题

[0011] 本发明的目的在于提供能够使非人动物的内源性基因(靶标基因)的表达缺损、并且以生理上妥当的水平表达外来基因的非人动物,并且提供使用该动物进行的化合物的评价方法。进而本发明的目的是利用该评价方法提供具有所期望的活性的抗体的生产方法。

[0012] 用于解决课题的方法

[0013] 本发明者们为了解决上述课题,尝试了制作能够使内源性的靶标基因的表达缺损、以生理上妥当的水平表达插入的外来基因的小鼠。并且,经过深入研究的结果发现,通过在外来基因的终止密码子的下游添加hp7序列和多聚A添加信号,然后插入到小鼠的靶标基因内,可以在该小鼠中以与在人中所报告的血中浓度同等的浓度表达外来基因。

[0014] 由于插入到该小鼠中的外来基因添加了多聚A添加信号,因而从插入的外来基因产生未被剪除的mRNA。虽然如上所述,已知未被剪除的mRNA的表达量降低(非专利文献2),但在本发明中,通过使用hp7序列而能够回避这样的表达降低。

[0015] 已知通过将hp7序列插入到成为NMD的对象的PTC与外显子-外显子结合部之间来抑制NMD(非专利文献4),但在本发明中,在hp7序列的下游存在多聚A添加信号,在PTC的下游不产生外显子-外显子结合部,因而不被NMD机制识别。

[0016] 这样,在本发明中,通过使用hp7序列,能够通过除了抑制NMD机制以外的机理而以生理上妥当的水平表达外来基因,是预料外的令人惊讶的见解。

[0017] 另外,本发明者们发现,通过在小鼠的白介素-6受体基因内插入人白介素-6受体基因而得的小鼠中使人白介素6基因过表达,从而该小鼠呈现由人白介素-6或者人白介素-6受体引起的疾患的症状,该症状通过施与人源化中和抗体而被改善。在施与了该人源化中和抗体的小鼠中,可溶型人白介素-6受体的血中浓度上升,这一点也与人中的症状相同。作为进一步的优点,在施与了人源化中和抗体的小鼠中,识别该中和抗体的内源性的小鼠抗体的产生被抑制。即,本发明者们还成功地制作了显示由人白介素-6或者人白介素-6受体引起的疾患的病态的优异的模型动物。如果利用该模型动物,则能够简便地测定受试物质的疾患的治疗效果、药物代谢动力学、从血中除去可溶型人白介素-6受体的活性等。进而,通过利用这样的评价体系,能够有效地开发具有所期望的活性的抗体等。

[0018] 本发明是基于以上的见解完成的,具体包含以下[1]~[20]。

[0019] [1]非人动物,其特征在于,在存在于非人动物的基因组上的任意靶标基因的同一段阅读框中插入了DNA,所述DNA是在编码任意外来基因的DNA的3'侧添加了编码hp7序列的DNA和编码多聚A添加信号的DNA而成的。

[0020] [2]根据[1]所述的非人动物,所述外来基因是人白介素-6受体基因。

[0021] [3]根据[1]~[2]的任一项所述的非人动物,所述存在于非人动物的基因组上的任意靶标基因是白介素-6受体基因。

[0022] [4]根据[2]~[3]的任一项所述的非人动物,以与健常人中的可溶型白介素-6受体的血中浓度同等的血中浓度表达可溶型人白介素-6受体。

[0023] [5]根据[1]~[4]的任一项所述的非人动物,非人动物是啮齿类。

[0024] [6]根据[1]~[5]的任一项所述的非人动物,非人动物是小鼠。

[0025] [7]根据[1]~[6]的任一项所述的非人动物,过表达人白介素-6。

[0026] [8]受试物质的、由人白介素-6或人白介素-6受体引起的疾患的治疗效果的评价方法,该方法包括:

- [0027] 工序(a),将受试物质施与[7]所述的非人动物,和
- [0028] 工序(b),测定在施与了所述受试物质的非人动物中,由人白介素-6或人白介素-6受体引起的疾患的症状是否被抑制。
- [0029] [9]根据[8]所述的方法,由人白介素-6或人白介素-6受体引起的疾患是巨淋巴结增生症(Castleman's disease)。
- [0030] [10]受试物质的药物代谢动力学特性的评价方法,该方法包括:
- [0031] 工序(a),将受试物质施与[1]~[7]的任一项所述的非人动物,和
- [0032] 工序(b),测定施与了所述受试物质的非人动物中的受试物质的血中浓度。
- [0033] [11]受试物质的从血中除去可溶型人白介素-6受体的活性的评价方法,该方法包括:
- [0034] 工序(a),将受试物质施与[2]~[7]的任一项所述的非人动物,
- [0035] 工序(b),测定施与了所述受试物质的非人动物中的可溶型人白介素-6受体的血中浓度。
- [0036] [12]根据[7]~[11]的任一项所述的方法,受试物质是针对人白介素-6受体的抗体。
- [0037] [13]具有由人白介素-6或人白介素-6受体引起的疾患的治疗效果的、针对人白介素-6受体的抗体的生产方法,该方法包括:
- [0038] 工序(a),生产针对人白介素-6受体的抗体,
- [0039] 工序(b),将所述抗体施与[7]所述的非人动物,
- [0040] 工序(c),测定在施与了所述抗体的非人动物中,由人白介素-6或人白介素-6受体引起的疾患的症状是否被抑制,和
- [0041] 工序(d),筛选抑制由人白介素-6或人白介素-6受体引起的疾患的症状的抗体。
- [0042] [14]根据[13]所述的方法,由人白介素-6或人白介素-6受体引起的疾患是巨淋巴结增生症。
- [0043] [15]具有所期望的药物代谢动力学特性的、针对人白介素-6受体的抗体的生产方法,该方法包括:
- [0044] 工序(a),生产针对人白介素-6受体的抗体,
- [0045] 工序(b),将所述抗体施与[2]~[7]的任一项所述的非人动物,
- [0046] 工序(c),测定施与了所述抗体的非人动物中的所述抗体的血中浓度,和
- [0047] 工序(d),筛选具有所期望的血中浓度的抗体。
- [0048] [16]具有从血中除去可溶型人白介素-6受体的活性的、针对人白介素-6受体的抗体的生产方法,该方法包括:
- [0049] 工序(a),生产针对人白介素-6受体的抗体,
- [0050] 工序(b),将所述抗体施与[2]~[7]的任一项所述的非人动物,
- [0051] 工序(c),测定施与了所述抗体的非人动物中的可溶型人白介素-6受体的血中浓度,和
- [0052] 工序(d),筛选使可溶型人白介素-6受体的血中浓度降低的抗体。
- [0053] [17]根据[13]~[16]的任一项所述的抗体的生产方法,进一步包括:工序(e),将筛选出的抗体嵌合化或人源化。
- [0054] [18]用于制作[1]~[7]的任一项所述的非人动物的DNA,该DNA是在编码任意外来基因的DNA的3'侧添加了编码hp7序列的DNA和编码多聚A添加信号的DNA而成的。

[0055] [19]用于制作[1]~[7]的任一项所述的非人动物的载体,是保持[18]所述的DNA的敲入载体。

[0056] [20]用于制作[1]~[7]的任一项所述的非人动物的转化细胞,是导入了[19]所述的敲入载体的转化细胞。

[0057] 发明的效果

[0058] 本发明的敲入非人动物能够抑制非人动物内源性的基因表达,并且以生理上妥当的水平表达外来基因。因此,利用本发明的敲入非人动物,则能够适当地评价抗体药物等对分子靶标的特异性的高的治疗药。

## 附图说明

[0059] 图1A是显示小鼠白介素-6受体(IL6ra)基因的基因组DNA的结构(1)、与插入的敲入载体(2)的关系的模式图。敲入载体具有全长人白介素-6受体(hIL6R)cDNA、hp7序列、多聚A添加信号、和新霉素抗性基因。

[0060] 图1B是显示小鼠白介素-6受体基因的基因组DNA(a)与敲入载体(b)发生同源重组,而生成敲入后的基因组DNA(c)的状况的模式图。进而显示通过使(c)与重组酶Cre作用,除去新霉素抗性基因盒,从而完成人白介素-6受体基因敲入阵列(d)的过程。图中的箭头显示用于检测人白介素-6受体基因的敲入的引物的设定位置。

[0061] 图2显示对在人白介素-6受体基因敲入小鼠的建立的的过程中得到的各基因型进行分析的PCR的代表例。

[0062] 图3是显示人白介素-6受体基因敲入小鼠和野生型小鼠中的白介素-6受体的基因表达特性的图。

[0063] 图4是显示纯合型和杂合型的人白介素-6受体基因敲入小鼠和野生型小鼠的血浆中的可溶型人白介素-6受体(hsIL-6R)浓度的测定结果的图。KI/KI、KI/+和+/+分别表示纯合型敲入小鼠、杂合型敲入小鼠和野生型。

[0064] 图5是显示野生型小鼠和纯合型的人白介素-6受体基因敲入小鼠中的、对种特异性白介素-6(配基)的反应性的图。

[0065] 图6显示通过人白介素-6受体基因敲入小鼠与人白介素-6转基因小鼠的杂交而进行的双转基因小鼠建立中的、利用PCR的基因型分析的代表性检测例。

[0066] 图7是显示对人源化巨淋巴结增生症模型小鼠施与各种抗体(TCZ或者MR16-1)的施与实验中进行剖检时的脾脏重量的图。

[0067] 图8是显示对人源化巨淋巴结增生症模型小鼠施与TCZ的实验中脾脏中的浆细胞的增加的抑制效果的组织像。A:hIL6R敲入小鼠,B:未施与TCZ的人源化巨淋巴结增生症模型小鼠,C:施与了TCZ的人源化巨淋巴结增生症模型小鼠。

[0068] 图9是显示对人源化巨淋巴结增生症模型小鼠施与各种抗体(TCZ或者MR16-1)的施与实验中进行剖检时的血浆中可溶型人白介素-6受体和人白介素-6浓度的图。

[0069] 图10是显示对人源化巨淋巴结增生症模型小鼠施与各种抗体(TCZ或者R16-1)的施与实验中进行剖检时的血浆中抗TCZ抗体滴度的图。

[0070] 图11A是显示小鼠Pou5f1基因的基因组DNA的结构(1)、与插入的敲入载体(2)的关系的模式图。敲入载体中,对照载体具有新霉素抗性(neo)基因cDNA,hp7pA载体具有新霉素

抗性 (neo) 基因cDNA、hp7序列、和多聚A添加信号。敲入载体中,新霉素抗性 (neo) 基因cDNA 以其翻译起始位点与小鼠Pou5f1基因的外显子1的翻译起始位点一致的方式被插入该外显子1内。

[0071] 图11B是显示小鼠Pou5f1基因的基因组DNA (a) 与敲入载体 (b) 发生同源重组,生成敲入后的基因组DNA (c) 的状况的模式图。图中的箭头显示用于检测neo基因的敲入的引物的设定位置。

### 具体实施方式

[0072] 本发明提供非人动物,其特征在于,在存在于非人动物的基因组上的任意靶标基因的同一直读框中插入了DNA,所述DNA是在编码任意外来基因的DNA的3' 侧添加了编码hp7序列的DNA和编码多聚A添加信号的DNA而成的。

[0073] 本发明中的“外来基因”是指导入本发明的非人动物中的基因。本发明中的外来基因可以不限来源的生物种地使用。例如,在为了评价人的疾患治疗药等目的而使用本发明的非人动物的情况下,作为外来基因,优选成为疾患治疗药的靶标分子的人基因。在作为由人白介素-6或人白介素-6受体引起的疾患的模型使用本发明的非人动物的情况下,作为外来基因,特别优选人白介素-6受体基因。本发明的“人白介素-6受体基因”是编码具有通过与人白介素-6结合而在细胞膜上与信号转导分子gp130会合,从而向细胞内转导信号的功能的分子的基因。典型地,在本发明中可以使用GeneBank中以#NM\_000565的编号登记的碱基序列。

[0074] 另外,作为外来基因,还可以使用绿色荧光蛋白质 (GFP)、 $\beta$ -半乳糖苷酶等报告基因、药剂 (新霉素等) 抗性基因等的选择标志物基因。作为外来基因,还可以使用2种以上的基因的组合。这种情况下,如果预先在特定基因的两侧添加loxP序列,则可以通过与Cre作用而将该特定基因在事后除去。另外,外来基因中还可以添加调节该基因的表达的增强子等。对外来基因的形态不特别限定,例如,既可以是cDNA,也可以是基因组DNA。

[0075] 在本发明中,在编码外来基因的DNA的3' 侧添加编码hp7序列的DNA和编码多聚A添加信号的DNA。这里,“hp7序列”是GGGGCGCGTGGTGGCGGCTGCAGCCGCCACCACGCGCCCC的碱基序列 (序列号:1)。另外,“多聚A添加信号”是存在于真核生物基因的最终外显子的终止密码子的3' 下游的非翻译区、用于在mRNA的3' 末端添加约50~200个腺苷酸所需的包含6个碱基对的AATAAA的碱基序列。

[0076] 作为本发明中的“非人动物”,不特别限定,可以使用小鼠、大鼠、仓鼠等啮齿类、猴、黑猩猩等非人灵长类、兔、绵羊、牛、猪等哺乳动物、鸟类、两栖类、爬行类、鱼类等,优选为啮齿类,进一步优选为小鼠。

[0077] 本发明中的“靶标基因”是指成为插入外来基因的对象的非人动物的基因。另外,“同一阅读框”是指mRNA被翻译成蛋白质时所读取的每3个碱基的碱基序列的单元。“在同一阅读框中插入”是指以靶标基因的起始密码子ATG与外来基因的起始密码子ATG一致的方式插入外来基因。由此,非人动物中的靶标基因的启动子与插入的外来基因以能够作用的方式结合,应答该启动子的活化而外来基因表达。插入外来基因时,从使破坏的靶标基因丧失以原来的阅读框再被翻译的可能性的观点考虑,优选使靶标基因的ATG以后的序列缺损不是3的倍数的碱基数的序列。另外,本发明中,外来基因优选仅插入靶标基因本来的翻译起

始位点所存在的外显子中(即,仅与靶标基因的靶标外显子发生同源重组)。另外,在多聚A添加信号的3'下游侧存在loxP序列、Frt序列和/或Rox序列这样的重组酶的识别序列。

[0078] 本发明的非人动物,在插入的外来基因是人白介素-6受体的情况下,优选可溶型人白介素-6受体的血中浓度是与健康人中的可溶型白介素-6受体同等的浓度。这里,健康人中的可溶型白介素受体的浓度是15~70ng/ml。作为非人动物的可溶型人白介素受体的浓度的测定方法,可以使用实施例所记载的测定方法。

[0079] 本发明的非人动物,例如在作为由人白介素-6或人白介素-6受体引起的疾患的模型动物使用的情况下,优选进一步过表达人白介素-6。人白介素-6的“过表达”是指超过非人动物的白介素-6的内源性表达量而表达。作为用于使人白介素-6过表达的方法不特别限定,例如可以利用使用了主要组织相容性抗原H-2Ld基因启动子的表达载体,通过将人白介素-6基因导入非人动物的基因组内而使其过表达。作为主要组织相容性抗原H-2Ld基因启动子,可以利用文献(Miyazaki, J.-I. et al. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 83, 9537-9541)中记载的启动子。作为表达载体,只要是基因工程学中可利用的载体就不特别限定,可以使用例如质粒载体、病毒载体、粘粒载体、细菌人工染色体(BAC)、酵母人工染色体(YAC)和其他非质粒载体等。作为“由人白介素-6或人白介素-6受体引起的疾患”,可列举例如,巨淋巴结增生症(Castleman's disease)、慢性关节风湿、多发性骨髓瘤、败血症、系膜增殖性肾小球肾炎、癌性恶病质等。

[0080] 本发明还提供用于制作所述非人动物的DNA、保持所述DNA的敲入载体和导入了所述敲入载体的转化细胞。

[0081] 本发明中的、“用于制作非人动物的DNA”,是在编码任意外来基因的DNA的3'侧添加了编码hp7序列的DNA和编码多聚A添加信号的DNA而成的DNA。

[0082] 本发明的“保持DNA的敲入载体”,是具有将用于制作所述非人动物的DNA通过同源重组而插入宿主中的靶标基因区域的能力的载体,在用于制作所述非人动物的DNA的5'侧配置有5'臂(与靶标部位的5'上游的碱基序列同源的碱基序列),3'侧配置有3'臂(与靶标部位的3'下游的碱基序列同源的碱基序列)。本发明中,敲入载体以用于制作所述非人动物的DNA被插入宿主中的靶标基因的同一段阅读框中的方式被构建。敲入载体中,任意外来基因优选以其翻译起始位点与靶标基因的外显子1的翻译起始位点一致的方式被插入该外显子1内。即,敲入载体中,优选在任意外来基因的翻译起始位点的5'侧配置有靶标基因的外显子1的翻译起始位点的上游的碱基序列。

[0083] 另外,本发明的敲入载体优选具有在宿主细胞内复制的能力。这样的载体例如可以通过将用于制作所述非人动物的DNA插入公知的载体中来构建。作为公知的载体,可列举例如,质粒载体、细菌人工染色体(BAC)载体、酵母人工染色体(YAC)载体、逆转录病毒载体、慢病毒载体。

[0084] 本发明的“导入了敲入载体的转化细胞”,是导入了保持用于制作所述非人动物的DNA的敲入载体的细胞。导入了敲入载体的宿主细胞,是所述非人动物的细胞或能够分化为所述非人动物的细胞的细胞(包括细胞团)。作为这样的宿主细胞,根据目的可以使用各种细胞,可列举例如,ES细胞、iPS细胞等多能干细胞、精子干细胞等具有向生殖细胞分化的能力的生殖系列干细胞、受精卵。向所述宿主细胞导入所述敲入载体可以通过电穿孔法等公知的方法来进行。可以将所述多能干细胞通过微注射法等公知的方法注入早期胚,将其移

植到代孕母体中使其发生,从而获得嵌合动物。另外,通过使该嵌合动物繁殖,可以从其后代中获得敲入阵列被纯合体化的个体。另外,在使用生殖系列干细胞的情况下,可以将用电穿孔法等公知的方法导入敲入载体而进行靶标重组而得的细胞移植到动物的生殖巢中使其分化成生殖细胞,然后通过使该动物交配,或者利用从动物采取的生殖细胞,来制作敲入动物。关于使用了生殖系列干细胞的基因改变动物的制成方法,可以参照文献(Kanatsu-Shinohara, M. et al. (2008) Biol. Reprod. 79, 1121-1128)。在使用受精卵的情况下,可以将敲入载体和与基因组上的靶标区域的特异性靶标序列结合而切断的锌指核酸酶(Zinc Finger Nuclease, ZFN)、转录激活样效应因子核酸酶(Transcription Activator-like Effector Nuclease, TALEN)等人核酸酶和/或成簇的规律间隔的短回文重复(Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat, CRISPR)/Cas9等一起注入受精卵,将该受精卵移植到代孕母体中使其发生,从而制作敲入动物。关于使用ZFN和TALEN的方法,分别在文献(Cui, X. et al. (2011) Nat. Biotechnol. 29, 64-67)和文献(Li, T. et al. (2011) Nucleic Acids Res. 39, 6315-6325)中记载。关于使用CRISPR/Cas9的方法,在文献(Yang, H. et al. (2013) Cell. in press.)中记载。进而,可以在动物的精巢或者卵巢中注入敲入载体,通过电穿孔等方法将生殖细胞直接进行基因重组,然后进行交配等,从而获得具有敲入阵列的个体(Niu, Y. et al. (2008) J. Genet. Genomics. 35, 701-714)。

[0085] 本发明的非人动物能够用于受试物质的疾患的治疗效果、药物代谢动力学、从血中除去可溶型人白介素-6受体的活性等各种评价。因此,本发明还提供利用了这样的本发明的非人动物的受试物质的评价方法。

[0086] 作为本发明的评价方法中使用的“受试物质”,不特别限定,可列举例如肽、蛋白质、非肽性化合物、合成化合物、发酵生产物、细胞提取物等。优选为针对人白介素-6受体的抗体,可列举例如PM-1抗体(J. Immunol. 143:2900-2906, 1989)、hPM-1抗体(国际公开92/19759号公报)等。受试物质向非人动物的施与可以通过例如,尾静脉施与、皮下施与、腹腔内施与、经口施与、经鼻施与、经皮施与、经肺施与等来进行。

[0087] 作为受试物质的评价方式可列举以下方式。例如,可以通过测定在施与了受试物质的本发明的非人动物中,由人白介素-6或人白介素-6受体引起的疾患的症状是否被抑制,来评价受试物质的由人白介素-6或人白介素-6受体引起的疾患的治疗效果。在疾患的症状是否被抑制的评价中,不仅可以使本发明的非人动物(也包含通过与其他非人动物交配而得的后代),还可以使用由该非人动物采取的脏器、组织、细胞、血液等生物体材料。由人白介素-6或人白介素-6受体引起的疾患的症状是否被抑制,在例如疾患是巨淋巴结增生症的情况下,可以通过脾脏肿大的改善和脾脏重量增加的正常化等来判断。

[0088] 另外,还可以通过测定施与了受试物质的本发明的非人动物中的受试物质的血中浓度,来评价受试物质的药物代谢动力学特性。这里,“药物代谢动力学特性”是指动物体内的受试物质的有效血中浓度、血中半衰期和/或消失速度等特性。对于受试物质的血中浓度的测定方法不特别限定。在受试物质是蛋白质(包含抗体)的情况下,可列举例如ELISA法,在受试物质是低分子化合物的情况下,可列举例如液相色谱图-质谱联用(LC-MS)法。关于由血中浓度评价药物代谢动力学特性的方法论,参照文献(Igawa et al. (2010) Nat. Biotechnol. 28:1203-1207)。

[0089] 另外,还可以通过测定施与了受试物质的本发明的非人动物中的可溶型人白介

素-6受体的血中浓度,来评价受试物质的、从血中除去可溶型人白介素-6受体的活性。对于可溶型人白介素-6受体的浓度的测定方法不特别限定,可列举例如ELISA法。

[0090] 在该方法中,还可以通过进一步测定受试物质的血中浓度,来评价从血中除去可溶型人白介素-6受体所需的受试物质的用量。关于受试物质的血中浓度的测定,可以使用上述方法。

[0091] 通过利用上述本发明的受试物质的评价方法,可以有效地生产具有所期望的活性的针对人白介素-6受体的抗体。因此,本发明还提供这样的抗体的生产方法。

[0092] 在本发明的抗体的生产方法中,首先,生产针对人白介素-6受体的抗体。

[0093] 作为生产单克隆抗体的方法,代表性地可列举Kohler和Milstein的方法(Kohler& Milstein,Nature,256:495(1975))。该方法中的细胞融合工序中使用的抗体产生细胞,是被作为抗原的人白介素-6受体免疫后的动物(例如,小鼠、大鼠、仓鼠、兔、猴、山羊)的脾脏细胞、淋巴细胞、末梢血白细胞等。还可以使用在培养基中使抗原与从未被免疫的动物预先分离的上述细胞或淋巴细胞等作用而得的抗体产生细胞。作为骨髓瘤细胞可以使用公知的各种细胞株。杂交瘤,例如,通过从被抗原免疫后的小鼠得到的脾脏细胞与小鼠骨髓瘤细胞之间的细胞融合而产生,然后通过筛选而获得产生针对人白介素-6受体的单克隆抗体的杂交瘤。针对人白介素-6受体的单克隆抗体可以通过培养杂交瘤来获得,还可以从施与了杂交瘤的哺乳动物的腹水中获得。

[0094] 还可以通过从杂交瘤和/或B细胞等中克隆化编码上述抗体的DNA,整合到适当的载体中,将其导入宿主细胞(例如哺乳类细胞株、大肠杆菌、酵母细胞、昆虫细胞、植物细胞等),从而作为重组抗体而产生抗体(例如,Antibody Production:Essential Techniques,1997 WILEY、Monoclonal Antibodies,2000 OXFORD UNIVERSITY PRESS, Eur.J.Biochem.192:767-775(1990))。如果使用转基因动物制作技术来制作整合有抗体基因的转基因动物(牛、山羊、绵羊或猪等),则还可以从该转基因动物的乳汁大量获得来源于抗体基因的单克隆抗体。

[0095] 嵌合抗体例如可以如下获得:将抗原免疫小鼠,从该小鼠单克隆抗体的基因切下与抗原结合的抗体可变部(可变区),与来源于人骨髓的抗体恒定部(恒定区)基因结合,将其整合到表达载体中并导入宿主,使其产生(例如,日本特开平7-194384号公报、日本特许3238049号公报、美国专利第4816397号公报、美国专利第4816567号公报、美国专利第5807715号公报)。

[0096] 人源化抗体可以通过将非人来源的抗体的抗原结合部位(CDR)的基因序列移植(CDR移植)到人抗体基因中来制作(例如,参照日本特许2912618号、日本特许2828340号公报、日本特许3068507号公报、欧洲专利239400号公报、欧洲专利125023号公报、国际公开90/07861号公报、国际公开96/02576号公报)。

[0097] 在人抗体的制作中,可以利用能够通过免疫而产生人抗体谱的转基因动物(例如小鼠)(例如,Nature,362:255-258(1992)、Intern.Rev.Immunol,13:65-93(1995)、J.Mol.Biol,222:581-597(1991)、Nature Genetics,15:146-156(1997)、Proc.Natl.Acad.Sci.USA,97:722-727(2000)、日本特开平10-146194号公报、日本特开平10-155492号公报、日本特许2938569号公报、日本特开平11-206387号公报、日本特表平8-509612号公报、日本特表平11-505107号公报)。

[0098] 将这样生产的抗体施与本发明的非人动物,测定在施与了抗体的非人动物中,由人白介素-6或人白介素-6受体引起的疾患的症状是否被抑制,通过筛选抑制该症状的抗体,可以获得具有由人白介素-6或人白介素-6受体引起的疾患的治疗效果的、针对人白介素-6受体的抗体。

[0099] 另外,通过测定施与了生产的抗体的非人动物中的抗体的血中浓度,筛选具有所期望的血中浓度的抗体,可以获得具有所期望的体内动力学的、针对人白介素-6受体的抗体。

[0100] 进而,通过测定施与了生产的抗体的非人动物中的可溶型人白介素-6受体的血中浓度,筛选降低可溶型人白介素-6受体的血中浓度的抗体,可以获得具有从血中除去可溶型人白介素-6受体的活性的、针对人白介素-6受体的抗体。

[0101] 在这样进行了活性的评价和筛选的抗体是小鼠单克隆抗体等的情况下,将该抗体进行嵌合化或人源化,可以获得在施与人时抗原性小、进而副作用小的抗体。

[0102] 实施例

[0103] 接着,通过实施例更具体地说明本发明,但本发明不限于以下的实施例。

[0104] [实施例1] 人IL6R基因敲入小鼠的制成

[0105] (1) 敲入载体的构建

[0106] 使用克隆化有小鼠白介素-6基因(I16ra)的基因组区域的大肠杆菌人工染色体(BAC)克隆。在该BAC上的小鼠I16ra基因的靶标区域利用Red/ET系统(GeneBridges)通过同源重组而插入人白介素-6受体基因的编码序列(GeneBank#NM000565)、hp7序列、多聚A添加信号、loxP序列、新霉素抗性(neo)基因盒和loxP依次连接而成的DNA片段。此时,以使存在于BAC上的小鼠I16ra基因的外显子1的翻译起始位点与人IL6R基因的翻译起始位点一致的方式插入,并且使小鼠I16ra基因的外显子1内部的翻译起始位点以后的碱基序列缺损相当于40个碱基对。此外,作为抗药性基因的neo中添加了pgk基因的启动子,在ES细胞内neo基因表达。然而,neo基因被预测可能抑制在上游导入的hIL6R基因的表达。于是,为了能够在之后除去neo基因,在neo基因的两侧配置了loxP序列(ATAACTTCGTATAGCATACATTATACGAAGTTAT(序列号:2))。形成了一与Cre作用,则通过重组而夹在loxP序列之间的neo基因被除去的构造。接着,为了能够将敲入载体线性化,在BAC上的小鼠I16ra基因的5'侧上游的区域将限制性酶NotI识别序列(GCGGCCGC)与氨苄青霉素抗性基因一起插入。

[0107] (2) 向ES细胞的导入

[0108] 在ES细胞(来源于129SvEv小鼠)中通过电穿孔导入上述hIL6R敲入载体,通过在利用G418的选择培养之后得到的抗药性克隆,通过PCR法筛选同源重组体。对于敲入载体,将60μg用NotI进行直链化,进行酚/氯仿提取后,使其乙醇沉淀,溶解在PBS中使用。

[0109] 筛选中使用的ES细胞用96孔板培养,将每1孔用200μl的PBS溶液洗涤2次后,加入以下的组成的细胞溶解缓冲液(10×LA缓冲液II(TAKARA LA Taq用)5μl;5%NP-405μl;蛋白酶K(TAKARA,20mg/ml)4μl;蒸馏水36μl),55℃处理2小时,接着95℃处理15分钟使蛋白酶K失活,制成PCR样品。

[0110] PCR反应混合物为样品1μl、10×LA缓冲液II 2.5μl、25mM MgCl<sub>2</sub>2.5μl、dNTP(2.5mM)4μl、引物(各50μM)各0.2μl、LA Taq(TAKARA)0.25μl、和蒸馏水14.35μl(共25μl)。

另外,PCR条件为94℃5分钟的前加热、98℃10秒、68℃3分30秒的扩增循环35个循环、以及68℃7分钟的复加热。

[0111] 使用的引物如下。在发生了同源重组的ES细胞的样品中,约2.2kb的带被扩增。引物在敲入载体上的同源臂的5'上游侧的小鼠I16ra基因组区域配置P6Ra1,在hIL6R cDNA内配置hRLI6\_11638R(参照图1)。P6Ra1(前方)5'-ACAGGGCCTTAGACTCACAGC-3'(序列号:3); hRLI6\_11638R(后方)5'-AACTTGCTCCCGACACTACTGG-3'(序列号:4)。

[0112] (3) 敲入小鼠的制成

[0113] 通过胰蛋白酶处理使同源重组ES克隆悬浮,用ES细胞培养基洗涤。将通过以48小时间隔腹腔内施与5IU的马绒毛膜促性腺激素(eCG)和人绒毛膜促性腺激素(hCG)而实施了过量排卵处理的C57BL/6J(B6)的雌小鼠与同系统的雄小鼠交配。以确认了雌小鼠的阴栓的日期作为0.5日,在妊娠2.5日将子宫和输卵管进行灌注,回收8细胞期至桑椹期的胚。将回收的胚在37℃培养一夜,以在胚盘胞中发生的胚作为宿主胚注入10~15个ES细胞。注入后的胚移植到假妊娠2.5日龄的ICR系的接受体雌小鼠的子宫内,17日后获得产仔。通过向胚盘胞注入ES细胞而得的产仔的毛色的判别,得到重组ES细胞(野生色)与来源于宿主胚盘胞的细胞(黑色)混合存在的嵌合小鼠。雄嵌合小鼠在性成熟后与B6雌小鼠交配,以从下一代小鼠的尾提取的基因组DNA作为模板通过PCR法来确认敲入阵列是否转导到下一代小鼠。PCR通过在上述同源重组ES细胞的筛选时利用的方法来实现。其结果得到了检测到2.2kb的信号,确认了这些个体中转导了敲入阵列。

[0114] (4) neo基因的除去

[0115] 在通过确认了敲入阵列的转导的个体的繁殖而得的受精卵的前核中显微注射重组酶Cre表达载体,除去neo基因盒。即,通过一次性表达Cr,诱导配置于敲入阵列的2处loxP之间的重组,除去neo基因盒。Cre表达载体的显微注射后的受精卵移植到假妊娠0.5日的ICR系接受体雌小鼠的输卵管内,19日后得到产仔。neo基因盒的除去的确认,使用从产仔断奶后采取的尾提取的基因组DNA通过PCR法来实现。

[0116] PCR反应液组成为样品1μl、2×GC缓冲液I 12.5μl、dNTP(2.5mM) 4μl、引物(各50μM)各0.25μl、LA Taq(TAKARA) 0.25μl、和蒸馏水6.75μl(共25μl)。另外,PCR条件为94℃4分钟的前加热、94℃30秒、62℃30秒、72℃3分钟的扩增循环35个循环、以及72℃7分钟的复加热。

[0117] 引物的设定位置示于图1B。作为引物,使用mRLI6\_10355(5'-TCTGCAGTAGCCTTCAAAGAGC-3'(序列号:5))和mRLI6\_11166R(5'-AACCAGACAGTGTCACATTCC-3'(序列号:6))。通过PCR反应,在neo盒被除去之前的个体的样品中作为来源于敲入阵列的扩增产物检测到4.2kb和来源于野生型阵列的0.8kb的信号,与此相对,在neo盒被除去之后的个体的样品中检测到约2.7kb和来源于野生型阵列的0.8kb的信号(图2)。

[0118] (5) 敲入小鼠的建立

[0119] 通过确认了neo基因盒的除去的小鼠的繁殖,获得纯合体化有敲入阵列的个体。纯合体的确认通过PCR来进行。PCR反应与确认neo基因盒的除去时的反应体系同样地实施。以在纯合体中检测到来源于敲入阵列的2.7kb的信号、但检测不到来源野生型阵列的0.8kb的信号为指标,确认了纯合体(图2)。

[0120] (6) 人IL6R和小鼠I16ra的表达确认

[0121] -通过使用了组织RNA的RT-PCR法的确认-

[0122] 使用纯合体的敲入小鼠和野生型小鼠的组织RNA通过RT-PCR法来分析人IL6R和小鼠Il6ra的表达。从肝脏、脾脏、胸腺、肾脏、心脏和肺制备组织RNA。以各1 $\mu$ g的组织RNA作为模板,利用SuperScript II First Strand cDNA Synthesis Kit (Invitrogen),使用Oligo dT (20) 引物进行逆转录反应,从而合成cDNA。以合成的cDNA作为模板进行PCR,从而检测人IL6R和小鼠Il6ra。人IL6R的检测使用设定于作为敲入阵列中的hIL6R基因的插入位置的翻译起始位点的上游侧的5' 非翻译区的正向引物6RIK-s1 (5' -CCCGGCTGCGGAGCCGCTCTGC-3' (序列号:7)) 和人IL6R特异性的反向引物RLI6-a1 (5' -ACAGTGATGCTGGAGGTCCTT-3' (序列号:8)) 的组合来实施。另一方面,小鼠Il6ra的检测使用上述正向引物6RIK-s1和小鼠Il6ra特异性的反向引物6RLIcA2 (5' -AGCAACACCGTGAACCTCTTG-3' (序列号:9)) 的组合来实施。PCR反应液的组成为样品1 $\mu$ l、2 $\times$ GC缓冲液I 12.5 $\mu$ l、dNTP (2.5mM) 4 $\mu$ l、引物(各50 $\mu$ M) 各0.25 $\mu$ l、LA Taq (TAKARA) 0.25 $\mu$ l、和蒸馏水6.75 $\mu$ l (共25 $\mu$ l)。另外,PCR条件为94 $^{\circ}$ C 2分钟的前加热、94 $^{\circ}$ C 30秒、62 $^{\circ}$ C 30秒、72 $^{\circ}$ C 1分钟的扩增循环30个循环、以及72 $^{\circ}$ C 5分钟的复加热。人IL6R的扩增产物在880bp被检测到,小鼠Il6ra的扩增产物在846bp被检测到,在纯合体的hIL6R敲入小鼠的各组织中仅检测到人IL6R,未检测到小鼠Il6ra。另外,从野生型小鼠的各组织检测不到人IL6R,仅检测到小鼠Il6ra (图3)。由该结果确认,如设计那样,敲入载体发生同源重组,获得了代替小鼠Il6ra而人IL6R表达的小鼠。

[0123] -血浆中的人IL6R浓度的测定-

[0124] 在异氟醚吸入麻醉下开腹,使用Quantikin Human IL-6sR Immunoassay Kit (R&D Systems) 测定从由腹部大静脉采取的血液分离的血浆中的可溶型人IL6R浓度。其结果是,血浆中可溶型hIL6R浓度,在纯合型的敲入小鼠中被定量为22.1 $\pm$ 5.0 ng/ml,在杂合型敲入小鼠中被定量为11.5 $\pm$ 4.1 ng/ml。此外,在野生型小鼠中,血浆中检测不到可溶型hIL6R (图4)。在纯合型敲入小鼠中,为与在人中报告的血中浓度同等的浓度 (Nishimoto N.et.al. (2008) Blood.112:3959-3969)。

[0125] -一种特异性的配基反应性的确认-

[0126] 对纯合型敲入小鼠和野生型小鼠,以4 $\mu$ g/kg体重腹腔内施与小鼠IL6或者人IL6,其6小时后采血,使用SAA ELISA Kit (Invitrogen) 定量血中的血清淀粉样蛋白A (SAA)。此外,作为施与用IL6的溶剂,使用以小鼠血浆为0.5%添加磷酸缓冲生理盐水 (PBS) 而得的溶液,设置仅施与溶剂的对照组。其结果是,纯合型敲入小鼠仅与人IL6反应而确认了血浆SAA水平上升,但未发现对小鼠IL6的反应性 (图5)。另一方面,野生型小鼠与人IL6、小鼠IL6都反应而确认了血浆SAA水平上升 (图5)。已知小鼠Il6ra与小鼠IL6、人IL6都结合,另一方面,人IL6R与人IL6结合,但不与小鼠IL6结合,本实验的结果与该见解一致。因此明确了,在纯合型敲入小鼠中,如设计的那样,小鼠Il6ra不表达,取而代之人IL6R表达,并且发挥功能。

[0127] 由本发明中的敲入阵列所转录出的hIL6R基因的mRNA是未被剪除的结构,因而不受NMD机制分解,另一方面已知未被剪除的基因的表达量降低。然而,在本发明的hIL6R敲入小鼠中,确认了血中的可溶型hIL6R浓度与健常人的血中浓度为同等,进而也与施与的人IL6充分反应而产生SAA。这显示,与多聚A添加信号一起插入的hp7,有助于由于未被剪除的结构而本来应该降低的hIL6R表达量的稳定化。

[0128] [实施例2] 人源化巨淋巴结增生症模型小鼠的建立和评价

**[0129] (1) 人源化巨淋巴结增生症模型小鼠的建立**

**[0130]** 使hIL6R敲入小鼠与H-2Ld人IL6转基因小鼠 (Cytokine.2002,Dec.21;20(6):304-311) 交配而制成双转基因小鼠。使用从各个体的组织提取的基因组DNA通过PCR法来分析基因型,挑选具有纯合型的hIL6R敲入阵列、且具有hIL6转基因的个体。hIL6R敲入阵列的检测利用上述的PCR反应体系。即,PCR反应液组成为样品1 $\mu$ l、2 $\times$ GC缓冲液I 12.5 $\mu$ l、dNTP (2.5mM) 4 $\mu$ l、引物(各50 $\mu$ M)各0.25 $\mu$ l、LA Taq (TAKARA) 0.25 $\mu$ l、和蒸馏水6.75 $\mu$ l (共25 $\mu$ l)。另外,PCR条件是94 $^{\circ}$ C 4分钟的前加热、94 $^{\circ}$ C 30秒、62 $^{\circ}$ C 30秒、72 $^{\circ}$ C 3分钟的扩增循环35个循环、以及72 $^{\circ}$ C 7分钟的复加热。引物使用mRLI6\_10355 (5'-TCTGCAGTAGCCTTCAAAGAGC-3' (序列号:10)) 和mRLI6\_11166R (5'-AACCAGACAGTGTACATTCC-3' (序列号:11))。通过PCR反应,敲入阵列作为约2.7kb的信号被检测到,野生型阵列作为0.8kb的信号被检测到(图6)。进而,通过PCR法进行hIL6转基因的检测。即,PCR反应液组成为样品1 $\mu$ l、10 $\times$ Ex缓冲液2.5 $\mu$ l、dNTP (2.5mM) 2 $\mu$ l、引物(各50 $\mu$ M)各0.1 $\mu$ l、Ex Taq (TAKARA) 0.25 $\mu$ l、和蒸馏水19.05 $\mu$ l (共25 $\mu$ l)。PCR条件为94 $^{\circ}$ C 4分钟的前加热、94 $^{\circ}$ C 30秒、65 $^{\circ}$ C 30秒、72 $^{\circ}$ C 30秒的扩增循环35个循环、以及72 $^{\circ}$ C 7分钟的复加热。引物作为正向引物使用“5'-ACCTCTTCAGAACGAATTGACAAA-3' (序列号:12)”,作为反向引物使用“5'-AGCTGCGCAGAATGAGATGAGTTGT-3' (序列号:13)”。hIL6转基因以0.45kb的链长被检测到(图6)。在具有纯合型的hIL6R敲入阵列、且具有hIL6转基因的小鼠中,确认了巨淋巴结增生症样的症状、即全身的淋巴结的肿胀和脾脏的肿大。由以上能够建立:病态的原因是人IL6的过量产生、作为其受体的IL6R也被人源化的人源化巨淋巴结增生症模型小鼠。

**[0131] (2) 对人源化巨淋巴结增生症模型小鼠施与hIL6R特异性中和抗体的治疗效果的研究**

**[0132]** 使用上述人源化巨淋巴结增生症模型小鼠来实施能否进行hIL6R中和抗体的药效评价的研究。对人源化巨淋巴结增生症模型小鼠在4周龄时尾静脉内施与2mg/个体的人源化抗人IL6R单克隆抗体(托珠单抗、以下记为TCZ),从次周开始,在4周的期间,以2次/周频率皮下施与0.1、0.25或者0.5mg/个体的TCZ。作为比较对照,在4周龄时尾静脉内施与2mg/个体的大鼠抗小鼠IL6ra单克隆抗体(MR16-1),从次周开始,在4周的期间,以2次/周频率皮下施与0.1mg/个体的MR16-1。还设定施与溶剂生理盐水的组。进而对于IL6ra,也对野生型、且具有hIL6转基因的小鼠实施与上述同样的抗体施与。另外,使用hIL6R敲入小鼠或者IL6ra的野生型小鼠中不具有hIL6转基因的小鼠作为不发作病态的对照组,以同样的方案仅实施生理盐水的施与。此外,任一实验组均使用5只个体。最终施与4日后在异氟醚吸入麻醉下开腹,在全采血之后通过放血进行安乐死处置,采取脾脏。采取的血液分离肝素血浆,以-80 $^{\circ}$ C冰箱保存。脾脏进行重量测定,一部分作为RNA制备用而在-80 $^{\circ}$ C冻结保存,其余浸渍在10%中性缓冲福尔马林液中。

**[0133]** 不具有hIL6转基因的hIL6R敲入小鼠或者野生型小鼠的脾脏重量,在仅进行溶剂施与的情况下均为0.08 $\pm$ 0.01g,未发现由于IL6受体被人源化而对脾脏重量有影响。接着,在具有野生型IL6受体的hIL6转基因小鼠的情况下,在仅进行溶剂施与的组中,脾脏重量为0.34 $\pm$ 0.09g,确认了脾脏肿大。另一方面,在对具有hIL6转基因的hIL6R敲入小鼠(即人源化巨淋巴结增生症模型小鼠)仅进行溶剂施与的情况下,脾脏重量为0.26 $\pm$ 0.03g,即使将IL6受体人源化,也与表达小鼠型受体的小鼠同样地确认了脾脏的肿大。

[0134] 通过施与TCZ,在人源化巨淋巴结增生症模型小鼠中,脾脏的肿大显著被抑制(图7)。即,在0.1、0.25和0.5mg/个体的TCZ施与组中,脾脏重量(平均值±标准偏差)分别为 $0.14 \pm 0.03\text{g}$ 、 $0.14 \pm 0.02\text{g}$ 和 $0.13 \pm 0.03\text{g}$ ,确认了与溶剂施与组的脾脏重量 $0.26 \pm 0.03\text{g}$ 相比统计学上显著的重量降低。另一方面,MR16-1施与组的脾脏重量为 $0.34\text{mg} \pm 0.11\text{g}$ ,与溶剂施与组相比未发现显著性差异。另外,在具有野生型Il6ra的hIL6转基因小鼠中,在溶剂施与组中为 $0.34 \pm 0.09\text{g}$ ,确认了脾脏肿大,但施与TCZ在任一施与用量均未发现抑制脾脏肿大( $0.45 \pm 0.26\text{g}$ ),另一方面,在MR16-1施与组中确认了明显重量降低至 $0.12 \pm 0.01\text{g}$ 。

[0135] 在脾脏的病理组织学分析中,在人源化巨淋巴结增生症模型小鼠中确认了浆细胞的增加和白髓数的增加,但通过施与TCZ任一观察结果均未见改善(图8、表1)。

[0136] 表1

[0137] 施与和非施与托珠单抗的人源化巨淋巴结增生模型小鼠中的脾脏的病理组织学分析

观察结果	等级	<i>Il6ra</i> <sup>hIL6R/hIL6R</sup>		
		无 Tg 生理盐水	hIL6 Tg 生理盐水	hIL6 Tg TCZ*
浆细胞的增加	-	3/3	0/3	4/5
	±	0/3	2/3	1/5
	+	0/3	1/3	0/5
白髓数的增加	-	3/3	0/3	1/5
	+	0/3	0/3	4/5
	++	0/3	3/3	0/5

[0139] 等级:±,微弱;+,弱;++,中程度。

[0140] 表内数值表示确认了观察结果的动物数/评价动物数。

[0141] \*,施与托珠单抗(TCZ)

[0142] 血浆中的可溶型hIL6R浓度使用Quantikin Human IL-6sR Immunoassay Kit(R&D Systems、DR600)来测定。血浆hIL6浓度使用Human IL-6 ELISA Kit(Invitrogen、KHC0062)来测定。其结果确认了,在人型巨淋巴结增生症模型小鼠中,通过施与TCZ,血浆可溶型hIL6R浓度和hIL6浓度均明显上升(图9)。即确认了,血浆可溶型hIL6R浓度在溶剂施与组中为 $21 \pm 7\text{ng/ml}$ ,与此相对,通过0.1、0.25和0.5mg/个体的TCZ、2次/周的施与,确认了明显上升到 $713 \pm 387$ 、 $1066 \pm 126$ 和 $1120 \pm 171\text{ng/ml}$ 。另一方面,在MR16-1的施与中,血浆可溶型hIL6R浓度为 $21 \pm 2\text{ng/ml}$ ,与溶剂施与组呈现同样的浓度。血浆中hIL6浓度在溶剂施与组为 $163 \pm 112\text{pg/ml}$ ,与此相对,通过0.1、0.25和0.5mg/个体的TCZ、2次/周的施与,确认了明显上升到 $936 \pm 350$ 、 $1194 \pm 394$ 和 $1204 \pm 325\text{pg/ml}$ 。另一方面,在MR16-1的施与中,血浆hIL6浓度为 $163 \pm 36\text{pg/ml}$ ,与溶剂施与组呈现同样的浓度。

[0143] 已经报告了通过对巨淋巴结增生症患者、慢性关节风湿患者施与TCZ,血中的可溶型IL6R浓度、IL6浓度上升(Blood.2008112:3959-3969)。考察到TCZ通过与血中的可溶型IL6R形成复合体而清除延长是可溶型IL6R的血中浓度上升的原因。另外,认为也由于不与TCZ结合的IL6R的存在比率降低,因而血中的IL6浓度上升。考察到本实验中施与了TCZ的人源化巨淋巴结增生症模型小鼠中,也由于同样的机制而发生可溶型hIL6R和hIL6上升。另外,由于hIL6R敲入小鼠和人源化巨淋巴结增生症模型小鼠的血浆中hIL6R浓度与巨淋巴结

增生症患者、慢性关节风湿患者中报告的TCZ施与前的血中浓度是同样的,因而可期待成为用于预测人患者中抗原的血中水平变化的有效的模型小鼠。特别是考虑,通过监测抗体施与后的、血中的可溶型hIL6R的变化,可以评价抗体从血中除去hIL6R的功能。而且因为是小鼠这样的小实验动物,所以也可以将用于比较研究的受试抗体的必要量抑制为少量。

[0144] -血浆中抗TCZ抗体滴度的评价-

[0145] 使用剖检时所得的血浆样品测定抗TCZ抗体滴度。即,将血浆样品与生物素标记TCZ抗体和SULFO-TAG标记TCZ抗体混合,孵育一夜后,添加到MSD-链霉亲和素板上。接着,添加ECL(增强化学发光,enhanced chemiluminescence)底物测定化学发光的强度。其结果是,白介素-6受体在野生型的hIL6转基因小鼠中通过TCZ施与,在任一用量下均显示极高的抗TCZ抗体滴度,与此相对,在人源化巨淋巴结增生症模型小鼠中,TCZ的任一用量下抗TCZ抗体产生均极度被抑制(图10)。由此明确了,通过TCZ的作用而阻断来自白介素-6的信号,从而抑制抗TCZ抗体的产生。

[0146] [实施例3] 新霉素抗性基因向小鼠Pou5f1基因座的敲入

[0147] (1) 敲入载体的构建

[0148] 以使存在于小鼠Pou5f1基因的外显子1的翻译起始位点与新霉素抗性(neo)基因的翻译起始位点一致的方式插入了新霉素抗性(neo)基因,并且使小鼠Pou5f1基因的外显子1内部的翻译起始位点以后的碱基序列缺损相当于107个碱基对,从而构建敲入载体。此时,构建在neo基因的终止密码子紧下方连接了hp7序列、多聚A添加信号的hp7pA载体,以及不连接hp7序列、多聚A添加信号、而利用内源性的多聚A添加信号的对照载体。另外,作为敲入载体的同源臂,制成连接了到达Pou5f1基因的上述翻译起始位点的1.7kb上游的基因组DNA、和外显子1的缺损区域以后的约5kb的基因组DNA的结构,插入载体pMC1DTA(A+T/pau)(Yagi T.et.al.(1993)Anal Biochem.214:77-86)中。因为在敲入载体上的同源臂的5'端制作限制性酶NotI识别序列(GCGGCCGC),所以可以用NotI线性化。载体的结构示于图11A。

[0149] (2) 向ES细胞的导入

[0150] 通过电穿孔在ES细胞(来源于C57BL/6N小鼠)中导入上述的敲入载体,进行利用G418的选择培养。敲入载体用NotI线性化,酚/氯仿提取后,使其乙醇沉淀,溶解于PBS中使用。此外,以相对于ES细胞 $2 \times 10^7$ 个导入20 $\mu$ g的敲入载体的方式调节浓度,进行电穿孔。此外,对于各个载体,为了确认再现性,将对ES细胞的电穿孔各实施2次。电穿孔后接种ES细胞,从其24小时后开始,添加到培养基中使得G418为300 $\mu$ g/mL,进行选择培养。

[0151] (3) 用于检测同源重组克隆的PCR筛选

[0152] 挑取来源于hp7pA载体的ES细胞集落,研究同源重组的效率。即,将ES细胞用96孔板培养,将每1孔用200 $\mu$ l的PBS溶液洗涤2次后,加入以下组成的细胞溶解缓冲液(10 $\times$ LA缓冲液II(TAKARA LA Taq用)5 $\mu$ l;5%NP-405 $\mu$ l;蛋白酶K(TAKARA,20mg/ml)4 $\mu$ l;蒸馏水36 $\mu$ l),在55 $^{\circ}$ C处理2小时,接着在95 $^{\circ}$ C处理15分钟,从而使蛋白酶K失活,制成PCR样品。

[0153] PCR反应混合物为样品1 $\mu$ l、10 $\times$ LA缓冲液II 2.5 $\mu$ l、25mM MgCl<sub>2</sub>2.5 $\mu$ l、dNTP(2.5mM)4 $\mu$ l、引物(各50 $\mu$ M)各0.1 $\mu$ l、LA Taq(TAKARA)0.25 $\mu$ l、和蒸馏水14.55 $\mu$ l(共25 $\mu$ l)。另外,PCR条件为94 $^{\circ}$ C2分钟的前加热、98 $^{\circ}$ C10秒、60 $^{\circ}$ C15秒、接着68 $^{\circ}$ C3分钟的扩增循环35个循环、以及68 $^{\circ}$ C5分钟的复加热。

[0154] 使用的引物如下。在发生同源重组的ES细胞的样品中,约2.2kb的带被扩增。关于

引物,配置在敲入载体上的同源臂的5'上游侧的小鼠Pou5f1基因组区域配置Pou4175F2,在neo基因cDNA内配置neo8916R(参照图11B)。Pou4175F2(前方)5'-AAGTCGCTGCCTTTATTTAGGTCTTCCAACCTAA CC-3'(序列号:14);neo0891R(后方)5'-TTCAGTGACAACGTCGAGCA CAGCTGC-3'(序列号:15)。

[0155] 向Pou5f1基因区域导入neo基因敲入载体后,将成为G418抗性的ES细胞克隆数和同源重组克隆数和效率归纳于表2。

[0156] 表2

[0157] 向Pou5f1基因区域导入neo基因敲入载体的导入成绩

载体	电穿孔			克隆数		同源重组体/ G418 抗性 (%)
		ES 细胞数	载体 (μg)	G418 抗性	同源重组体	
对照 载体	1	0.6×10 <sup>7</sup>	20	0	-	-
	2	0.6×10 <sup>7</sup>	20	0	-	-
	合计			0	-	-
hp7pA 载体	1	0.6×10 <sup>7</sup>	20	82	34	41%
	2	0.6×10 <sup>7</sup>	20	85	30	35%
	合计			167	64	38%

[0159] 首先,在导入了对照载体的情况下,在接种10日后观察ES细胞集落的生育状况,结果没有得到正常生育的ES细胞集落。另一方面,在导入了hp7pA载体的情况下,观察到正常生育的ES细胞集落。

[0160] 因为两敲入载体的同源臂的链长完全相同,所以考虑通过同源重组而在靶标区域插入neo基因的效率为相同程度,但在对照载体的情况下,考虑即使neo基因插入了如期待的区域,也仅表达不足以呈现G418抗性的量的neo基因。

[0161] 在导入了hp7pA载体的情况下,得到了来自2次电穿孔的167个G418抗性克隆。将这些G418抗性克隆用上述的PCR体系进行分析的结果是,通过同源重组而敲入了neo基因的克隆为167个克隆中的64个克隆(38%)。在导入了hp7pA载体的情况下,考虑如果通过同源重组而使neo基因在内源性Pou5f1基因的靶标区域以符合翻译起始位点的方式插入,则通过在ES细胞中被活化的Pou5f1基因的启动子的控制而neo表达,形成G418抗性。另外,考虑PCR的结果为阴性的克隆中,neo基因不是存在于靶标区域、而是存在于染色体上的随机位置,被导入在ES细胞中被活化的任何基因启动子的下游。即,判断为是通过存在于其插入位置附近的启动子的活性而neo表达,获得了G418抗性的克隆。由这些结果推测,无论插入靶标区域、还是插入随机位置,通过hp7序列和多聚A添加信号的存在都会获得充分的neo基因的表达量。

[0162] 在本实验中,与Pou5f1基因的翻译起始位点一致地插入neo基因,并且使缺损的靶标基因的区域为最小限,但从用对照载体改变后的基因阵列转录出的mRNA,形成了在Pou5f1基因的终止密码子的远上游存在插入的neo基因的终止密码子(提前终止密码子, premature termination codon, PTC)、并且在该PTC的下游存在来源于Pou5f1基因的外显子-外显子结合部这样的结构。考虑该结构被无义介导的mRNA降解机制(NMD机制)所识别而

mRNA受到分解,因而得不到足以获得G418抗性的neo基因的表达量。假设在neo基因的紧下方仅添加多聚A添加信号,则在转录出的mRNA中,形成在PTC的下游不产生来源于靶标基因的外显子-外显子结合部的结构,因而NMD不发生。然而,认为由于是未被剪除的结构,因而mRNA的表达量降低的可能性高(非专利文献2)。另一方面,在neo基因的紧下方插入形成强固的茎环的hp7序列的情况下,能期待NMD可能被抑制(非专利文献4),但由非专利文献4的描述预测的单独的hp7序列的NMD抑制效果弱,不能期待基因表达的稳定化。

[0163] 考虑上述,则本次的实验结果强烈启示,在利用敲入载体而将外来基因导入靶标基因区域的情况下,通过在外来基因的紧下方插入hp7序列和多聚A添加信号两者,能够实现敲入的外来基因的表达稳定化。无论使用对照载体和hp7pA载体的任一者,在通过同源重组而在靶标区域插入了neo基因的情况下,因为5'上游区域完全相同,所以考虑在利用启动子的转录控制方面两载体无差异。即,强烈启示该neo基因的表达量的差的主要原因是,通过在mRNA的结构中同时插入位于终止密码子的下游的hp7和多聚A添加信号的两者,从而mRNA被稳定化。并且,由于插入多聚A添加信号,因而本载体的结构不引起NMD,所以考虑hp7序列的作用是由于与已知的NMD抑制效果不同的新发现的功能引起的。

[0164] 产业可利用性

[0165] 本发明提供能够使非人动物的内源性的基因(靶标基因)的表达缺损、并且以生理上妥当的水平表达外来基因的非人动物,并且提供使用该动物的化合物的评价方法。因此,本发明特别能够在对分子靶标的特异性高的治疗药的开发中利用。

[0166] 序列表自由文本

[0167] 序列号1

[0168] <223>hp7序列

[0169] 序列号3~15

[0170] <223>人工合成的引物的序列

	<110> 中外制药株式会社	
	<120> 基因敲入非人动物	
	<130> 4259P	
	<150> JP2012/201299	
	<151> 2012-09-13	
	<160> 15	
	<170> PatentIn 版本 3.1	
	<210> 1	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> hp7 序列	
	<400> 1	
	ggggcgctg gtggcgctg cagccgccac cagcgcccc	40
	<210> 2	
	<211> 34	
	<212> DNA	
[0001]	<213> P1 噬菌体	
	<400> 2	
	ataacttcgt atagcataca ttatacgaag ttat	34
	<210> 3	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工合成的引物的序列	
	<400> 3	
	acagggcctt agactcacag c	21
	<210> 4	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工合成的引物的序列	

	<400> 4	
	aacttgctcc cgacactact gg	22
	<210> 5	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工合成的引物的序列	
	<400> 5	
	tctgcagtag cettcaaaga gc	22
	<210> 6	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工合成的引物的序列	
[0002]	<400> 6	
	aaccagacag tgtcacatte c	21
	<210> 7	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工合成的引物的序列	
	<400> 7	
	cccggctgcg gagccgctct gc	22
	<210> 8	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工合成的引物的序列	
	<400> 8	
	acagtgatgc tggaggtcct t	21

	<210> 9	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工合成的引物的序列	
	<400> 9	
	agcaacaccg tgaactcctt tg	22
	<210> 10	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工合成的引物的序列	
	<400> 10	
	tctgcagtag ccttcaaaga gc	22
[0003]	<210> 11	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工合成的引物的序列	
	<400> 11	
	aaccagacag tgtcacattc c	21
	<210> 12	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工合成的引物的序列	
	<400> 12	
	acctcttcag aacgaattga caaa	24
	<210> 13	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	

	<220>		
	<223>	人工合成的引物的序列	
	<400>	13	
		agctgcgcag aatgagatga gttgt	25
	<210>	14	
	<211>	35	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	人工合成的引物的序列	
[0004]	<400>	14	
		aagtcgctgc ctttatttag gtcttccaac taacc	35
	<210>	15	
	<211>	27	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	人工合成的引物的序列	
	<400>	15	
		ttcagtgaca acgtcgagca cagctgc	27

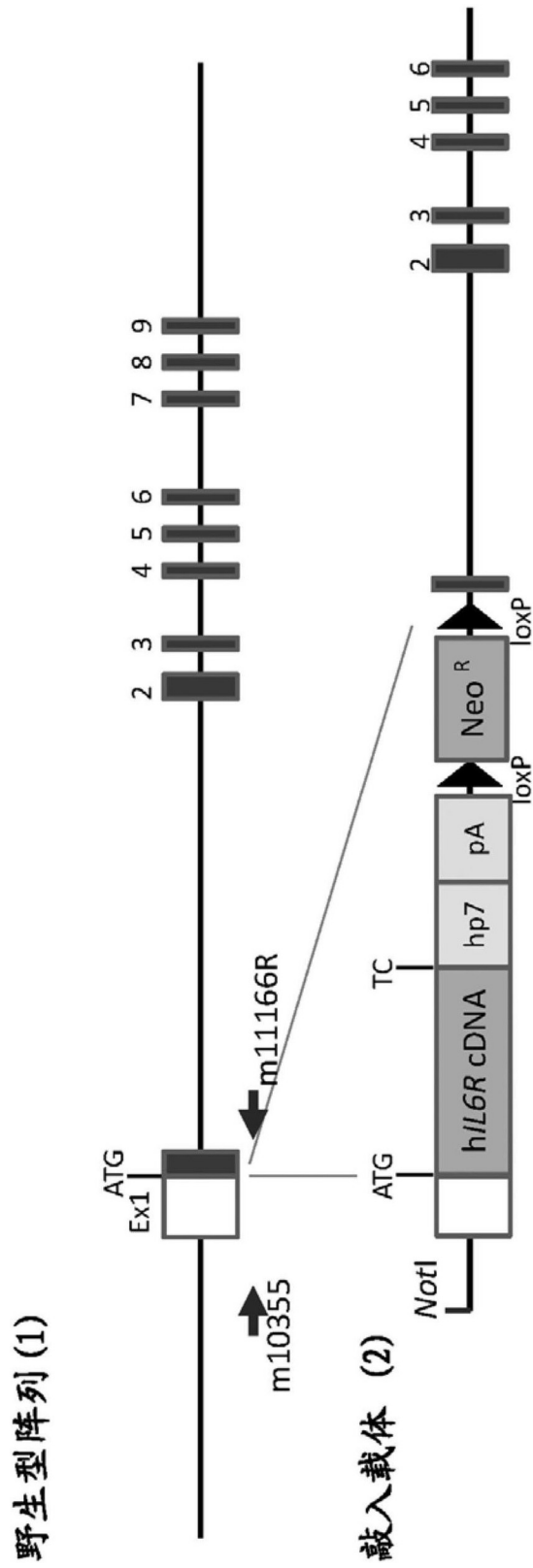


图1A

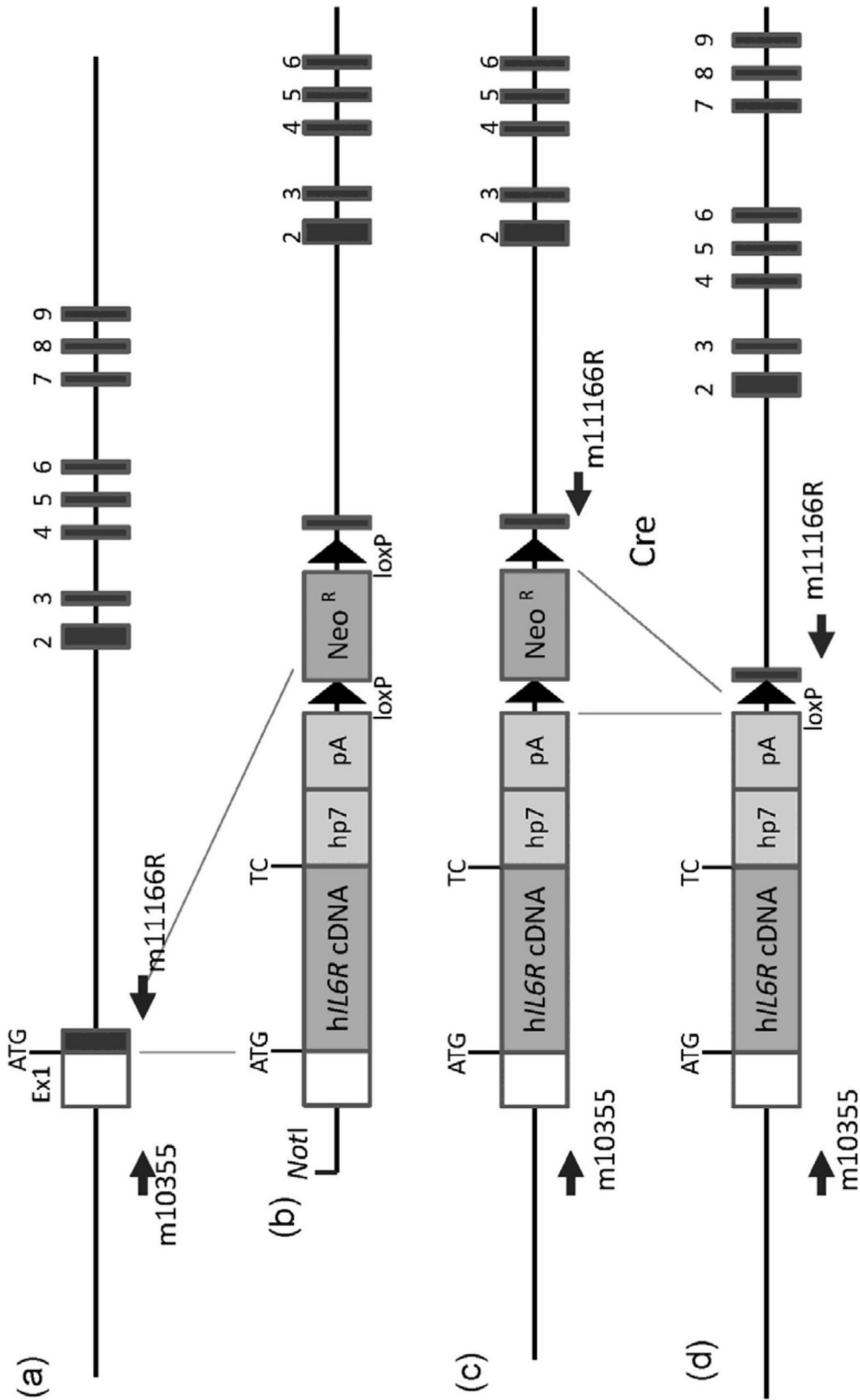


图1B

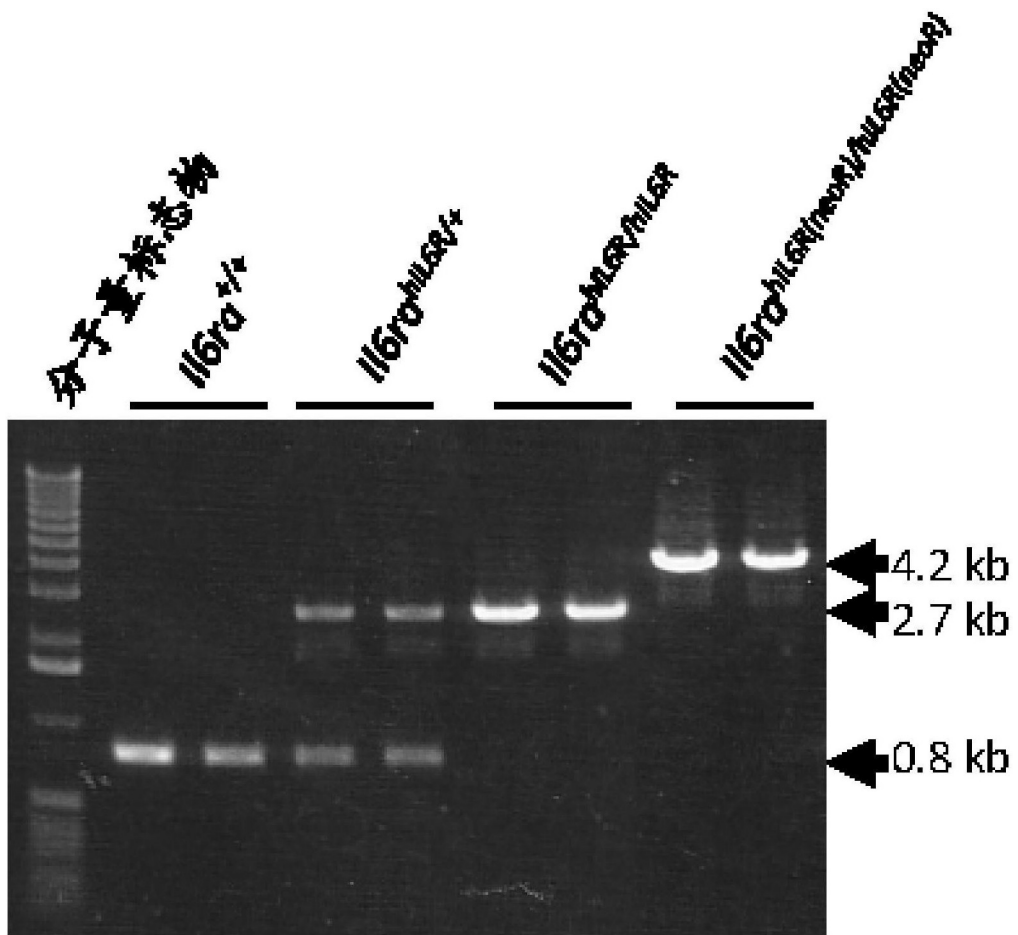


图2

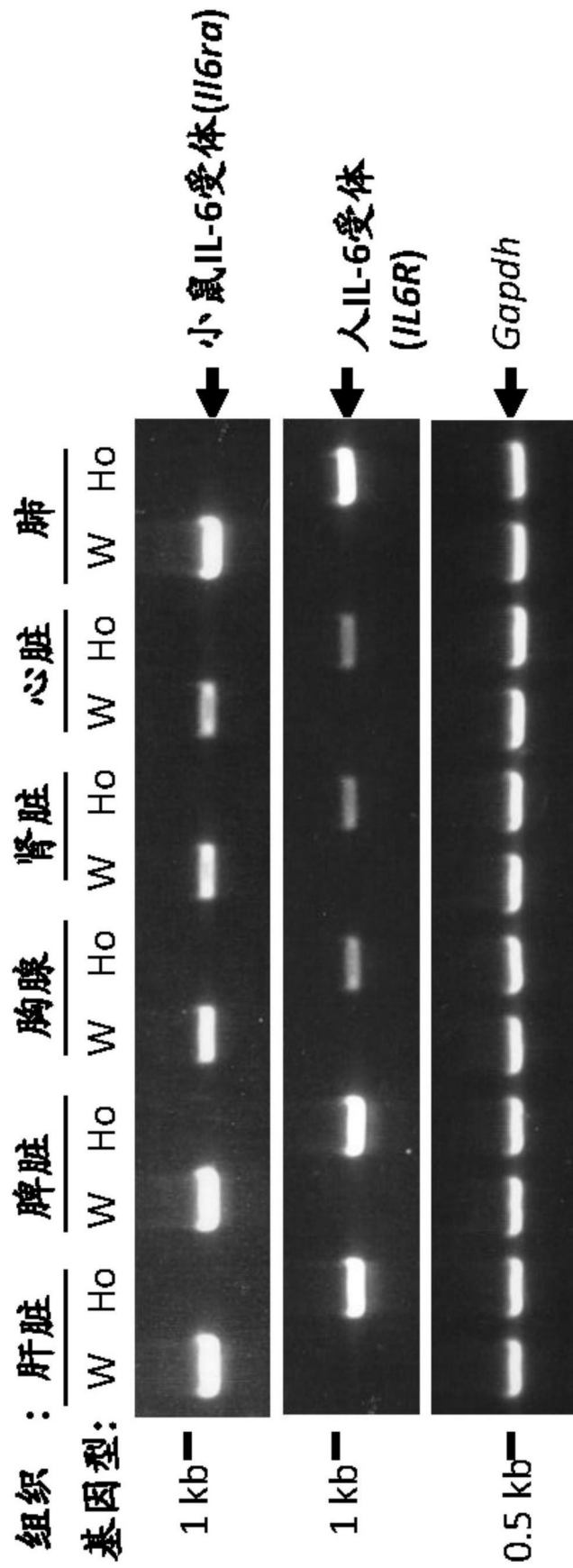


图3

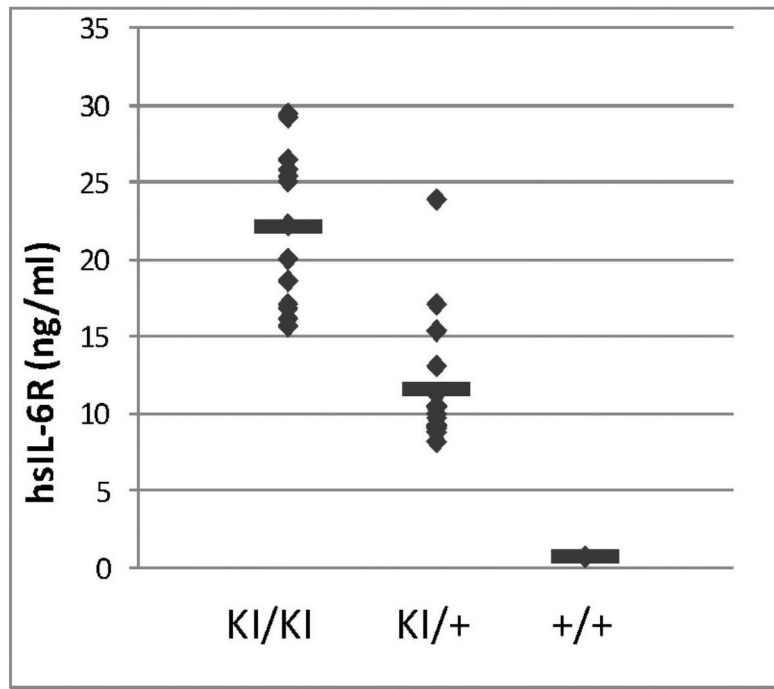


图4

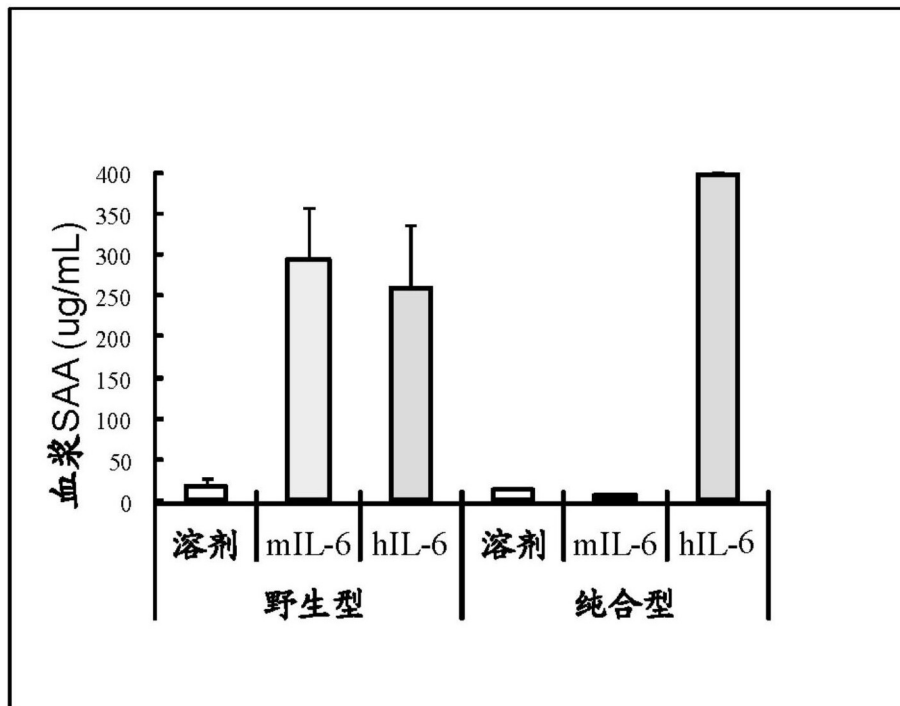


图5

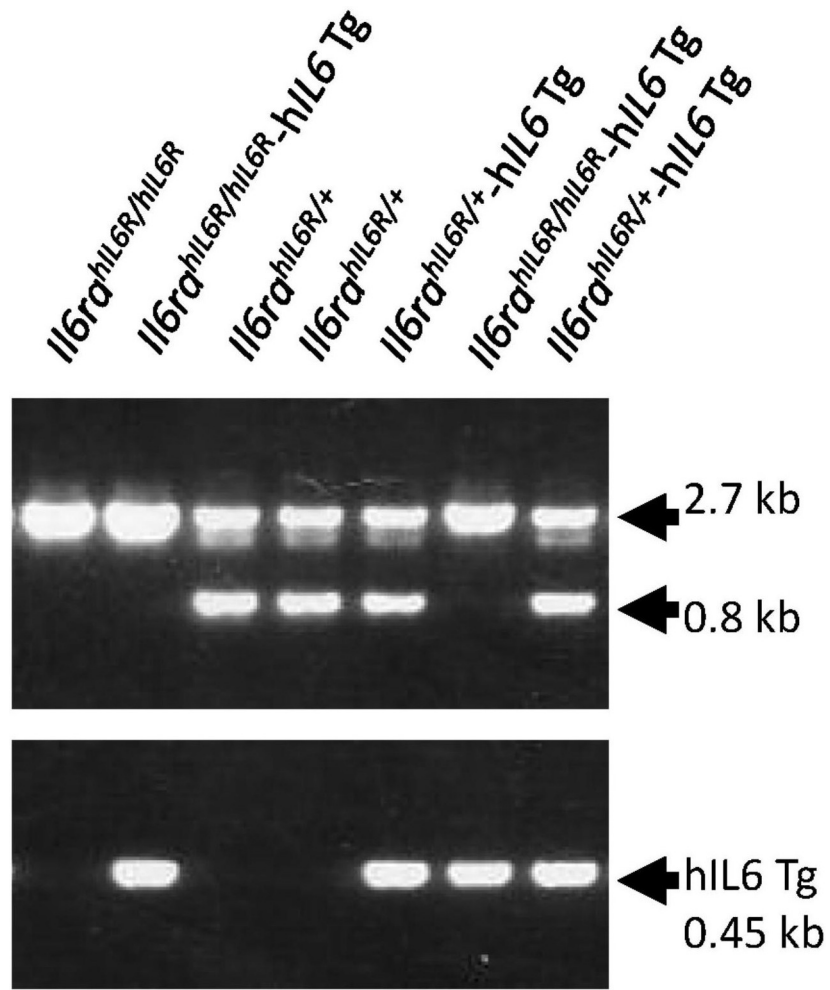


图6

脾脏重量(g)

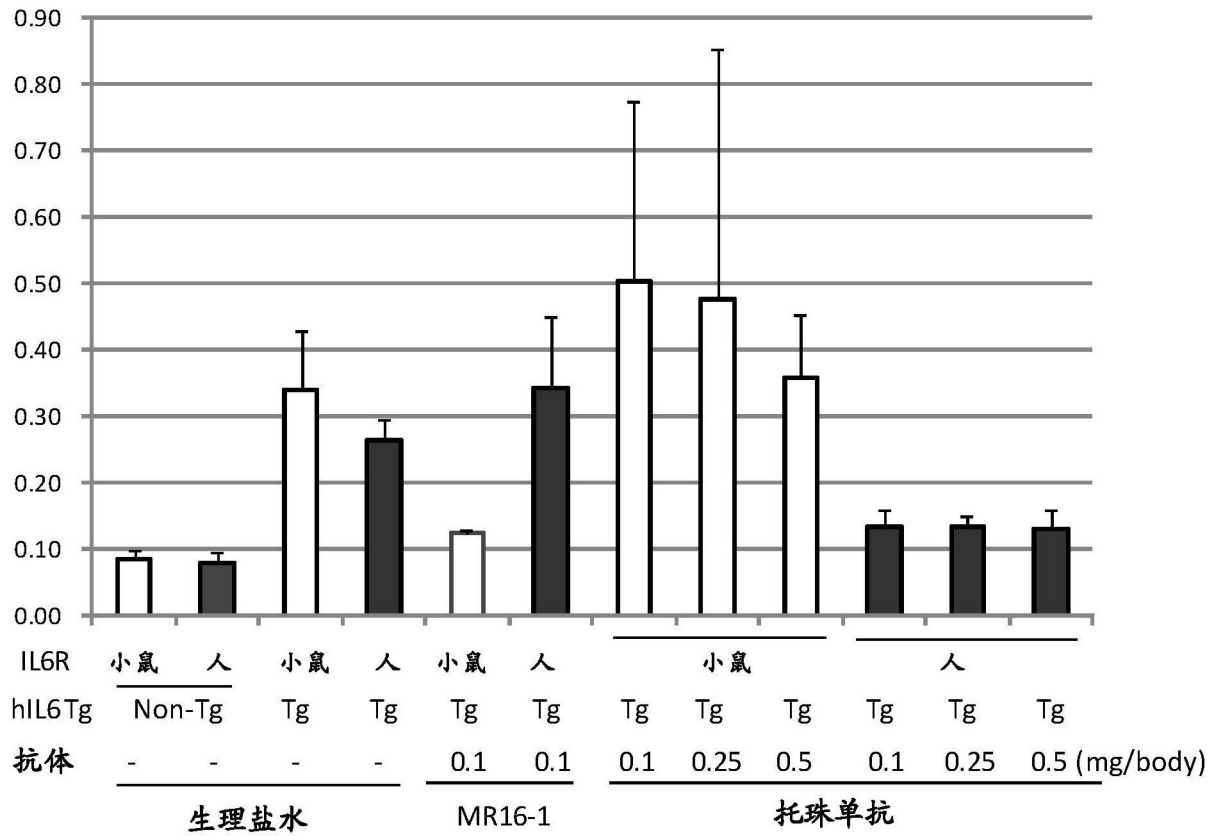


图7

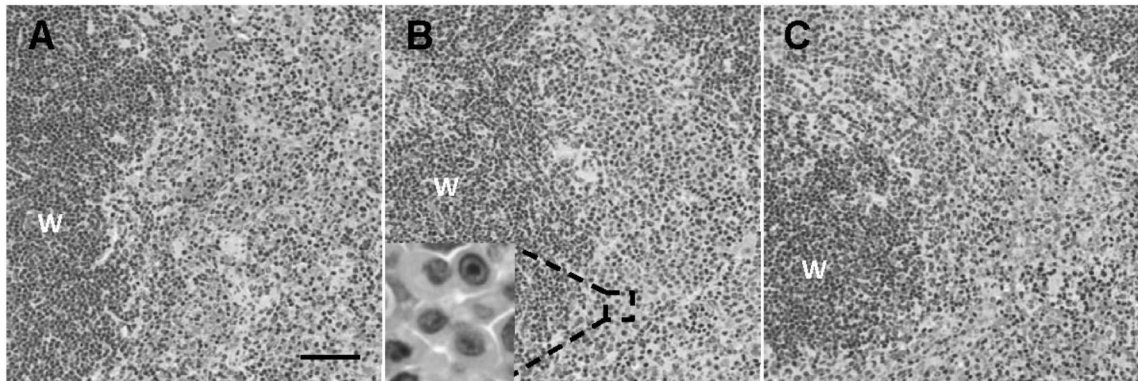


图8

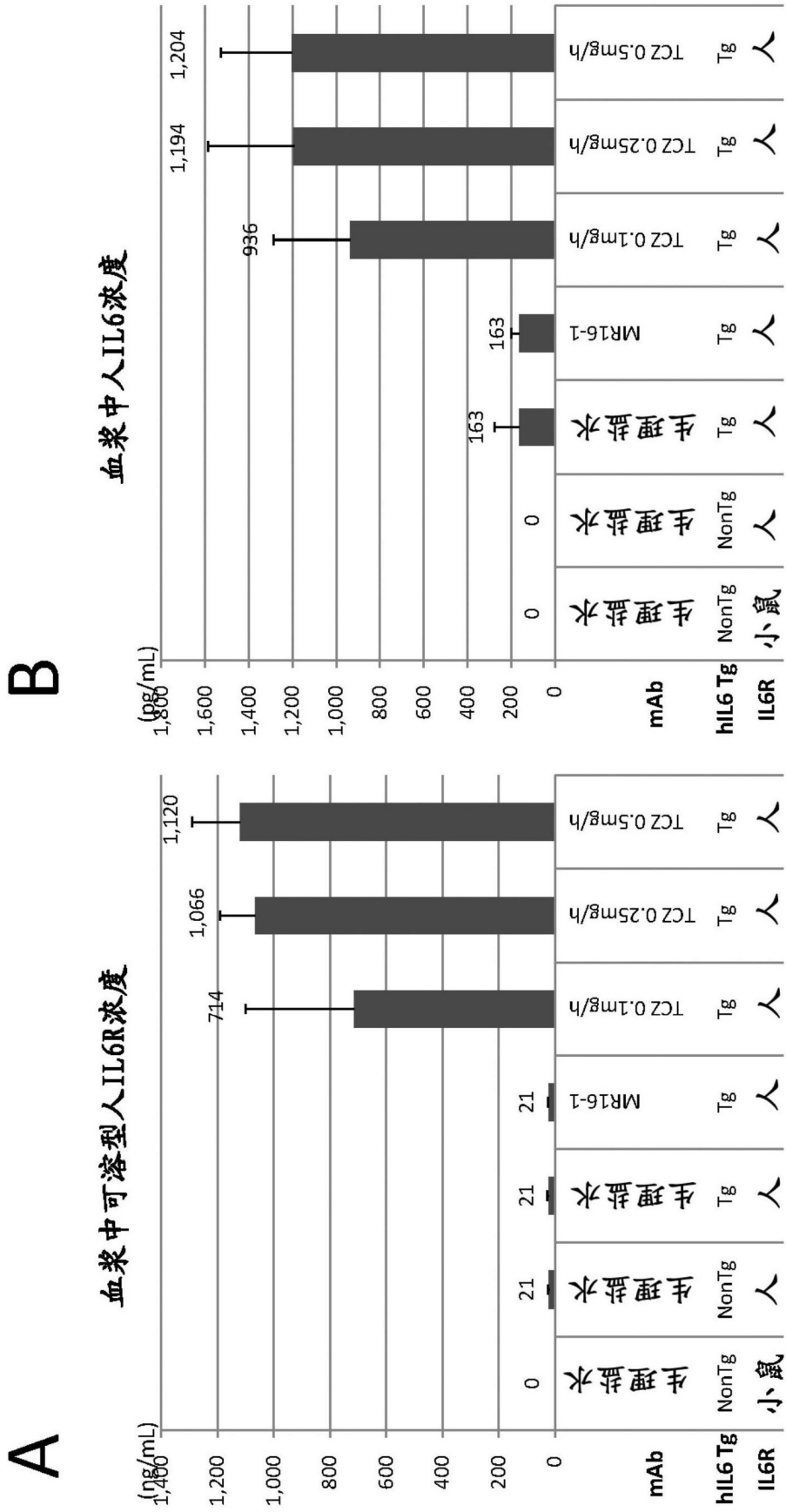


图9

抗托珠单抗抗体滴度

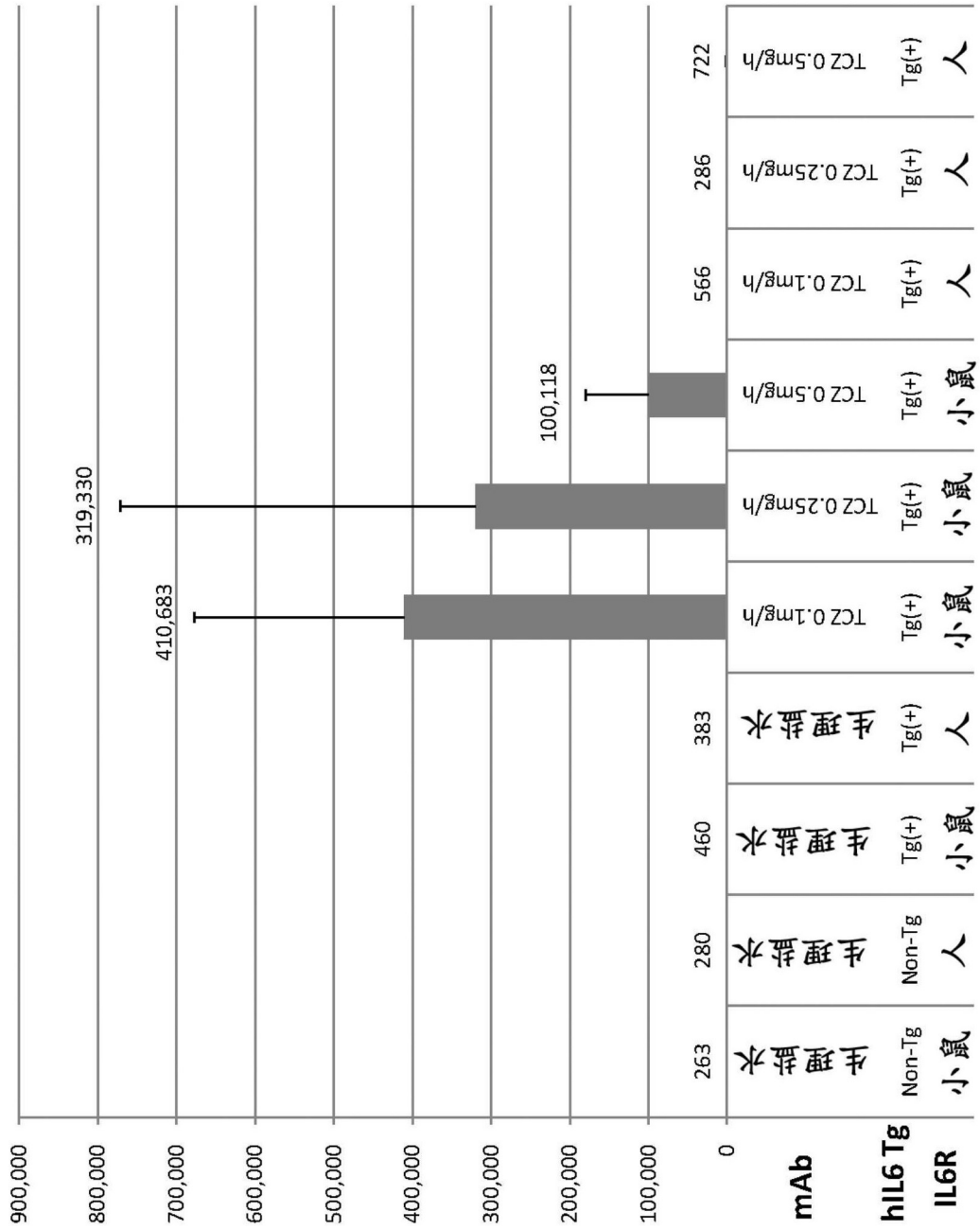


图10

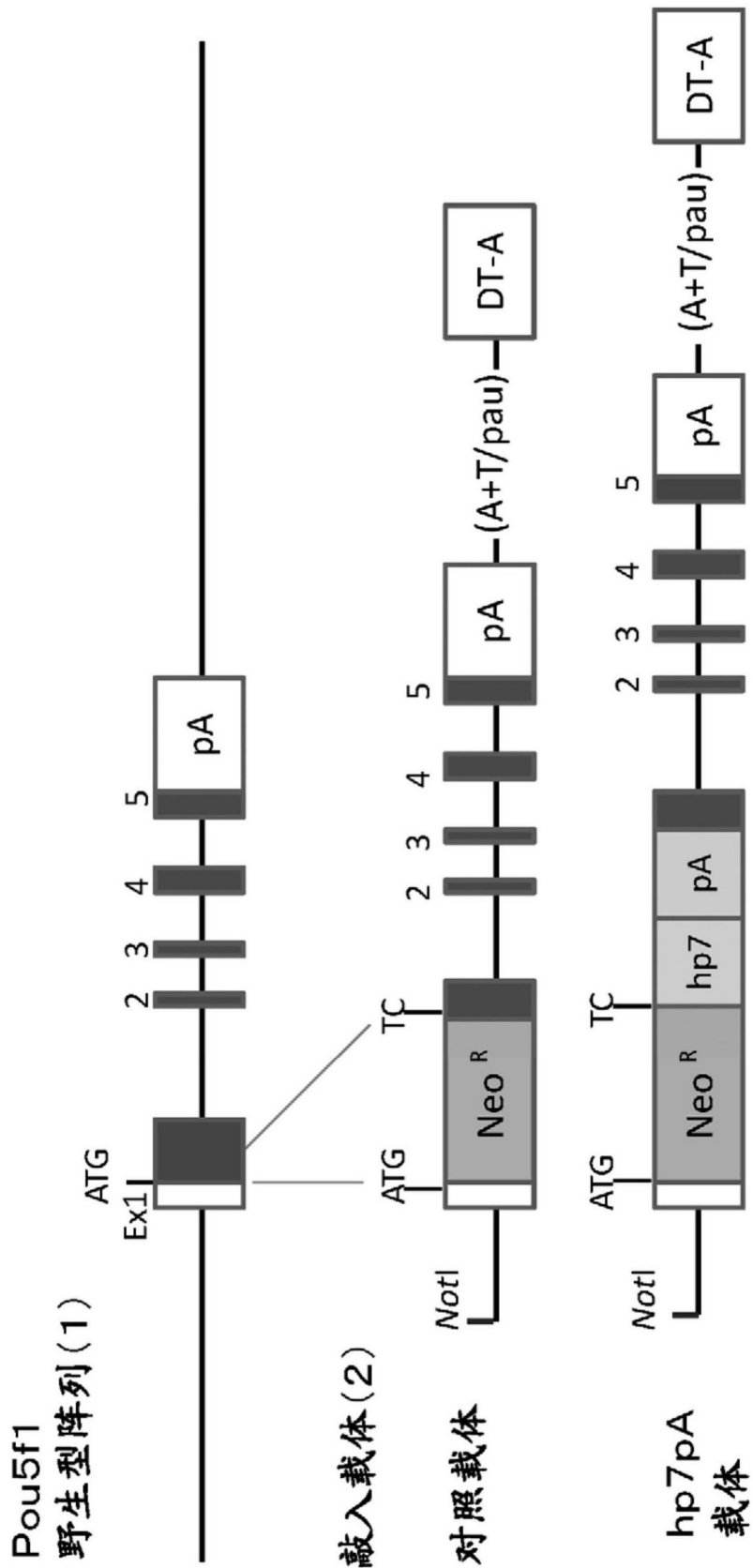


图11A

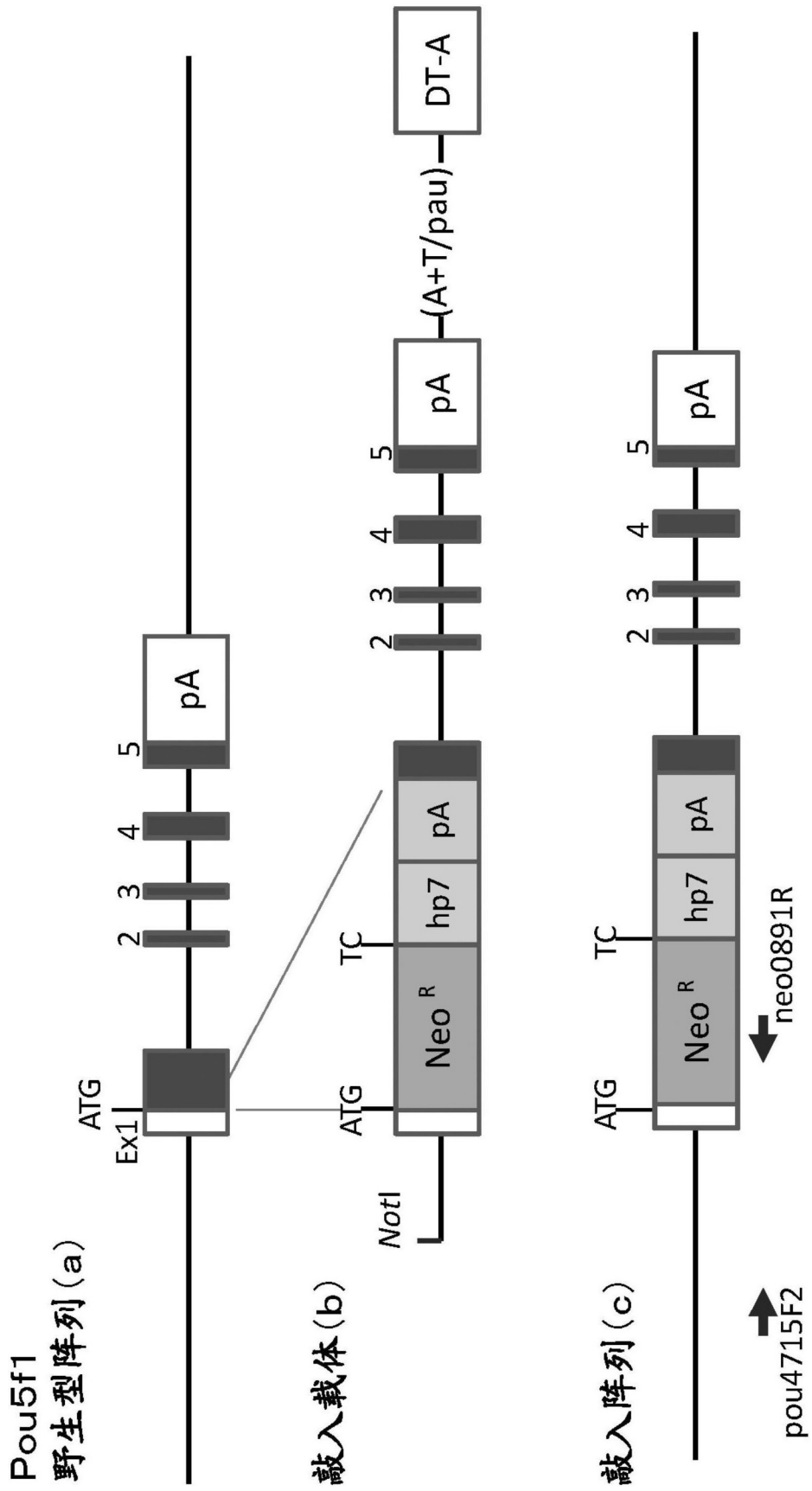


图11B