



등록특허 10-2714111



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년10월11일
(11) 등록번호 10-2714111
(24) 등록일자 2024년09월30일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/73 (2006.01) *A01K 67/027* (2024.01)
C07K 14/705 (2006.01) *C12N 15/85* (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 14/70514 (2013.01)
A01K 67/0278 (2024.01)
- (21) 출원번호 10-2023-7031201(분할)
- (22) 출원일자(국제) 2014년02월20일
심사청구일자 2023년10월12일
- (85) 번역문제출일자 2023년09월12일
- (65) 공개번호 10-2023-0135166
- (43) 공개일자 2023년09월22일
(뒷면에 계속)
- (62) 원출원 특허 10-2022-7006387
원출원일자(국제) 2014년02월20일
심사청구일자 2022년03월25일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2014/017395
- (87) 국제공개번호 WO 2014/130671
국제공개일자 2014년08월28일
- (30) 우선권주장
61/766,762 2013년02월20일 미국(US)
61/890,915 2013년10월15일 미국(US)

(56) 선행기술조사문현
US20050066375 A1*
(뒷면에 계속)

전체 청구항 수 : 총 13 항

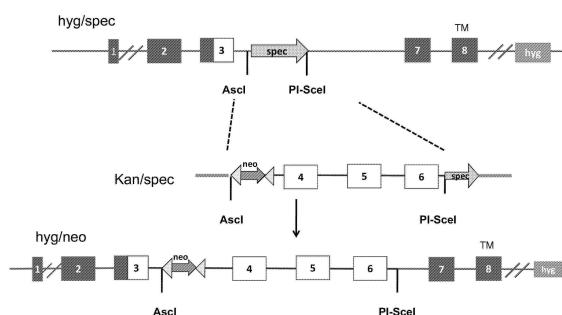
심사관 : 박영관

(54) 발명의 명칭 사람화된 T-세포 보조-수용체를 발현하는 마우스

(57) 요약

본 발명은, 키메라 사람/비-사람 T 세포 보조-수용체 폴리펩타이드(예를 들면, CD4, CD8 α , CD8 β)를 포함하는 배아, 세포, 및 조직뿐만 아니라 상기 폴리펩타이드를 발현하는 유전자 변형된 비-사람 동물을 제공한다. 또한, 상기 유전자 변형된 동물을 제조하기 위한 작제물 및 이의 제조 방법도 제공한다.

대 표 도



- (52) CPC특허분류
C07K 14/70517 (2013.01)
C12N 15/85 (2013.01)
A01K 2207/15 (2013.01)
A01K 2227/105 (2013.01)
C07K 2317/24 (2013.01)
C12N 2015/8527 (2013.01)

(72) 발명자

투 낙신

미국 뉴욕주 10570 플레전트빌 워싱턴 애비뉴 514

보로니나 베라

미국 뉴욕주 10594 쏜우드 그레이머시 플레이스 33

규레르 케이건

미국 뉴욕주 10595 발할라 파멜라 레인 8

- (56) 선행기술조사문헌
US2007209083 A1
US8084256 B2
WO2011100761 A2
US7172900 B2
Exp Med. vol.173 no.4 pp.1007-1015, 1991.
J Thromb Haemost. Suppl 1 pp.92-97, 2009.
WO2009125825 A1
US20060015957 A1
WO2010039900 A2
WO2011023971 A1
WO2011111007 A2
JP2004524841 A
JP2012021004 A
WO2011097603 A1
Nature Biotechnology, Vol. 28, No. 11, pp 1203-1207, 2010.
J. Mol. Biol. vol.270 no.4 pp.587-597, 1997.
Curr Opin Immunol.vol.20 no.4 pp.460-470, 2008.
J Biol Chem., vol.285 no.13 pp.9327-9338, 2010.

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

명세서

청구범위

청구항 1

설치류 CD4 폴리펩타이드의 적어도 D4, 막관통 및 세포질 도메인들에 작동가능하게 연결된 사람 T 세포 CD4 폴리펩타이드의 적어도 D1, D2 및 D3 도메인들을 포함하는 키메라 사람/설치류 CD4 폴리펩타이드.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 설치류는 래트인, 키메라 사람/설치류 CD4 폴리펩타이드.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 설치류는 마우스인, 키메라 사람/설치류 CD4 폴리펩타이드.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 키메라 사람/설치류 CD4 폴리펩타이드는 서열번호 4에 제시된 아미노산 서열을 포함하는, 키메라 사람/설치류 CD4 폴리펩타이드.

청구항 5

5'에서 3'으로 하기를 포함하는 키메라 사람/마우스 핵산 분자:

- (i) 마우스 CD4 유전자의 엑손 2를 포함하는 뉴클레오타이드 서열,
- (ii) 마우스 CD4 신호 펩타이드를 암호화하는 마우스 CD4 유전자의 엑손 3의 일부를 포함하는 뉴클레오타이드 서열,
- (iii) 사람 CD4 신호 펩타이드의 다운스트림에 있는 사람 CD4 폴리펩타이드를 암호화하는 사람 CD4 유전자의 엑손 3의 일부를 포함하는 뉴클레오타이드 서열,
- (iv) 사람 CD4 유전자의 엑손 4, 엑손 5 및 엑손 6을 포함하는 뉴클레오타이드 서열, 및
- (v) 마우스 CD4 유전자의 인트론 6를 포함하는 뉴클레오타이드 서열.

청구항 6

제5항에 있어서, 마우스 CD4 폴리펩타이드의 적어도 D4, 막관통 및 세포질 도메인들에 작동가능하게 연결된 사람 T 세포 CD4 폴리펩타이드의 적어도 D1, D2 및 D3 도메인들을 포함하는 키메라 사람/마우스 CD4 폴리펩타이드를 암호화하는 서열을 포함하는, 키메라 사람/마우스 핵산 분자.

청구항 7

제5항 또는 제6항에 있어서, 상기 키메라 사람/마우스 핵산 분자는 서열번호 3에 제시된 서열을 포함하는, 키메라 사람/마우스 핵산 분자.

청구항 8

제5항 또는 제6항에 있어서, 상기 키메라 사람/마우스 핵산 분자는 마우스 CD4 프로모터 서열에 작동가능하게 연결된, 키메라 사람/마우스 핵산 분자.

청구항 9

제5항 또는 제6항의 키메라 사람/마우스 핵산 분자를 포함하는 마우스 T 세포로서,

상기 마우스 T 세포는 마우스 CD4 폴리펩타이드의 적어도 D4, 막관통 및 세포질 도메인들에 작동가능하게 연결된 사람 T 세포 CD4 폴리펩타이드의 적어도 D1, D2 및 D3 도메인들을 포함하는 키메라 사람/마우스 CD4 폴리펩

타이드를 발현하고,

상기 마우스 T 세포는 HLA 클래스 I 제한된 면역 반응을 생성하기 위해 사용되는, 마우스 T 세포.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 키메라 사람/마우스 CD4 폴리펩타이드는 서열번호 4에 제시된 아미노산 서열을 포함하는, 마우스 T 세포.

청구항 11

제7항에 있어서, 상기 키메라 사람/마우스 핵산 분자는 마우스 CD4 프로모터 서열에 작동가능하게 연결된, 키메라 사람/마우스 핵산 분자.

청구항 12

제7항의 키메라 사람/마우스 핵산 분자를 포함하는 마우스 T 세포로서,

상기 마우스 T 세포는 마우스 CD4 폴리펩타이드의 적어도 D4, 막관통 및 세포질 도메인들에 작동가능하게 연결된 사람 T 세포 CD4 폴리펩타이드의 적어도 D1, D2 및 D3 도메인들을 포함하는 키메라 사람/마우스 CD4 폴리펩타이드를 발현하고,

상기 마우스 T 세포는 HLA 클래스 I 제한된 면역 반응을 생성하기 위해 사용되는, 마우스 T 세포.

청구항 13

제8항의 키메라 사람/마우스 핵산 분자를 포함하는 마우스 T 세포로서,

상기 마우스 T 세포는 마우스 CD4 폴리펩타이드의 적어도 D4, 막관통 및 세포질 도메인들에 작동가능하게 연결된 사람 T 세포 CD4 폴리펩타이드의 적어도 D1, D2 및 D3 도메인들을 포함하는 키메라 사람/마우스 CD4 폴리펩타이드를 발현하고,

상기 마우스 T 세포는 HLA 클래스 I 제한된 면역 반응을 생성하기 위해 사용되는, 마우스 T 세포.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

관련 출원에 대한 상호 참조

[0002]

본 출원은, 35 U.S.C. § 119(e) 하에, 2013년 10월 15일자로 출원된 미국 가특허출원 제61/890,915호 및 2013년 2월 20일자로 출원된 미국 가특허출원 제61/766,762호의 우선권을 주장하며, 이들 출원은 이들의 전문이 본원에 참조로 인용된다.

[0003]

서열목록

[0004]

본 명세서는, 2014년 2월 20일자로 "2010794-0441_ST25"라는 이름의 ascii.txt 파일로서 전자 양식으로 제출된 서열목록을 참조한다. .txt 파일은 2014년 2월 13일자로 작성되었고, 크기는 47kb이다.

[0005]

본 발명의 분야

[0006]

본 발명은, 사람화된 T 세포 보조-수용체를 발현하도록 유전자 조작된 비-사람 동물(예를 들면, 설치류, 예를 들면, 마우스 또는 래트)에 관한 것이다. 본 발명은, 사람화된 CD4 또는 CD8 보조-수용체를 발현하는 배아, 조직, 및 세포뿐만 아니라 이를 발현하도록 유전자 조작된 비-사람 동물에 관한 것이다. 본 발명은, 또한, 사람화된 CD4 보조-수용체와 사람화된 주요 조직적합성 복합체(Major Histocompatibility Complex; MHC) II를 공동-발현하도록 조작된 비-사람 동물에 관한 것이다. 본 발명은, 또한, 사람화된 CD8 보조-수용체와 사람화된 MHC I(예를 들면, 사람화된 T 세포 보조-수용체)를 발현하는 유전자 조작된 동물의 제조 방법도 제공된다. 사람 치료제를 개발하기 위해 사람화된 T 세포 보조-수용체를 발현하는 유전자 조작된 동물을 사용하는 방법도 제공된다.

배경 기술

[0007] 후천성 면역 반응에서, 외부 항원은 B 램프구 상의 수용체 분자(예를 들면, 면역글로불린) 및 T 램프구 상의 수용체 분자(예를 들면, T 세포 수용체 또는 TCR)에 의해 인식된다. 이를 외부 항원은, 일반적으로 주요 조직적 합성 복합체(MHC) 분자라고 칭하는 특수한 단백질에 의해 웨타이드 단편으로서 세포 표면 상에 제시된다. T 세포-매개된 반응 동안, MHC 분자에 의해 제시된 항원은 T 세포 수용체에 의해 인식된다. 그러나, 효과적인 면역 반응을 위해 T 세포 수용체 그 이상으로 MHC-항원 복합체의 인식이 필요하다. MHC의 불변부(invariant portion)에 대한 T 세포 보조-수용체 분자(예를 들면, CD4 또는 CD8)의 결합도 필요하다.

[0008] T 세포는, 헬퍼 T 세포 및 세포독성 T 세포를 포함한 몇몇의 변종으로 존재한다. 헬퍼 T 세포는, 보조-수용체 CD4를 발현하고, MHC II 분자에 결합된 항원을 인식한다. CD4+ T 세포는 면역계에서 다른 효과기 세포들을 활성화시켜, 예를 들면, MHC II 발현 B 세포를 활성화시켜, 항체를 생성하고, MHC II 발현 대식세포를 활성화시켜 병원체 등을 파괴한다. 동일한 MHC II-제시된 외부 항원에 대한 CD4 및 T 세포 수용체의 결합은 T 세포를 이 항원에 대해 상당히 더 민감하게 만든다.

[0009] 대조적으로, 세포독성 T 세포(CTL)는 보조-수용체 CD8을 발현하고 MHC I 분자에 결합된 외부 항원을 인식한다. CTL은, 이의 자체 막-결합된 TCR에 의해 인식되는 MHC I-결합된 웨타이드를 지닌 임의의 세포를 사멸시키도록 전문화되어 있다. 세포가, 보통 존재하지 않는 (예를 들면, 바이러스, 종양, 또는 기타 비-자기 기원의) 세포 성 단백질로부터 유도된 웨타이드를 나타내는 경우, 이 웨타이드가 CTL에 의해 인식되고, CTL이 활성화되어, 웨타이드를 나타내는 세포를 사멸시킨다. CD4와 유사하게, CD8의 참여는, CTL가 MHC I-제시된 항원에 더욱 민감성이 되게 한다.

[0010] 모든 항원이 내성 메커니즘으로 인해 T 세포 활성화를 유발하지는 않을 것이다. 그러나, 몇몇 질환(예를 들면, 암, 자가면역 질환)에서 자기-단백질로부터 유도된 웨타이드가 면역계의 세포 구성성분의 표적이 되고, 이것이, 이러한 웨타이드를 제시하는 세포의 파괴를 초래한다. 임상학적으로 유의한 항원(예를 들면, 다양한 유형의 암과 관련된 항원)을 인식하는데 유의한 진전이 이루어져 왔다. 그러나, 특히 임상학적으로 유의한 항원의 웨타이드에 대해 사람 T 세포에서 적합한 반응을 유발할 것인 웨타이드의 식별 및 선택을 개선시키기 위해서는, 사람 면역계의 양상을 모방하는 생체내 및 시험관내 시스템이 여전히 요구된다. 따라서, 사람 면역계의 구성성분들을 나타낼 수 있는 생물학적 시스템(예를 들면, 유전자 변형된 비-사람 동물 및 세포)이 필요하다.

발명의 내용

본 발명의 요약

[0011] 세포성 면역 반응에서 기능하는 사람 또는 사람화된 분자를 발현하는 비-사람 세포를 포함하는 비-사람 동물이 제공된다. 사람 또는 사람화된 T 세포 보조-수용체(예를 들면, CD4 및/또는 CD8) 단백질을 암호화하는 사람화된 설치류 유전자좌가 또한 제공된다. 사람 또는 사람화된 T 세포 보조-수용체(예를 들면, CD4 및/또는 CD8) 단백질을 발현하는 사람화된 설치류 세포가 또한 제공된다. 사람화된 설치류 세포(여기서, 설치류 세포는 하나 이상의 사람 또는 사람화된 면역계 분자를 발현한다)를 포함하는 생체내 및 시험관내 시스템이 제공된다.

[0012] 사람 또는 사람화된 T 세포 보조-수용체 폴리웨타이드를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 이의 계층에 포함하는, 유전자 변형된 비-사람 동물이 본원에서 제공된다. 각종 실시형태에서, 키메라 사람/비-사람 T 세포 보조-수용체 폴리웨타이드를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는, 유전자 변형된 비-사람 동물이 본원에 제공된다. 한 실시형태에서, 뉴클레오타이드 서열은 내인성 T 세포 보조-수용체 유전자좌에 존재한다. 한 실시형태에서, 키메라 T 세포 보조-수용체 폴리웨타이드의 사람 부분은 사람 T 세포 보조-수용체의 세포외 도메인의 전부 또는 실질적으로 전부를 포함하고, 비-사람 동물은 기능성 키메라 T 세포 보조-수용체 폴리웨타이드를 발현한다. 한 실시형태에서, 키메라 T 세포 보조-수용체 폴리웨타이드의 비-사람 부분은 비-사람 T 세포 보조-수용체의 적어도 막관통 및 세포질 도메인을 포함하며, 비-사람 동물은 기능성 키메라 T 세포 보조-수용체 폴리웨타이드를 발현한다. 본 발명의 한 양상에서, 키메라 T 세포 보조-수용체 폴리웨타이드는 비-사람 동물의 T 세포에서만 발현되며, 예를 들면, 이것은 비-사람 동물의 B 세포에서는 발현되지 않는다. 한 양상에서, 동물은 이의 내인성 비-사람 T 세포 보조-수용체 유전자좌로부터 기능성 비-사람 T 세포 보조-수용체를 발현하지 않는다. 본 발명의 한 양상에서, 키메라 T 세포 보조-수용체 폴리웨타이드는 비-사람 동물의 생식계열에 포함된다. 한 양상에서, 동물은 내인성 T 세포 보조-수용체 유전자좌에 키메라 T 세포 보조-수용체 폴리웨타이드를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열의 1개 또는 2개의 카페를 포함하고; 따라서, 동물은, 키메라 T 세포 보조-수용체 폴리웨타이드를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열에 대해 이형접합성이거나 동형접합성일 수 있다.

[0013] 한 실시형태에서, T 세포 보조-수용체는 CD4이다. 따라서, 한 양상에서, 본 발명은, 키메라 사람/비-사람 CD4

폴리펩타이드를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 유전자 변형된 비-사람 동물을 제공한다. 한 실시 형태에서, 뉴클레오타이드 서열은 내인성 CD4 유전자좌에 존재한다. 한 실시형태에서, 동물은 설치류, 예를 들면, 마우스 또는 래트이다. 따라서, 한 실시형태에서, 이의 내인성 CD4 유전자좌에 키메라 사람/마우스 CD4 폴리펩타이드를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 유전자 변형된 마우스가 제공되며, 여기서, 키메라 CD4 폴리펩타이드의 사람 부분은 사람 CD4 폴리펩타이드의 세포외 도메인의 전부 또는 또는 실질적으로 전부를 포함하고, 키메라 CD4 폴리펩타이드의 마우스 부분은 마우스 CD4 폴리펩타이드의 적어도 막관통 및 세포질 도메인을 포함하며, 마우스는 기능성 키메라 사람/마우스 CD4를 발현한다. 한 실시형태에서, 본원에서는 이의 내인성 CD4 유전자좌에 키메라 사람/마우스 CD4 폴리펩타이드를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 유전자 변형된 마우스가 제공되며, 여기서, 키메라 폴리펩타이드의 사람 부분은 사람 CD4 폴리펩타이드의 도메인 D1-D3의 적어도 전부 또는 실질적으로 전부를 포함하고, 키메라 폴리펩타이드의 마우스 부분은 마우스 CD4의 적어도 막관통 및 세포질 도메인을 포함하며, 마우스는 기능성 키메라 사람/마우스 CD4를 발현한다. 한 양상에서, 마우스는 이의 내인성 마우스 CD4 유전자좌로부터 기능성 내인성 마우스 CD4를 발현하지 않는다. 한 실시형태에서, 키메라 사람/마우스 CD4 폴리펩타이드를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열은 내인성 마우스 프로모터 및 조절 서열에 작동가능하게 연결된다. 따라서, 한 실시형태에서, 마우스는 CD8 계통의 B 세포 또는 T 세포에서 키메라 CD4 단백질을 발현하지 않는다. 한 실시형태에서, 키메라 CD4 단백질의 사람 부분은, 서열번호 57에 제시된 아미노산 서열을 포함한다. 한 실시형태에서, 키메라 사람/마우스 CD4 폴리펩타이드는 서열번호 4에 제시되어 있다.

[0015] 한 양상에서, 본원에 기재된 키메라 CD4 폴리펩타이드를 포함하는 유전자 변형된 비-사람 동물, 예를 들면, 유전자 변형된 마우스는 사람 또는 사람화된 MHC II 단백질을 추가로 포함하며, 여기서, MHC II 단백질은 사람 MHC II α 폴리펩타이드의 세포외 도메인 및 사람 MHC II β 폴리펩타이드의 세포외 도메인을 포함한다. 한 양상에서, 동물은 사람화된 MHC II 단백질을 포함한다. 한 실시형태에서, 동물은 마우스이고, 마우스는 내인성 MHC II 유전자좌에 (1) 키메라 사람/마우스 MHC II α 폴리펩타이드를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열(여기서, MHC II α 폴리펩타이드의 사람 부분은 사람 MHC II α 의 세포외 도메인 및 내인성 마우스 MHC II α 폴리펩타이드의 막관통 및 세포질 도메인을 포함한다), 및 (2) 키메라 사람/마우스 MHC II β 폴리펩타이드를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열(여기서, MHC II β 폴리펩타이드의 사람 부분은 사람 MHC II β 의 세포외 도메인, 및 내인성 마우스 MHC II β 폴리펩타이드의 막관통 및 세포질 도메인을 포함한다)을 포함한다. 키메라 사람/비-사람, 예를 들면, 사람/마우스, MHC II를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열(들)을 포함하는, 유전자 변형된 비-사람 동물, 예를 들면, 마우스는, 전문이 본원에 인용에 의해 포함되어 있는 미국 특허 출원 제13/661,116호 및 제13/793,935호에 보다 상세하게 기재되어 있다. 한 실시형태에서, 사람화된 CD4 및/또는 MHC II 단백질을 발현하는 동물은, 각각 CD4 및/또는 MHC II 유전자좌에서의 내인성 비-사람, 예를 들면, 마우스, CD4 및/또는 MHC II 유전자의 일부의 대체를 통해 생성된다.

[0016] 따라서, 내인성 CD4 유전자좌에서 내인성 비-사람, 예를 들면, 마우스, CD4 폴리펩타이드를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을, 키메라 사람/마우스 CD4 폴리펩타이드를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열로 대체함을 포함하는, 키메라 사람/마우스 CD4 폴리펩타이드를 발현하도록 비-사람 동물, 예를 들면, 설치류, 예를 들면, 마우스의 CD4 유전자좌를 변형시키는 방법도 제공된다. 한 실시형태에서, 키메라 사람/비-사람, 예를 들면, 사람/설치류, 예를 들면, 사람/마우스, CD4 폴리펩타이드는 사람 CD4 폴리펩타이드의 도메인 D1-D3의 적어도 전부 또는 실질적으로 전부 및 내인성 비-사람, 예를 들면, 설치류, 예를 들면, 마우스, CD4 폴리펩타이드의 적어도 막관통 및 세포질 도메인을 포함한다. 한 실시형태에서, 발현된 키메라 사람/마우스 CD4가 서열번호 4에 제시되어 있다.

[0017] 다른 실시형태에서, T 세포 보조-수용체는 CD8이다. 따라서, 한 양상에서, 본 발명은, 키메라 사람/비-사람 CD8 폴리펩타이드, 예를 들면, 키메라 사람/비-사람 CD8 α 및/또는 CD8 β 폴리펩타이드를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열(들)을 포함하는 유전자 변형된 비-사람 동물을 제공한다. 한 실시형태에서, 뉴클레오타이드 서열은 내인성 CD8 유전자좌에 존재한다. 한 실시형태에서, 동물은 설치류, 예를 들면, 마우스 또는 래트이다. 따라서, 한 실시형태에서, 이의 내인성 CD8 유전자좌(예를 들면, 내인성 CD8 α 및/또는 CD8 β 유전자좌)에 키메라 사람/마우스 CD8 α 폴리펩타이드를 암호화하는 제1 뉴클레오타이드 서열 및 키메라 사람/마우스 CD8 β 폴리펩타이드를 암호화하는 제2 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 유전자 변형된 마우스가 제공되며, 여기서, 제1 뉴클레오타이드 서열은, 사람 CD8 α 폴리펩타이드의 세포외 도메인의 전부 또는 실질적으로 전부 및 마우스 CD8 α 폴리펩타이드의 적어도 막관통 및 세포질 도메인을 암호화하는 서열을 포함하고, 제2 뉴클레오타이드 서열은, 사람 CD8 β 폴리펩타이드의 세포외 도메인의 전부 또는 실질적으로 전부 및 마우스 CD8 β 폴리펩타이드의 적어도 막관통 및 세포질 도메인을 암호화하는 서열을 포함하며, 여기서, 마우스는 기능성 키메라 사람/마우스 CD8 단

백질을 발현한다. 한 양상에서, 마우스는 이의 내인성 마우스 CD8 유전자좌로부터 기능성 내인성 마우스 CD8 폴리펩타이드를 발현하지 않는다. 한 실시형태에서, 제1 뉴클레오타이드 서열은 내인성 마우스 CD8 α 프로모터 및 조절 서열에 작동가능하게 연결되고, 제2 뉴클레오타이드 서열은 내인성 마우스 CD8 β 프로모터 및 조절 서열에 작동가능하게 연결된다. 따라서, 한 실시형태에서, 마우스는 CD4 계통의 B 세포 또는 T 세포에서 키메라 CD8 단백질을 발현하지 않는다. 한 실시형태에서, 키메라 CD8 α 및/또는 β 폴리펩타이드의 사람 부분은 사람 CD8 α 및/또는 β 폴리펩타이드의 면역글로불린 V-유사 도메인을 포함한다. 한 실시형태에서, 키메라 사람/마우스 CD8 α 폴리펩타이드의 사람 부분은 서열번호 59에 제시된 아미노산 서열을 포함한다. 한 실시형태에서, 키메라 사람/마우스 CD8 β 폴리펩타이드의 사람 부분은 서열번호 58에 제시된 아미노산 서열을 포함한다. 한 실시형태에서, 키메라 사람/마우스 CD8 α 폴리펩타이드는 서열번호 54에 제시되어 있고, 키메라 사람/마우스 CD8 β 폴리펩타이드는 서열번호 53에 제시되어 있다.

[0018] 한 양상에서, 본원에 기재된 키메라 CD8 α 및/또는 β 폴리펩타이드를 포함하는, 유전자 변형된 비-사람 동물, 예를 들면, 유전자 변형된 마우스는 사람 또는 사람화된 MHC I 단백질을 추가로 포함하며, 여기서, MHC I 단백질은 사람 MHC I 폴리펩타이드의 세포외 도메인을 포함한다. 한 양상에서, 동물은 사람화된 MHC I 복합체를 포함한다. 따라서, 동물은 사람화된 MHC I 단백질 및 사람 또는 사람화된 β 2 마이크로글로불린 폴리펩타이드를 포함할 수 있다. 한 실시형태에서, 동물은 마우스이고, 마우스는 내인성 MHC I 유전자좌에 키메라 사람/마우스 MHC I 폴리펩타이드를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하며, 여기서, MHC I 폴리펩타이드의 사람 부분은 사람 MHC I 폴리펩타이드의 세포외 도메인, 및 내인성 마우스 MHC I 폴리펩타이드의 막관통 및 세포질 도메인을 포함하고; 또한, 동물은 내인성 β 2 마이크로글로불린 유전자좌에 사람 또는 사람화된 β 2 마이크로글로불린을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 키메라 사람/비-사람, 예를 들면, 사람/마우스, MHC I 및 β 2 마이크로글로불린을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열(들)을 포함하는, 유전자 변형된 비-사람 동물, 예를 들면, 마우스는, 전문이 본원에 인용에 의해 포함되어 있는 미국 특허 출원 제13/661,159호 및 제13/793,812호에 보다 상세하게 기재되어 있다. 한 실시형태에서, 사람화된 CD8, MHC I, 및/또는 β 2 마이크로글로불린 단백질(들)을 발현하는 동물은, 각각 CD8, MHC I 및/또는 β 2 마이크로글로불린 유전자좌에서의 내인성 비-사람, 예를 들면, 마우스, CD8, MHC I, 및/또는 β 2 마이크로글로불린 유전자의 일부의 대체를 통해 생성된다.

[0019] 따라서, 내인성 CD8 유전자좌에서 내인성 비-사람, 예를 들면, 마우스, CD8 폴리펩타이드를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 키메라 사람/마우스 CD8 폴리펩타이드를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열로 대체함을 포함하는, 키메라 사람/마우스 CD8 폴리펩타이드를 발현하도록 비-사람 동물, 예를 들면, 설치류, 예를 들면, 마우스의 CD8 유전자좌를 변형시키는 방법도 제공된다. 한 양상에서, CD8 폴리펩타이드는, CD8 α , CD8 β , 및 이들의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 한 실시형태에서, 키메라 사람/비-사람, 예를 들면, 사람/설치류, 예를 들면, 사람/마우스, CD8 폴리펩타이드(CD8 α 및/또는 CD8 β)는 사람 CD8 폴리펩타이드의 세포외 도메인의 전부 또는 실질적으로 전부 및 내인성 비-사람, 예를 들면, 설치류, 예를 들면, 마우스, CD8 폴리펩타이드의 적어도 막관통 및 세포질 도메인을 포함한다.

[0020] 또한, 본원에는 본원에 기재된 비-사람 동물(예를 들면, 설치류, 예를 들면, 마우스 또는 래트)로부터 유도된 세포, 예를 들면, T 세포가 제공된다. 본원에 기재된 비-사람 동물로부터 유도된 조직 및 배아도 제공된다.

[0021] 본원에 기재된 실시형태들 및 양상들 중 어떠한 것이라도, 문맥에 달리 나타내거나 문맥으로부터 자명하지 않는 한, 서로 함께 사용될 수 있다. 다른 실시형태들은, 다음의 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용의 검토를 통해 당업계의 숙련자들에게 자명해질 것이다. 하기 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용은 본 발명의 각종 실시 형태의 예시적인 묘사를 포함하며, 이것은 청구된 바와 같이 본 발명을 제한하지 않는다. 첨부된 도면은 본 명세서의 일부를 구성하며, 상세한 설명과 함께, 실시형태들을 예시하는 역할을 할 뿐 본 발명을 제한하고자 하는 것은 아니다.

도면의 간단한 설명

[0022] **도 1**은, 사람화된 CD4 유전자좌를 생성하기 위한 전략을 개략적으로 나타낸 것이다(일정한 비율로 나타낸 것은 아님). 신호 펩타이드 바로 뒤에서 시작하는 마우스 액손 3-6의 서열을 우선 신호 펩타이드의 다운스트림의 사람 액손 3의 서열(상부)로 대체하고, 후속적으로 사람 액손 4-6을 제한 분해/연결에 의해 사람 액손 3의 다운스트림에 삽입하였다.

도 2는, WT 마우스 또는 사람 CD4에 대해 이형접합성인 마우스(1766HET)로부터 유도된 비장세포의 항-사람 CD4 및 항-마우스 CD4 항체를 사용한 FACS 분석(A); 및 WT 마우스 vs. 1766HET 마우스 vs. Jurkat 사람 CD4 T 세포

주로부터 유도된 T 세포의 FACS 분석을 보여준다.

도 3은, 마우스 CD8 β 엑손 2-3을 사람 CD8 β 엑손 2-3으로 대체함으로써 사람화된 CD8b 유전자좌(MAID 1737)를 생성하기 위한 전략을 개략적으로 나타낸 것이다(일정한 비율로 나타낸 것은 아님). 마우스 엑손 서열은 채워진(filled) 직사각형으로 나타내어져 있고, 사람 엑손 서열은 빛금 쳐진(hashed) 직사각형으로 나타내어져 있다.

도 4는, 마우스 엑손 1 및 엑손 2의 일부를 사람 엑손 2-3으로 대체하고, 엑손 1의 초반에 마우스 리더 서열을 보유함으로서, 사람화된 CD8a 유전자좌(MAID 1738)를 생성하기 위한 전략을 개략적으로 나타낸 것이다(일정한 비율로 나타낸 것은 아님). 마우스 엑손 서열은 채워진 직사각형으로 나타내어져 있고, 사람 엑손 서열은 빛금 쳐진 직사각형으로 나타내어져 있다.

도 5는, 사람화된 CD8b 및 CD8a 유전자를 암호화하는 서열을 포함하는 사람화된 유전자좌를 생성하기 위한 서열 표적화 전략을 개략적으로 나타낸 것이다(일정한 비율로 나타낸 것은 아님). 마우스 엑손 서열은 채워진 직사각형으로 나타내어져 있고, 사람 엑손 서열은 빛금 쳐진 직사각형으로 나타내어져 있다.

도 6은, 선택 카세트를 제거한 WT 마우스 또는 사람 CD8b 및 CD8a 둘 다에 대해 이형접합성인 마우스(1739 Het, 1740 Het)로부터의 비장세포의 마우스 CD8b, 마우스 CD8a, 사람 CD8b, 또는 사람 CD8a 항체를 사용한 FACS 분석이다.

도 7은, WT 또는 1739HET/1740HET 마우스(CD8b 및 CD8a 둘 다에 대해 이형접합성인 마우스)로부터 수득된 흥선 세포의 마우스 CD8b, 마우스 CD8a, 사람 CD8b, 사람 CD8a, 또는 CD4를 사용한 FACS 분석이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

정의

[0023] **정의**
본 발명은, 사람화된 T 세포 보조-수용체 폴리펩타이드를 발현하는 유전자 변형된 비-사람 동물(예를 들면, 마우스, 래트, 토끼 등); 상기 폴리펩타이드를 포함하는 배아, 세포, 및 조직; 이의 제조 방법; 및 이의 사용 방법을 제공한다. 달리 정의되지 않는다면, 본원에서 사용되는 모든 용어들 및 어구들은, 그 용어 또는 어구가 사용되는 문맥으로부터 달리 명확하게 나타내어지거나 이로부터 자명해지지 않는다면, 그 용어 및 어구가 당업계에서 획득한 의미를 포함한다.

[0024] **보존적 아미노산 치환**을 설명하기 위해 사용된 용어 "보존적"은, 유사한 화학적 성질(예를 들면, 전하 또는 소수성)을 갖는 측쇄 R 그룹을 갖는 다른 아미노산 잔기에 의한 아미노산 잔기의 치환을 포함한다. 보존적 아미노산 치환은, 보존적 치환을 암호화할 것인 뉴클레오타이드 변화를 도입하도록 뉴클레오타이드 서열을 변형시킴으로써 달성될 수 있다. 일반적으로, 보존적 아미노산 치환은 단백질의 목적하는 기능적 특성, 예를 들면, CD4 또는 CD8이 각각 MHC II 또는 MHC I에 결합하는 능력을 실질적으로 변화시키지 않고, MHC-제시된 항원에 대한 TCR의 감도를 증가시킬 것이다. 유사한 화학적 특성을 갖는 측쇄를 갖는 아미노산 그룹의 예로는 글리신, 알라닌, 발린, 류신 및 이소류신과 같은 지방족 측쇄; 세린 및 트레오닌과 같은 지방족-하이드록실 측쇄; 아스파라긴 및 글루타민과 같은 아미드-함유 측쇄; 페닐알라닌, 티로신 및 트립토판과 같은 방향족 측쇄; 리신, 아르기닌 및 히스티딘과 같은 염기성 측쇄; 아스파르트산 및 글루탐산과 같은 산성 측쇄; 및 시스테인 및 메티오닌과 같은 황-함유 측쇄가 포함된다. 보존적 아미노산 치환 그룹으로는, 예를 들면, 발린/류신/이소류신, 페닐알라닌/티로신, 리신/아르기닌, 알라닌/발린, 글루타메이트/아스파르테이트, 및 아스파라긴/글루타민이 포함된다. 몇몇 실시형태에서, 보존적 아미노산 치환은, 예를 들면, 알라닌 스캐닝 돌연변이(alanine scanning mutagenesis)에서 사용되는 바와 같이 알라닌으로의 단백질의 임의의 본래 잔기(native residue)의 치환일 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 본원에 인용에 의해 포함된 문헌[참조: Gonnet et al. ((1992) Exhaustive Matching of the Entire Protein Sequence Database, Science 256:1443-45)]에 개시된 PAM250 로그-우도(log-likelihood) 매트릭스에서 양의 값을 갖는 보존적 치환이 이루어진다. 몇몇 실시형태에서, 치환은 완만한 보존적 치환이며, 여기서, 치환은 PAM250 로그-우도 매트릭스에서 비음(nonnegative)의 값을 갖는다.

[0026] 따라서, 계놈이 (예를 들면, 내인성 유전자좌에) 사람화된 T 세포 보조-수용체 폴리펩타이드(예를 들면, CD4 또는 CD8 폴리펩타이드)를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 유전자 변형된 비-사람 동물(여기서, 폴리펩타이드는, 본원에 기재된 아미노산 서열(들)의 보존적 아미노산 치환을 포함한다)도 본 발명에 포함된다.

[0027] 당업계의 속련가는, 본원에 기재된 사람화된 T 세포 보조-수용체 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산 잔기 이외에, 유전자 암호의 축퇴성(degeneracy)으로 인해, 다른 핵산이 본 발명의 폴리펩타이드를 암호화할 수 있음을 이해

할 것이다. 따라서, 보존적 아미노산 치환을 갖는 T 세포 보조-수용체 폴리펩타이드(예를 들면, CD4 또는 CD8 폴리펩타이드)를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 이의 게놈에 포함하는 유전자 변형된 비-사람 동물 이외에, 게놈이 유전자 암호의 축퇴성으로 인해 본원에 기재된 것과는 상이한 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 비-사람 동물도 제공된다.

[0028] 서열과 관련되어 사용되는 용어 "동일성"은, 뉴클레오타이드 및/또는 아미노산 서열 동일성을 측정하기 위해 사용될 수 있는 당업계에 공지된 다수의 상이한 알고리즘에 의해 결정되는 동일성을 포함한다. 본원에 기재된 몇몇 실시형태에서, 동일성은, 10.0의 개방 갭 페널티(open gap penalty) 및 0.1의 확장 갭 페널티를 사용하는 ClustalW v. 1.83(느림) 정렬을 사용하고 Gonnet 유사성 매트릭스(MacVector™ 10.0.2, MacVector Inc., 2008)를 사용하여 결정된다. 서열의 동일성과 관련하여 비교되는 서열의 길이는 특정 서열에 따라 좌우될 것이다. 각종 실시형태에서, 동일성은, N-말단에서 C-말단까지 성숙 단백질의 서열을 비교함으로써 결정된다. 각종 실시형태에서, 키메라 사람/비-사람 서열을 사람 서열과 비교할 때, 키메라 사람/비-사람 서열의 사람 부분(비-사람 부분이 아님)은, 사람 서열과 키메라 사람/비-사람 서열의 사람 부분 사이의 동일성의 수준을 확인하기 위한 목적으로 비교하는데 사용된다(예를 들면, 키메라 사람/마우스 단백질의 사람 엑토도메인을 사람 단백질의 사람 엑토도메인과 비교함).

[0029] 서열, 예를 들면, 뉴클레오타이드 또는 아미노산 서열과 관련하여 용어 "상동성" 또는 "상동성인"이란, 최적 정렬 및 비교시, 예를 들면, 뉴클레오타이드 또는 아미노산의 적어도 약 75%, 예를 들면, 뉴클레오타이드 또는 아미노산의 적어도 약 80%, 예를 들면, 뉴클레오타이드 또는 아미노산의 적어도 약 90 내지 95%, 예를 들면, 뉴클레오타이드 또는 아미노산의 97% 이상이 동일한 2개의 서열을 의미한다. 당업계의 숙련가는, 최적의 유전자 표적화를 위해, 표적화 작제물이 내인성 DNA 서열과 상동성인 아암(즉, "상동성 아암(homology arm)")을 함유해야 하며; 따라서, 상동성 재조합이 표적화 작제물과 표적화된 내인성 서열 사이에서 발생할 수 있음을 이해할 것이다.

[0030] 용어 "작동가능하게 연결된"이란, 이렇게 기재된 구성성분들이, 의도된 방식으로 기능하도록 하는 관계에 있는 병렬 상태를 의미한다. 이와 같이, 단백질을 암호화하는 핵산 서열은 조절 서열(예를 들면, 프로모터, 인핸서, 사일런서 서열 등)에 작동가능하게 연결되어 적절한 전사 조절을 유지할 수 있다. 또한, 본 발명의 키메라 또는 사람화된 단백질의 각종 부분은, 세포에서의 단백질의 적절한 폴딩, 프로세싱, 표적화, 발현 및 다른 기능적 특성을 유지하기 위해 작동가능하게 연결될 수 있다. 달리 명시되지 않는다면, 본 발명의 키메라 또는 사람화된 단백질의 각종 도메인은 서로 작동가능하게 연결된다.

[0031] 유전자 대체와 관련하여 용어 "대체(replacement)"란, 외인성 유전 물질을 내인성 유전자좌에 배치하여 내인성 유전자의 전부 또는 일부를 이종상동성 또는 상동성 핵산 서열로 대체함을 의미한다. 하기 실시예에 입증되는 바와 같이, 마우스 CD4 또는 CD8(CD8 α 및/또는 CD8 β) 폴리펩타이드의 일부를 암호화하는 내인성 유전자좌의 핵산 서열은, 각각 사람 CD4 또는 CD8(CD8 α 및/또는 CD8 β) 폴리펩타이드의 일부를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열로 대체되었다.

[0032] 예를 들면, 기능성 폴리펩타이드와 관련하여 본원에 사용되는 "기능성"이란, 본래 단백질과 정상적으로 관련되는 하나 이상의 생물학적 활성을 보유하는 폴리펩타이드를 의미한다. 예를 들면, 본 발명의 몇몇 실시형태에서, 내인성 유전자좌에서의 대체(예를 들면, 내인성 비-사람 CD4 또는 CD8 유전자좌에서의 대체)는, 기능성 내인성 폴리펩타이드를 발현하지 못하는 유전자좌를 초래한다.

[0033] 유전자 변형된 CD4 비-사람 동물, 예를 들면, 동물 유형; 동물 스트레인; 세포 유형; 선별, 검출 또는 기타의 방법; 사용 방법; 등에 대해 하기 본원에 기재된 몇몇 양상들은, 유전자 조작된 CD8 동물에 적용가능할 것이다.

유전자 변형된 CD4 동물

[0035] 각종 실시형태에서, 본 발명은, 일반적으로 이의 게놈에, 예를 들면, 내인성 CD4 유전자좌에, 사람화된 CD4 폴리펩타이드를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 유전자 변형된 비-사람 동물을 제공하며; 따라서, 동물은 사람화된 CD4 폴리펩타이드를 발현한다.

[0036] 사람 CD4 유전자는 염색체 12에 편재되며, 10개의 엑손을 함유하는 것으로 생각된다. CD4 유전자는, 유전자의 엑손 2 및 3에 의해 암호화된 아미노-말단 소수성 신호 서열을 갖는 단백질을 암호화한다. 단백질은, 통상 D1-D4 도메인이라고 칭하는 4개의 면역글로불린-유사 도메인들을 포함한다. 문헌[Maddon et al. (1987) Structure and expression of the human and mouse T4 genes, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:9155-59]. D1 도메인은 엑손 3(신호 펩타이드의 다운스트림에 있는 서열) 및 엑손 4에 의해 암호화되는 반면, D2, D3, 및 D4는 별도의

엑손 각각 -- 엑손 5, 6, 및 7로 암호화되는 것으로 생각된다. 문헌[Littman (1987) The Structure of the CD4 and CD8 Genes, Ann. Rev. Immunol. 5:561-84; Hanna et al. (1994) Specific Expression of the Human CD4 Gene in Mature CD4+CD8- and Immature CD4+CD8+ T cells and in Macrophages of Transgenic Mice, Mol. Cell. Biol. 14(2):1084-94; Maddon et al., *supra*]. T 세포와 항원-제시 세포 사이의 접촉 부위와 같은 고단백질 농도 부위에서, 분자는 대향하는 D4 도메인들 사이의 상호작용을 통해 동형이량체화되는 경향이 있다. 문헌[Zamoyska (1998) CD4 and CD8: modulators of T cell receptor recognition of antigen and of immune responses Curr. Opin. Immunol. 10:82-87; Wu et al. (1997) Dimeric association and segmental variability in the structure of human CD4, Nature 387:527; Moldovan et al. (2002) CD4 Dimers Constitute the Functional Component Required for T Cell Activation, J. Immunol. 169:6261-68].

[0037] CD4의 D1 도메인은 면역글로불린 가변(V) 도메인과 비슷하며, D2 도메인의 일부와 함께, MHC II에 결합하는 것으로 생각된다. 문헌[Huang et al. (1997) Analysis of the contact sites on the CD4 Molecule with Class II MHC Molecule, J. Immunol. 158:216-25]. 결국, MHC II는 MHC II α 2와 β 2 도메인 사이의 접합부의 소수성 틈새에서 T 세포 보조-수용체 CD4와 상호작용한다. 문헌[Wang and Reinherz (2002) Structural Basis of T Cell Recognition of Peptides Bound to MHC Molecules, Molecular Immunology, 38:1039-49].

[0038] CD4 보조-수용체의 도메인 D3과 D4가, 이를 2개의 도메인의 치환이 CD4가 TCR에 결합하는 능력을 없애기 때문에, TCR-CD3 복합체와 상호작용하는 것으로 생각된다. 문헌[Vignali et al. (1996) The Two Membrane Proximal Domains of CD4 Interact with the T Cell Receptor, J. Exp. Med. 183:2097-2107]. CD4 분자는 이 량체로서 존재하며, 분자의 D4 도메인에서의 잔기가 CD4 이량체화의 원인이 되는 것으로 생각된다. 문헌[Moldovan et al. (2002) CD4 Dimers Constitute the Functional Components Required for T Cell Activation, J. Immunol. 169:6261-68].

[0039] CD4 유전자의 엑손 8은 막관통 도메인을 암호화하는 반면, 나머지 유전자는 세포질 도메인을 암호화한다. CD4 세포질 도메인은 다수의 뚜렷한 기능들을 갖는다. 예를 들면, CD4의 세포질 도메인은 티로신 키나제 Lck를 모집한다. Lck는, CD4 및 CD8 세포질 도메인과 관련된 Src 계열 키나제이며, 보조-수용체와 TCR이 동일한 MHC에 동시 결합하면 TCR 복합체의 ζ 쇄와 CD3의 티로신 인산화가 증가되며, 이것은 결국 T 세포 활성화에 있어서 역할을 행하는 다른 인자들의 모집을 초래한다. 이타노와 동료들(Itano and colleagues)은, CD4의 세포질 테일(tail)이 또한 형질전환 마우스에서 CD8 세포의 도메인 및 CD4 세포질 테일을 포함하는 하이브리드 단백질의 발현을 설계하고 시험함으로써 CD4+ 계통으로의 CD4+CD8+ T 세포의 분화를 촉진시킨다는 것을 제안하였다. 문헌[Itano et al. (1996) The Cytoplasmic Domain of CD4 Promotes the Development of CD4 Lineage T Cells, J. Exp. Med. 183:731-41]. 하이브리드 단백질의 발현은 MHC I-특이적 CD4 계통 T 세포의 발생을 초래한다. *Id.*

[0040] CD4 보조-수용체는, HIV 바이러스에 대한 주요 수용체이며, CD4+ T 세포 고갈이 질환 진행의 지표인 것으로 보인다. CD4의 세포질 테일은, HIV-유도된 아폽토시스에서 아폽토시스 신호를 CD4+ T 세포로 전달하는데 필수적인 것으로 보인다. 구체적으로, CD4와 Lck의 상호작용이 이를 세포에서 HIV-유도된 아폽토시스를 강화시키는 것으로 나타났다. 문헌[Corbeil et al. (1996) HIV-induced Apoptosis Requires the CD4 Receptor Cytoplasmic Tail and Is Accelerated by Interaction of CD4 with p56lck, J. Exp. Med. 183:39-48].

[0041] T 세포는 흉선에서 발생하여 미성숙 CD4-/CD8-(이중 음성 또는 DN) 흉선세포에서 CD4+/CD8+(이중 양성 또는 DP) 흉선세포로 진행하고, 이것은 결국 양성 선택(positive selection)을 거쳐 CD4+ 또는 CD8+(단일 양성 또는 SP) T 세포가 된다. MHC I-제한된 TCR을 통해 신호를 받는 DP 흉선세포는 CD8+ T 세포로 분화하는 반면, MHC II-제한된 TCR을 통해 신호를 받는 DP 흉선세포는 CD4+ T 세포로 분화한다. CD4+ 또는 CD8+ T 세포로의 분화를 유도하는 DP 세포에 의해 수용된 신호는 여러 연구들의 대상이 되어 왔다. CD4/CD8 계통 선택을 위한 각종 모델들이 제안되었으며, 문헌[참조; Singer et al. (2008) Lineage fate and intense debate: myths, models and mechanisms of CD4- versus CD8- lineage choice, Nat. Rev. Immunol. 8:788-801]에 검토되어 있다.

[0042] 양성 선택의 결과로서의 특정 T 세포 보조-수용체의 탈활성화가 전사 조절의 산물이다. CD4의 경우, CD4의 엑손 1의 13kb 업스트림에 위치한 인핸서가 CD4+ 및 CD8+ T 세포에서 CD4 발현을 상향조절하는 것으로 나타났다. 문헌[Killeen et al. (1993) Regulated expression of human CD4 rescues helper T cell development in mice lacking expression of endogenous CD4, EMBO J. 12:1547-53]. 뮤린 CD4 유전자의 제1 인트론 내에 위치한 *cis*-작용성 전사 사일런서는 CD4+ T 세포 이외의 세포에서 CD4의 발현을 침묵시키는 기능을 한다. 문헌[Siu et al. (1994) A transcriptional silencer controls the developmental expression of the CD4 gene, EMBO J. 13:3570-3579].

[0043]

사람 CD4를 발현하는 이전에 개발된 형질전환 마우스의 몇몇 스트레인에서는 CD4 계통 선택을 제어하는 중요한 전사 조절인자들(예를 들면, 프로모터, 인핸서, 사일런서 등)이 상실되어 있기 때문에, 이들 마우스는 정상적인 T 세포 계통 발생을 재현할 수 없었고, CD4를 발현하는 CD4+ T 세포 이외의 면역 세포를 생산하였다. 예를 들면, 문헌[Law et al. (1994) Human CD4 Restores Normal T Cell Development and Function in Mice Deficient in CD4, J. Exp. Med. 179:1233-42 (CD4 expression in CD8+ T cells and B cells); Fugger et al. (1994) Expression of HLA-DR4 and human CD4 transgenes in mice determines the variable region β -chain T-cell repertoire and mediates an HLA-D-restricted immune response, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91:6151-55 (CD4 expressed on all CD3+ thymocytes and B cells)]을 참조한다. 따라서, 한 실시형태에서, 동물이 정상적인 T 세포 발생 및 계통 선택을 겪을 수 있는 T 세포를 생성할 수 있도록 하기 위해 내인성 마우스 프로모터 및 기타의 조절 요소들을 보유하는 유전자 변형된 동물을 개발하는 것이 이로울 수 있다.

[0044]

따라서, 각종 실시형태에서, 본 발명은, 예를 들면, 이의 내인성 T 세포 보조-수용체 유전자좌(예를 들면, CD4 유전자좌)에, 키메라 사람/비-사람 T 세포 보조-수용체 폴리펩타이드를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는, 유전자 변형된 비-사람 동물을 제공한다. 한 실시형태에서, 키메라 폴리펩타이드의 사람 부분은 사람 T 세포 보조-수용체의 세포외 도메인의 전부 또는 실질적으로 전부를 포함한다. 한 실시형태에서, 키메라 폴리펩타이드의 비-사람 부분은 비-사람 T 세포 보조-수용체의 막관통 및 세포질 도메인을 포함한다. 한 실시형태에서, 비-사람 동물은 기능성 키메라 T 세포 보조-수용체 폴리펩타이드를 발현한다. 따라서, 한 양상에서, 본 발명은 이의 내인성 CD4 유전자좌에 키메라 사람/비-사람 CD4 폴리펩타이드를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 유전자 변형된 비-사람 동물을 제공하며, 여기서, 키메라 폴리펩타이드의 사람 부분은 사람 CD4의 세포외 도메인의 전부 또는 실질적으로 전부를 포함하고, 비-사람 부분은 비-사람 CD4의 적어도 막관통 및 세포질 도메인을 포함하며, 여기서, 동물은 기능성 키메라 CD4 폴리펩타이드를 발현한다. 한 양상에서, 비-사람 동물은 사람화된 CD4 폴리펩타이드, 즉, 키메라 사람/비-사람 CD4 폴리펩타이드만을 발현하고, 이의 내인성 CD4 유전자좌로부터 기능성 내인성 비-사람 CD4 단백질을 발현하지는 않는다.

[0045]

한 실시형태에서, 키메라 사람/비-사람 CD4 폴리펩타이드의 사람 부분은 사람 CD4 폴리펩타이드의 세포외 도메인의 전부 또는 실질적으로 전부를 포함한다. 다른 실시형태에서, 키메라 사람/비-사람 CD4 폴리펩타이드는 사람 CD4 폴리펩타이드의 MHC II 결합 도메인(예를 들면, D1 및 D2 도메인의 상당 부분)의 적어도 전부 또는 실질적으로 전부를 포함하고; 한 실시형태에서, 키메라 사람/비-사람 CD4 폴리펩타이드의 사람 부분은 사람 CD4 폴리펩타이드의 D1, D2, 및 D3 도메인의 전부 또는 실질적으로 전부를 포함하며; 또 다른 실시형태에서, 키메라 사람/비-사람 CD4 폴리펩타이드의 사람 부분은 CD4의 면역글로불린-유사 도메인, 예를 들면, D1, D2, D3, 및 D4라고 칭하는 도메인들의 전부 또는 실질적으로 전부를 포함한다. 또 다른 실시형태에서, 키메라 사람/비-사람 CD4 폴리펩타이드의 사람 부분은, 이의 사람 부분에 T 세포 수용체의 세포외 부분 및/또는 MHC II와의 상호작용에 관여하는 사람 CD4 서열의 전부 또는 실질적으로 전부를 포함한다. 또 다른 실시형태에서, 키메라 사람/비-사람 CD4 폴리펩타이드의 사람 부분은, T 세포 수용체의 가변 도메인 및/또는 MHC II와의 상호작용에 관여하는 사람 CD4의 세포외 부분의 전부 또는 실질적으로 전부를 포함한다. 따라서, 한 실시형태에서, 키메라 CD4 폴리펩타이드의 사람 부분을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열은 사람 CD4의 도메인 D1-D2의 암호화 서열(예를 들면, 사람 CD4 유전자의 엑손 3 및 엑손 4-5의 일부)의 전부 또는 실질적으로 전부를 포함하고; 다른 실시형태에서, 이것은 사람 CD4의 D1-D3의 암호화 서열(예를 들면, 사람 CD4의 엑손 3 및 엑손 4-6의 일부)의 전부 또는 실질적으로 전부를 포함한다. 따라서, 한 실시형태에서, 키메라 사람/비-사람 CD4를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열은, 사람 CD4의 D1-D3 도메인의 전부 또는 실질적으로 전부를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 다른 실시형태에서, 키메라 CD4 폴리펩타이드의 사람 부분을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열은 사람 CD4 유전자의 D1-D4 도메인의 암호화 서열을 포함한다. 다른 실시형태에서, 뉴클레오타이드 서열은, 마우스 CD4 신호펩타이드, 예를 들면, 마우스 유전자의 엑손 2-3의 일부에 의해 암호화되는 영역을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함할 수 있다. 다른 실시형태에서, 뉴클레오타이드 서열은, 사람 CD4 신호펩타이드를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함할 수 있다. 한 실시형태에서, 키메라 사람/비-사람 CD4 폴리펩타이드는, 서열번호 4에 제시된 아미노산 서열을 포함하고, 키메라 폴리펩타이드의 사람 부분은 서열번호 4의 약 아미노산 27-319에 걸쳐 있다(서열번호 57에 별도로 제시됨).

[0046]

한 실시형태에서, 비-사람 동물은 키메라 사람/비-사람 CD4 폴리펩타이드 서열을 발현한다. 한 실시형태에서, 키메라 CD4 서열의 사람 부분은 하나 이상의 보존적 또는 비-보존적 변형을 포함한다.

[0047]

한 양상에서, 사람 CD4 서열을 발현하는 비-사람 동물이 제공되며, 여기서, 사람 CD4 서열은 사람 CD4 서열과 적어도 약 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일하다. 특정 실시형태에서, 사람 CD4 서열은, 실시예

에 기재된 사람 CD4 서열과 적어도 약 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일하다. 한 실시형태에서, 사람 CD4 서열은 하나 이상의 보존적 치환을 포함한다. 한 실시형태에서, 사람 CD4 서열은 하나 이상의 비-보존적 치환을 포함한다.

[0048] 몇몇 실시형태에서, 키메라 CD4의 일부, 예를 들면, 사람 부분은, 본원에 나타낸 서열의 실질적으로 전부(예를 들면, 본원에 나타낸 단백질 도메인의 실질적으로 전부)를 포함할 수 있다. 실질적으로 전부의 서열은, 일반적 으로 단백질의 특정 부분을 나타내는 것으로 생각되는 아미노산(예를 들면, 특정 기능성 도메인 등)의 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%를 포함한다. 당해 분야의 숙련가는, 기능성 도메인의 경계가 사용된 정렬 및 도메인 예측 방법에 따라 약간 변할 수 있음을 이해할 것이다.

[0049] 한 양상에서, 키메라 사람/비-사람 CD4 폴리펩타이드의 비-사람 부분은 비-사람 CD4 폴리펩타이드의 적어도 막 관통 및 세포질 도메인을 포함한다. CD4 세포질 도메인에 의해 제공되는 중요한 기능으로 인해, 유전자 조작된 동물에서 내인성 비-사람(예를 들면, 마우스) 서열의 보유는, 보조-수용체의 적절한 세포내 신호전달 및 기타의 기능을 보존할 수 있도록 보장한다. 한 실시형태에서, 비-사람 동물은 마우스이고, 비-사람 CD4 폴리펩타이드는 마우스 CD4 폴리펩타이드이다. 특정 마우스 CD4 서열이 실시예에 기재되어 있지만, 이들로부터 유도된 임의의 적합한 서열, 예를 들면, 보존적/비-보존적 아미노산 치환을 포함하는 서열도 본원에 포함된다. 한 실시형태에서, 키메라 CD4 보조-수용체의 비-사람 부분은, 사람화되지 않은 내인성 CD4의 임의의 서열을 포함한다.

[0050] 본원에 기재된 비-사람 동물은, 이의 내인성 유전자좌에 키메라 사람/비-사람 CD4 폴리펩타이드를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함할 수 있다. 한 양상에서, 이것은, 내인성 CD4 유전자의 일부를 사람 CD4 폴리펩타이드의 일부를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열로 대체한다. 한 실시형태에서, 이러한 대체는, 예를 들면, 비-사람 CD4의 세포외 도메인의 전부 또는 실질적으로 전부를 암호화하는 내인성 뉴클레오타이드 서열, 예를 들면, 비-사람 CD4의 제1 면역글로불린-유사 도메인(즉, D1)의 적어도 전부 또는 실질적으로 전부를 암호화하는 서열(예를 들면, 비-사람 CD4의 도메인 D1-D2의 전부 또는 실질적으로 전부를 암호화하는 서열, 예를 들면, 비-사람 CD4의 도메인 D1-D3의 전부 또는 실질적으로 전부를 암호화하는 서열, 예를 들면, 비-사람 CD4의 도메인 D1-D4의 전부 또는 실질적으로 전부를 암호화하는 서열)을 이를 암호화하는 사람 뉴클레오타이드 서열로 대체하는 것이다. 한 실시형태에서, 대체는, T 세포 수용체의 세포외 부분 및/또는 MHC II와의 상호작용에 관여하는 사람 CD4 서열을 포함하는 키메라 단백질을 초래한다. 또 다른 실시형태에서, 대체는, T 세포 수용체의 가변 도메인 및/또는 MHC II와의 상호작용에 관여하는 사람 CD4 서열을 포함하는 키메라 단백질을 초래한다. 한 실시형태에서, 대체는, 비-사람 CD4 폴리펩타이드의 적어도 막 관통 및 세포질 도메인을 암호화하는 CD4 서열의 대체를 포함하지는 않는다. 따라서, 한 양상에서, 비-사람 동물은 내인성 비-사람 CD4 유전자좌로부터 키메라 사람/비-사람 CD4 폴리펩타이드를 발현한다. 또 다른 실시형태에서, 대체는, 서열번호 4에 제시된 폴리펩타이드 서열을 포함하는 단백질을 초래한다.

[0051] 한 실시형태에서, 본원에 기재된 키메라 사람/비-사람 CD4 유전자좌(예를 들면, 키메라 사람/설치류 CD4 유전자좌, 예를 들면, 키메라 사람/마우스 CD4 유전자좌)의 뉴클레오타이드 서열이 제공된다. 한 양상에서, 키메라 사람/비-사람(예를 들면, 사람/설치류, 예를 들면, 사람/마우스) CD4 서열이 내인성 비-사람(예를 들면, 설치류, 예를 들면, 마우스) CD4 유전자좌에 배치되어 있기 때문에, 이것은 제1 CD4 엑손의 업스트림에 위치한 CD4 인핸서 요소를 보유한다. 한 실시형태에서, 내인성 비-사람(예를 들면, 설치류, 예를 들면, 마우스) CD4 유전자좌에서의 대체는, 예를 들면, CD4 폴리펩타이드의 D1을 암호화하는 엑손 3의 일부 및 D1의 나머지와 D2-D3을 암호화하는 엑손 4-6의 대체를 포함하고; 따라서, 한 양상에서, 키메라 CD4 유전자좌는, 비-사람(예를 들면, 마우스) CD4 유전자의 인트론 1에 위치한 *cis*-작용성 사일런서를 보유한다. 따라서, 한 실시형태에서, 키메라 유전자좌는 내인성 비-사람(예를 들면, 설치류, 예를 들면, 마우스) CD4 프로모터 및 조절 요소를 보유한다. 다른 실시형태에서, 키메라 유전자좌는, 적절한 CD4 발현, CD4+ T 세포 발생, CD4 계통 선택, 및 보조-수용체 기능을 가능하게 하는 정도로 사람 프로모터 및 조절 요소를 함유할 수 있다. 따라서, 몇몇 양상에서, 본 발명의 동물은, T 세포의 적절한 계통 선택 및 발생을 변화시키지 않는 유전자 변형을 포함한다. 한 양상에서, 본 발명의 동물(예를 들면, 설치류, 예를 들면, 마우스)은, CD4를 정상적으로 발현하는 세포 이외의 면역 세포에 대해서는 키메라 CD4 폴리펩타이드를 발현하지 않는다. 한 양상에서, 동물은 B 세포 또는 CD8+ SP T 세포에 대해서는 CD4를 발현하지 않는다. 한 실시형태에서, 대체는, CD4 발현의 적절한 공간적 및 시간적 조절을 가능하게 하는 인자를 보유하게 한다.

[0052] 본 발명의 유전자 변형된 비-사람 동물은, 마우스, 래트, 토끼, 돼지, 소과(예를 들면, 암소, 황소, 물소), 사슴, 양, 염소, 닭, 고양이, 개, 페럿, 영장류(예를 들면, 마모셋, 붉은털 원숭이)로 이루어진 그룹으로부터 선택될 수 있다. 적합한 유전자 변형 가능한 ES 세포를 쉽게 이용할 수 없는 비-사람 동물의 경우, 유전자 변형을

포함하는 비-사람 동물을 만들기 위해 다른 방법들을 사용한다. 이러한 방법은, 예를 들면, 비-ES 세포 계놈(예를 들면, 섬유아세포 또는 유도된 다능성 세포)을 변형시키고, 핵 전이를 사용하여 변형된 계놈을 적합한 세포, 예를 들면, 난모세포로 전이시키고, 변형된 세포(예를 들면, 변형된 난모세포)를 적합한 조건 하에서 비-사람 동물에 임신시켜 배아를 형성함을 포함한다.

[0053]

한 양상에서, 비-사람 동물은 포유동물이다. 한 양상에서, 비-사람 동물은, 예를 들면, 뛰는쥐상과(Dipodoidea) 또는 쥐상과(Muroidea) 상과(superfamily)의 작은 포유동물이다. 한 실시형태에서, 유전자 변형된 동물은 설치류이다. 한 실시형태에서, 설치류는 마우스, 래트 및 햄스터로부터 선택된다. 한 실시형태에서, 설치류는 쥐상과(Muroidea)로부터 선택된다. 한 실시형태에서, 유전자 변형된 동물은, 칼로마이시다에(Calomyscidae)(예를 들면, 마우스-유사 햄스터), 비단털쥐과(Cricetidae)(예를 들면, 햄스터, 뉴 월드 래트 및 마우스, 들쥐), 쥐과(Muridae)(트루 마우스 및 래트, 게르빌루스쥐, 아프리카가시쥐, 갈기쥐), 네소마이다에(Nesomyidae)(등산쥐, 바위쥐, 위드-테일드(with-tailed) 래트, 말라가시(Malagasy) 래트 및 마우스), 가시겨울잠쥐과(Platacanthomyidae)(예를 들면, 가시겨울잠쥐), 및 소경쥐과(Spalacidae)(예를 들면, 두더지쥐, 대나무쥐, 및 조코)로부터 선택된 과 유래이다. 특정 실시형태에서, 유전자 변형된 설치류는 트루 마우스 또는 래트(Muridae 과), 게르빌루스쥐, 아프리카가시쥐 및 갈기쥐로부터 선택된다. 한 실시형태에서, 유전자 변형된 마우스는 쥐과(family Muridae)의 구성원 유래이다. 한 실시형태에서, 동물은 설치류이다. 특정 실시형태에서, 설치류는 마우스 및 래트로부터 선택된다. 한 실시형태에서, 비-사람 동물은 마우스이다.

[0054]

특정 실시형태에서, 비-사람 동물은, C57BL/A, C57BL/An, C57BL/GrFa, C57BL/KaLwN, C57BL/6, C57BL/6J, C57BL/6ByJ, C57BL/6NJ, C57BL/10, C57BL/10ScSn, C57BL/10Cr, 및 C57BL/01a로부터 선택된 C57BL 스트레인의 마우스인 설치류이다. 다른 실시형태에서, 마우스는, 129P1, 129P2, 129P3, 129X1, 129S1(예를 들면, 129S1/SV, 129S1/SvIm), 129S2, 129S4, 129S5, 129S9/SvEvH, 129S6(129/SvEvTac), 129S7, 129S8, 129T1, 129T2인 스트레인으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 129 스트레인이다. 예를 들면, 문헌[Festing *et al.* (1999) Revised nomenclature for strain 129 mice, Mammalian Genome 10:836]을 참조하고, 또한, 문헌[Auerbach *et al* (2000) Establishment and Chimera Analysis of 129/SvEv- and C57BL/6-Derived Mouse Embryonic Stem Cell Lines)]을 참조한다. 특정 실시형태에서, 유전자 변형된 마우스는, 상기 언급된 129 스트레인과 상기 언급된 C57BL/6 스트레인의 믹스이다. 다른 특정 실시형태에서, 마우스는, 상기 언급된 129 스트레인의 믹스, 또는 상기 언급된 BL/6 스트레인의 믹스이다. 특정 실시형태에서, 믹스의 129 스트레인은 129S6(129/SvEvTac) 스트레인이다. 다른 실시형태에서, 마우스는 BALB 스트레인, 예를 들면, BALB/c 스트레인이다. 또 다른 실시형태에서, 마우스는, BALB 스트레인과 다른 상기 언급된 스트레인의 믹스이다.

[0055]

한 실시형태에서, 비-사람 동물은 래트이다. 한 실시형태에서, 래트는 위스타(Wistar) 래트, LEA 스트레인, 스프라그 돌리(Sprague Dawley) 스트레인, 피셔(Fischer) 스트레인, F344, F6 및 다크 아구티(Dark Agouti)로부터 선택된다. 한 실시형태에서, 래트 스트레인은, 위스타, LEA, 스프라그 돌리, 피셔, F344, F6 및 다크 아구티로 이루어진 그룹으로부터 선택된 2종 이상의 스트레인의 믹스이다.

[0056]

따라서, 한 실시형태에서, 본 발명은, 이의 계놈에, 예를 들면, 이의 내인성 CD4 유전자좌에, 키메라 사람/마우스 CD4 폴리펩타이드를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 유전자 변형된 마우스를 제공하며, 여기서, 키메라 폴리펩타이드의 마우스 부분은 마우스 CD4 폴리펩타이드의 적어도 막관통 및 세포질 도메인을 포함하고, 마우스는 키메라 사람/마우스 CD4를 발현한다. 한 실시형태에서, 키메라 폴리펩타이드의 사람 부분은 사람 CD4 폴리펩타이드의 세포외 도메인의 적어도 전부 또는 실질적으로 전부를 포함한다. 한 실시형태에서, 키메라 폴리펩타이드의 사람 부분은 사람 CD4 단백질의 D1 도메인의 적어도 전부 또는 실질적으로 전부를 포함한다. 한 실시형태에서, 키메라 폴리펩타이드의 사람 부분은 사람 CD4 단백질의 D1-D2 도메인의 적어도 전부 또는 실질적으로 전부, 예를 들면, 사람 CD4 단백질의 D1-D3 도메인의 적어도 전부 또는 실질적으로 전부, 예를 들면, 사람 CD4 단백질의 D1-D4 도메인의 전부 또는 실질적으로 전부를 포함한다. 따라서, 한 실시형태에서, 마우스는, 내인성 CD4 유전자좌에 사람 CD4 유전자의 엑손 4, 5, 및 6의 적어도 전부 또는 실질적으로 전부를 포함하는 뉴클레오타이드 서열, 예를 들면, 사람 CD4의 D1 도메인의 일부를 암호화하는 사람 CD4 유전자의 엑손 3 및 사람 CD4 유전자의 엑손 4-6의 서열을 포함한다. 한 실시형태에서, 마우스는, 내인성 CD4 유전자좌에 T 세포 수용체의 세포외 부분 및/또는 MHC II와의 상호작용에 관여하는 사람 CD4 서열을 포함하는 키메라 사람/마우스 CD4를 포함한다. 다른 실시형태에서, 마우스는, 내인성 CD4 유전자좌에 T 세포 수용체의 가변 도메인 및/또는 MHC II와의 상호작용에 관여하는 사람 CD4 서열을 포함하는 키메라 사람/마우스 CD4를 포함한다. 한 실시형태에서, 뉴클레오타이드 서열은 마우스 CD4 신호 펩타이드를 암호화하는 서열을 포함한다. 한 실시형태에서, 마우스는, 사람 CD4 세포외 도메인을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열로의 마우스 CD4 세포외 도메인을 암호화하는 뉴클레

오타이드 서열의 대체를 포함한다. 다른 실시형태에서, 마우스는, 마우스 CD4 D1 도메인의 적어도 전부 또는 실질적으로 전부를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열, 예를 들면, 마우스 CD4 D1-D2 도메인의 적어도 전부 또는 실질적으로 전부를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열, 예를 들면, 마우스 CD4 D1-D3 도메인의 적어도 전부 또는 실질적으로 전부를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열의 이를 암호화하는 사람 뉴클레오타이드 서열로의 대체를 포함한다. 한 실시형태에서, 마우스는, 이의 내인성 마우스 CD4 유전자좌로부터 기능성 내인성 마우스 CD4를 발현하지 않는다. 한 실시형태에서, 본원에 기재된 마우스는, 마우스의 생식계열에 키메라 사람/마우스 CD4 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 한 실시형태에서, 마우스는, 사람화되지 않은 임의의 내인성 서열을 보유하며, 예를 들면, 마우스가 D1-D3 도메인의 전부 또는 실질적으로 전부를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열의 대체를 포함하는 실시형태에서, 마우스는, 마우스 CD4 D4 도메인을 암호화하는 내인성 뉴클레오타이드 서열뿐만 아니라 마우스 CD4의 막관통 및 세포질 도메인을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 보유한다.

[0057] 한 양상에서, 키메라 사람/마우스 CD4 단백질을 발현하는 마우스는 마우스 CD4 프로모터 및 조절 서열을 보유하며, 예를 들면, 키메라 사람/마우스 CD4를 암호화하는 마우스에서의 뉴클레오타이드 서열은 내인성 마우스 CD4 프로모터 및 조절 서열에 작동가능하게 연결된다. 한 양상에서, 본 발명의 유전자 조작된 동물에 보유된 이러한 마우스 조절 서열은, T 세포 발생 동안 적절한 단계에서 키메라 단백질의 발현을 조절하는 서열을 포함한다. 따라서, 한 양상에서, 마우스는, CD8 계통의 B 세포 또는 T 세포에 대해서는 키메라 CD4를 발현하지 않는다. 한 양상에서, 마우스는, 또한, 내인성 CD4를 정상적으로 발현하지 않는 임의의 세포 유형에도, 예를 들면, 임의의 면역 세포 유형에 대해 키메라 CD4를 발현하지 않는다.

[0058] 각종 실시형태에서, 본원에 기재된 바와 같은 키메라 CD4 유전자좌로부터 기능성 키메라 CD4 단백질을 발현하는 비-사람 동물(예를 들면, 설치류, 예를 들면, 마우스 또는 래트)은 세포 표면, 예를 들면, T 세포 표면에 키메라 단백질을 나타낸다. 한 실시형태에서, 비-사람 동물은, 사람에서 관찰되는 바와 동일한 세포 분포로 세포 표면에 키메라 CD4 단백질을 발현한다. 한 양상에서, 본 발명의 CD4 단백질은, 2차 세포, 예를 들면, 항원 제시 세포(APC)의 표면에 발현된 MHC II 단백질과 상호작용할 수 있다.

[0059] 한 실시형태에서, 본 발명의 비-사람 동물(예를 들면, 설치류, 예를 들면, 마우스)은, 동물의 T 세포의 표면에서 발현된 키메라 CD4 단백질이 2차 세포, 예를 들면, 항원 제시 세포의 표면에서 발현된 사람 또는 사람화된 MHC II와 상호작용할 수 있도록 사람 또는 사람화된 MHC II 단백질을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 추가로 포함한다. 한 실시형태에서, MHC II 단백질은 사람 MHC II α 폴리펩타이드의 세포의 도메인과 사람 MHC II β 폴리펩타이드의 세포의 도메인을 포함한다. 사람 또는 사람화된 MHC II 폴리펩타이드를 발현하는 예시적인 유전자 변형 동물은, 전문이 본원에 인용에 의해 포함되어 있는, 2012년 10월 26일자로 출원된 미국 특허 출원 제13/661,116호 및 2013년 3월 11일자로 출원된 미국 특허 출원 제13/793,935호에 기재되어 있다. 따라서, 한 실시형태에서, 본원에 기재된 키메라 CD4 단백질을 포함하는 동물은, 사람화된 MHC II 단백질을 추가로 포함할 수 있으며, 여기서, 사람화된 MHC II 단백질은: (1) 사람 MHC II α 세포의 도메인 및 내인성, 예를 들면, 마우스, MHC II의 막관통 및 세포질 도메인을 포함하는 사람화된 MHC II α 폴리펩타이드(여기서, 사람 MHC II α 세포의 도메인은 사람 MHC II α 의 $\alpha 1$ 및 $\alpha 2$ 도메인을 포함한다) 및 (2) 사람 MHC II β 세포의 도메인 및 내인성, 예를 들면, 마우스, MHC II의 막관통 및 세포질 도메인을 포함하는 사람화된 MHC II β 폴리펩타이드(여기서, 사람 MHC II β 세포의 도메인은 사람 MHC II β 의 $\beta 1$ 및 $\beta 2$ 도메인을 포함한다)를 포함한다. 한 양상에서, 사람화된 MHC II α 및 β 폴리펩타이드 둘 다는, 각각 내인성 MHC II α 및 β 유전자좌에 위치한 뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화되고; 한 양상에서, 동물은 기능성 내인성 MHC II α 및 β 폴리펩타이드를 발현하지 않는다. 따라서, 동물에 의해 발현된 MHC II는 키메라 사람/비-사람, 예를 들면, 사람/설치류(예를 들면, 사람/마우스) MHC II 단백질일 수 있다. 키메라 MHC II 단백질의 사람 부분은 HLA-DR, HLA-DQ, 및 HLA-DP, 예를 들면, HLA-DR4, HLA-DR2, HLA-DQ2.5, HLA-DQ8, 또는 사람 개체군에 존재하는 임의의 다른 HLA 클래스 II 분자로 이루어진 그룹으로부터 선택된 사람 HLA 클래스 II 단백질로부터 유도될 수 있다. 동물이 마우스인 실시형태에서, 키메라 MHC II 폴리펩타이드의 비-사람(즉, 마우스) 부분은, H-2E 및 H-2A로부터 선택된 마우스 MHC II 단백질로부터 유도될 수 있다. 한 양상에서, 미국 특허 출원 제13/661,116호 및 제13/793,935호에 기재된 키메라 사람/비-사람 CD4 및 사람화된 MHC II를 포함하는 비-사람 동물은, 본원에 기재된 바와 같은 키메라 CD4 유전자좌를 포함하는 동물을 사람화된 MHC II 유전자좌를 포함하는 동물과 브리딩(breeding)함으로써 생성될 수 있다. 동물은, 또한, 예를 들면, 내인성 CD4 유전자좌에서의 대체를 위해 키메라 CD4를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 사람화된 MHC II 유전자좌를 포함하는 동물의 ES 세포에 도입하거나; 사람화된 MHC II를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 키메라 CD4 유전자좌를 포함하는 동물의 ES 세포에 도입함으로써 생성될 수 있다.

- [0060] 한 실시형태에서, 키메라 사람/비-사람 CD4와 사람 또는 사람화된 MHC II 둘 다를 포함하는 유전자 변형된 비-사람 동물(예를 들면, 마우스)은, 이들 단백질을 암호화하는 유전자의 1 또는 2개의 카피를 포함할 수 있고; 따라서, 동물은 각각 키메라 CD4 및 MHC II(즉, MHC II α 및/또는 MHC II β)를 암호화하는 유전자에 대해 이형 접합성이거나 동형접합성일 수 있다.
- [0061] 유전자 조작된 비-사람 동물 이외에, 비-사람 배아(예를 들면, 설치류, 예를 들면, 마우스 또는 래트 배아)도 제공되며, 여기서, 당해 배아는, 본원에 기재된 바와 같은 비-사람 동물(예를 들면, 설치류, 예를 들면, 마우스 또는 래트)로부터 유도된 공여자 ES 세포를 포함한다. 한 양상에서, 배아는 키메라 CD4 유전자를 포함하는 ES 공여자 세포, 및 숙주 배아 세포를 포함한다.
- [0062] 본원에 기재된 바와 같은 비-사람 동물(예를 들면, 설치류, 예를 들면, 마우스 또는 래트)로부터 유도되고, 키메라 CD4 단백질을 발현하는 조직도 제공된다.
- [0063] 또한, 본원에 기재된 바와 같은 비-사람 동물로부터 단리된 비-사람 세포가 제공된다. 한 실시형태에서, 세포는 ES 세포이다. 한 실시형태에서, 세포는 T 세포, 예를 들면, CD4+ T 세포이다. 한 실시형태에서, 세포는 헬퍼 T 세포(T_h 세포)이다. 한 실시형태에서, T_h 세포는 효과기 T_H 세포, 예를 들면, T_{H1} 세포 또는 T_{H2} 세포이다.
- [0064] 본원에 기재된 바와 같은 비-사람 동물의 염색체 또는 이의 단편을 포함하는 비-사람 세포도 제공된다. 한 실시형태에서, 비-사람 세포는, 본원에 기재된 바와 같은 비-사람 동물의 핵을 포함한다. 한 실시형태에서, 비-사람 세포는 핵 전이의 결과로서 염색체 또는 이의 단편을 포함한다.
- [0065] 한 양상에서, 본원에 기재된 바와 같은 키메라 CD4 폴리펩타이드를 암호화하는 유전자를 포함하는 비-사람 유도된 다능성 세포가 제공된다. 한 실시형태에서, 유도된 다능성 세포는, 본원에 기재된 바와 같은 비-사람 동물로부터 유도된다.
- [0066] 한 양상에서, 본원에 기재된 바와 같은 비-사람 동물의 세포로부터 유도된, 하이브리도마(hybridoma) 또는 쿼드로마(quadroma)가 제공된다. 한 실시형태에서, 비-사람 동물은 마우스 또는 래트이다.
- [0067] 한 양상에서, 표면에 키메라 CD4 단백질을 갖는 T 세포 및 키메라 CD4에 결합하는 2차 세포를 포함하는 시험관내 제제가 제공된다. 한 실시형태에서, 2차 세포는, MHC II 폴리펩타이드, 예를 들면, 키메라 사람/비-사람 MHC II 단백질을 발현하는 세포, 예를 들면, APC이다. 한 실시형태에서, 일차 세포의 표면 상의 키메라 CD4는 2차 세포의 표면 상의 키메라 MHC II와 상호작용한다. 한 실시형태에서, 키메라 CD4 단백질은 내인성 시토졸 분자, 예를 들면, 내인성 시토졸 신호전달 분자(예를 들면, 내인성 Lck, 등)와의 상호작용을 보유한다.
- [0068] 본원에 기재된 유전자 조작된 비-사람 동물(예를 들면, 유전자 조작된 설치류, 예를 들면, 마우스 또는 래트)의 제조 방법도 제공된다. 한 실시형태에서, 유전자 조작된 비-사람 동물의 제조 방법은 내인성 CD4 유전자좌에 키메라 사람/비-사람 CD4 폴리펩타이드를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 동물을 초래한다. 몇몇 실시형태에서, 상기 방법은 VELOCIGENE® 기술을 사용하여 제조된 표적화 작제물을 이용하고, 이는 실시예에 기재된 바와 같이 상기 작제물을 ES 세포에 도입하고, VELOCIMOUSE® 기술을 사용하여 표적화된 ES 세포 클론을 마우스 배아에 도입한다.
- [0069] 한 실시형태에서, 본 발명은, 본원에 기재된 키메라 사람/비-사람 CD4 폴리펩타이드를 발현하도록 비-사람 동물의 CD4 유전자좌를 변형시키는 방법을 포함한다. 한 실시형태에서, 본 발명은, 마우스의 내인성 CD4 유전자좌에서 내인성 마우스 CD4 폴리펩타이드를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 키메라 사람/마우스 CD4 폴리펩타이드를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열로 대체함을 포함하는, 키메라 사람/마우스 CD4 폴리펩타이드를 발현하도록 마우스의 CD4 유전자좌를 변형시키는 방법을 제공한다. 상기 방법의 한 양상에서, 키메라 사람/마우스 CD4 폴리펩타이드는 사람 CD4 폴리펩타이드의 세포외 도메인의 전부 또는 실질적으로 전부 및 내인성 마우스 CD4 폴리펩타이드의 적어도 막관통 및 세포질 도메인을 포함한다. 상기 방법의 다른 양상에서, 키메라 사람/마우스 CD4 폴리펩타이드는 사람 CD4 폴리펩타이드의 D1-D2 도메인의 전부 또는 실질적으로 전부를 포함한다. 또 다른 실시형태에서, 키메라 사람/마우스 CD4 폴리펩타이드는 사람 CD4 폴리펩타이드의 D1-D3 도메인의 전부 또는 실질적으로 전부를 포함한다. 또 다른 실시형태에서, 키메라 사람/마우스 CD4 폴리펩타이드는, T 세포 수용체의 세포외 도메인 및/또는 MHC II와의 상호작용에 관여하는 사람 CD4의 아미노산 서열의 전부 또는 실질적으로 전부를 포함한다. 또 다른 실시형태에서, 키메라 사람/마우스 CD4 폴리펩타이드는 T 세포 수용체의 가변 도메인 및/또는 MHC II와의 상호작용에 관여하는 사람 CD4의 아미노산 서열의 전부 또는 실질적으로 전부를 포함한다.
- [0070] 따라서, 본원에 기재된 유전자 변형된 동물을 생성하기 위한 뉴클레오타이드 작제들도 제공된다. 한 양상에서,

뉴클레오타이드 서열은, 5' 및 3' 상동성 아암, 사람 CD4 유전자 서열을 포함하는 DNA 단편(예를 들면, 사람 CD4 세포의 도메인 유전자 서열, 예를 들면, 사람 CD4의 도메인 D1-D2의 전부 또는 실질적으로 전부의 유전자 서열, 예를 들면, 사람 CD4의 도메인 D1-D3 및/또는 D2-D3의 전부 또는 실질적으로 전부의 유전자 서열, 예를 들면, 사람 CD4의 도메인 D1-D4의 전부 또는 실질적으로 전부의 유전자 서열), 및 재조합 부위에 의해 플랭킹된 (flanked) 선택 카세트를 포함한다. 한 실시형태에서, 사람 CD4 유전자 서열은, 사람 CD4의 인트론 및 엑손을 포함하는 게놈 서열이다. 한 실시형태에서, 상동성 아암은 비-사람(예를 들면, 마우스) CD4 게놈 서열에 대해 상동성이다. 본 발명의 예시적인 작제물이 도 1의 하부 다이아그램에 도시되어 있다.

[0071] 선택 카세트는, 목적하는 작제물을 통합한 세포(예를 들면, ES 세포)의 선택을 용이하게 하기 위해 표적화 작제물에 삽입된 뉴클레오타이드 서열이다. 다수의 적합한 선택 카세트가 당업계에 공지되어 있다. 일반적으로, 선택 카세트는 특정 항생제(예를 들면, Neo, Hyg, Pur, CM, SPEC, 등)의 존재 하에 양성 선택을 가능하게 한다. 또한, 선택 카세트는 재조합 부위에 의해 플랭킹될 수 있으며, 이것은 재조합 효소 처리시 선택 카세트의 결실을 가능하게 한다. 일반적으로 사용되는 재조합 부위는 Cre 및 Flp 효소에 의해 각각 인식되는 *loxP* 및 *Frt*이지만, 다른 것들도 당업계에 공지되어 있다. 선택 카세트는 암호화 영역 외부의 작제물 어디에나 위치할 수 있다. 한 실시형태에서, 선택 카세트는 사람 CD4 서열의 엑손 3과 엑손 4 사이에 위치한다.

[0072] 유전자 표적화의 완료시, ES 세포 또는 유전자 변형된 비-사람 동물을 선별하여 목적하는 외인성 뉴클레오타이드 서열의 성공적인 흡입 또는 외인성 폴리펩타이드의 발현을 확인한다. 다수의 기술이 당업계의 숙련가들에게 공지되어 있으며, 서던 블롯팅(Southern blotting), 긴 PCR(long PCR), 정량적 PCR(예를 들면, TAQMAN®을 사용한 실시간 PCR), 동일 반응계내 형광 혼성화(fluorescence *in situ* hybridization), 노던 블롯팅(Northern blotting), 유동 세포측정법(flow cytometry), 웨스턴 분석(Western analysis), 면역세포화학법(immunocytochemistry), 면역조직화학법(immunohistochemistry) 등이 포함된다(이에 제한되지 않음). 한 예에서, 목적하는 유전자 변형을 갖는 비-사람 동물(예를 들면, 마우스)은, 문헌[Valenzuela et al. (2003) High-throughput engineering of the mouse genome coupled with high-resolution expression analysis, Nature Biotech. 21(6): 652-659]에 기재된 대립유전자 검정의 변형을 사용하여 마우스 대립유전자의 소실 및/또는 사람 대립유전자의 획득에 대해 선별함으로써 확인될 수 있다. 유전자 변형된 동물에서 특정 뉴클레오타이드 또는 아미노산 서열을 확인하는 다른 검정법이 당업계의 숙련가들에게 공지되어 있다.

[0073] 한 양상에서, 본원에 기재된 바와 같은 뉴클레오타이드 작제물로부터 키메라 CD4 단백질을 단일 세포에서 발현 시킴을 포함하는, 키메라 사람/비-사람 CD4 분자의 제조 방법이 제공된다. 한 실시형태에서, 뉴클레오타이드 작제물은 바이러스 백터이고; 특정 실시형태에서, 바이러스 백터는 렌티바이러스 백터이다. 한 실시형태에서, 세포는 CHO, COS, 293, HeLa, 및 바이러스 핵산 서열을 발현하는 망막 세포(예를 들면, PERC.6™ 세포)로부터 선택된다.

[0074] 한 양상에서, 키메라 CD4 단백질을 발현하는 세포가 제공된다. 한 실시형태에서, 세포는 본원에 기재된 바와 같은 키메라 CD4 서열을 포함하는 발현 백터를 포함한다. 한 실시형태에서, 세포는 CHO, COS, 293, HeLa, 및 바이러스 핵산 서열을 발현하는 망막 세포(예를 들면, PERC.6™ 세포)로부터 선택된다.

[0075] 또한, 본원에 기재된 바와 같은 비-사람 동물에 의해 제조된 키메라 CD4 분자도 제공되며, 여기서, 한 실시형태에서, 키메라 CD4 분자는, 사람 CD4 단백질의 세포외 도메인의 전부 또는 실질적으로 전부, 및 비-사람 CD4 단백질, 예를 들면, 마우스 CD4 단백질로부터의 적어도 막관통 및 세포질 도메인의 아미노산 서열을 포함한다. 다른 실시형태에서, 본원에 기재된 바와 같은 비-사람 동물에 의해 제조된 키메라 CD4 분자가 제공되며, 여기서, 키메라 CD4 분자는 사람 CD4의 D1 도메인의 적어도 전부 또는 실질적으로 전부, 예를 들면, 사람 CD4의 D1-D2 도메인의 적어도 전부 또는 실질적으로 전부, 예를 들면, 사람 CD4의 D1-D3 도메인의 적어도 전부 또는 실질적으로 전부의 아미노산 서열, 예를 들면, TCR의 세포외 도메인 및/또는 MHC II와의 결합에 관여하는 사람 CD4의 아미노산 서열, 예를 들면, TCR의 가변 도메인 및/또는 MHC II와의 결합에 관여하는 사람 CD4의 아미노산 서열을 포함하고; 나머지 단백질(예를 들면, 막관통 도메인, 세포질 도메인, 사람화되지 않은 세포외 도메인의 임의의 부분)은 내인성 비-사람 단백질 서열로부터 유도된다.

[0076] 키메라 CD4 단백질뿐만 아니라 이를 포함하는 세포 및 조직을 발현하는 동물과 관련하여 상기 본원에 기재된 각종 실시형태들은, 아래 본원에 기재된 키메라 사람/비-사람 CD8을 발현하는 비-사람 동물 또는 기타의 중요한 키메라 사람/비-사람 T 세포 보조-수용체를 발현하는 동물을 기술하는 실시형태에 적용가능할 수 있다.

[0077] 유전자 변형된 CD8 동물

- [0078] 각종 실시형태에서, 본 발명은, 일반적으로, 이의 개놈에, 예를 들면, 내인성 CD8 유전자좌에, 사람화된 CD8 폴리펩타이드를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 유전자 변형된 비-사람 동물을 제공하며; 따라서, 동물은, 사람화된 CD8 폴리펩타이드를 발현한다. 각종 실시형태에서, 본 발명은, 이의 개놈에, 예를 들면, 내인성 CD8 유전자좌에, 사람화된 CD8 α 폴리펩타이드를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열 및/또는 사람화된 CD8 β 폴리펩타이드를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 비-사람 동물을 제공한다. 따라서, 본 발명의 유전자 변형된 비-사람 동물은, 사람화된 CD8 α 및/또는 사람화된 CD8 β 폴리펩타이드(들)를 발현한다.
- [0079] 사람 CD8 단백질은 전형적으로 2개의 폴리펩타이드, CD8 α 및 CD8 β 의 이형이량체로서 세포 표면에 발현되지만, 디설파이드-연결된 동형이량체 및 동형다량체도 검출되었다(예를 들면, CD8 α α 를 발현하는 NK 세포 및 장 γ δ T 세포에서). 사람 CD8 α 및 CD8 β 를 암호화하는 유전자는 염색체 2에서 서로 아주 근접하게 위치한다. 문헌[Nakayama et al. (1992) Recent Duplication of the Two Human CD8 β -chain genes, J. Immunol. 148:1919-27]. CD8 α 단백질은 리더 웨이드, 면역글로불린 V-유사 영역, 헌지 영역, 막관통 도메인 및 세포질 테일을 함유한다. 문헌[Norment et al. (1989) Alternatively Spliced mRNA Encodes a Secreted Form of Human CD8 α . Characterization of the Human CD8 α gene, J. Immunol. 142:3312-19]. CD8 α 유전자의 엑손/인트론이 도 4 및 도 5에 개략적으로 도시되어 있다.
- [0080] 사람 CD8 β 유전자는 염색체 2 상의 CD8 α 유전자의 업스트림에 있다. CD8 β 유전자의 대안의 스플라이싱(slicing)에 의해 생성된 다수의 이소형(isoform)이 보고되었으며, 하나의 이소형에는 막관통 도메인이 결여되어 있고 분비된 단백질을 생성하는 것으로 예측된다. 문헌[Norment et al. (1988) A second subunit of CD8 is expressed in human T cells, EMBO J. 7:3433-39]. CD8 β 유전자의 엑손/인트론이 도 3 및 도 5에 개략적으로 도시되어 있다.
- [0081] 막-결합된 CD8 β 단백질은, N-말단 신호 서열에 이어 면역글로불린 V-유사 도메인, 짧은 세포외 헌지 영역, 막관통 도메인, 및 세포질 테일을 함유한다. 문헌[Littman (1987) The structure of the CD4 and CD8 genes, Ann Rev. Immunol. 5:561-84]을 참조한다. 헌지 영역은 광범위한 글리코실화 부위이며, 이것은 프로테아제에 의한 개열로부터 이의 입체배좌를 유지하고 단백질을 보호하는 것으로 생각된다. 문헌[Leahy (1995) A structural view of CD4 and CD8, FASEB J. 9:17-25].
- [0082] CD8 단백질은 보통 세포독성 T 세포에서 발현되며, MHC I 분자와 상호작용한다. 상호작용은 MHC I의 α_3 도메인에 대한 CD8 결합을 통해 매개된다. CD8에 대한 MHC 클래스 I의 결합은 MHC 클래스 I에 대한 TCR의 결합보다 약 100배 더 약하지만, CD8 결합은 TCR 결합의 친화도를 향상시킨다. 문헌[Wooldridge et al. (2010) MHC Class I Molecules with Superenhanced CD8 Binding Properties Bypass the Requirement for Cognate TCR Recognition and Nonspecifically Activate CTLs, J. Immunol. 184:3357-3366].
- [0083] MHC 클래스 I 분자에 대한 CD8 결합은 종-특이적이며; CD8의 마우스 동족체, Lyt-2는 α_3 도메인에서 H-2D d 분자에 결합하는 것으로 나타났지만, HLA-A 분자에는 결합하지 않았다. 문헌[Connolly et al. (1988) The Lyt-2 Molecule Recognizes Residues in the Class I α_3 Domain in Allogeneic Cytotoxic T Cell Responses, J. Exp. Med. 168:325-341]. 차등 결합은, 아마 사람과 마우스 사이에 보존되지 않은 CD8 상의 CDR-유사 결정인자(CDR1- 및 CDR2-유사)로 인한 것이었을 것이다. 문헌[Sanders et al. (1991) Mutations in CD8 that Affect Interactions with HLA Class I and Monoclonal Anti-CD8 Antibodies, J. Exp. Med. 174:371-379; Vitiello et al. (1991) Analysis of the HLA-restricted Influenza-specific Cytotoxic T Lymphocyte Response in Transgenic Mice Carrying a Chimeric Human-Mouse Class I Major Histocompatibility Complex, J. Exp. Med. 173:1007-1015; 및 Gao et al. (1997) Crystal structure of the complex between human CD8 α α and HLA-A2, Nature 387:630-634]. CD8은 α_3 도메인의 보존 영역에서(위치 223-229에서) HLA-A2에 결합하는 것으로 보고되었다. HLA-A에서의 단일 치환(V245A)은 HLA-A에 대한 CD8의 결합을 감소시키며, T 세포-매개된 용해의 큰 감소를 수반하였다. 문헌[Salter et al. (1989), Polymorphism in the α_3 domain of HLA-A molecules affects binding to CD8, Nature 338:345-348]. 일반적으로, HLA-A 분자의 α_3 도메인에서의 다형성도 CD8에 대한 결합에 영향을 미쳤다. *Id.* 마우스에서, H-2D d 의 잔기 227에서의 아미노산 치환이 H-2D d 에 대한 마우스 Lyt-2의 결합에 영향을 미쳤으며, 돌연변이체 H-2D d 로 형질감염된 세포는 CD8+ T 세포에 의해 용해되지 않았다. 문헌[Potter et al. (1989) Substitution at residue 227 of H-2 class I molecules abrogates recognition by CD8-dependent, but not CD8-independent, cytotoxic T lymphocytes, Nature 337:73-75]. 따라서, 사람 또는 사람화된 CD8의 발현은 사람 또는 사람화된 MHC I에 의해 제시된 항원에 대한 T 세포 반응을 연구하는데 이로울

수 있다.

[0084] CD4와 유사하게, CD8의 세포질 도메인은 티로신 키나제 Lck와 상호작용하고, 이것은 결국 T 세포 활성화를 유도 한다. Lck가 CD8 α 의 세포질 도메인과 상호작용하는 것 같지만, CD8 β 세포질 도메인의 돌연변이 또는 결실이, 감소된 CD8 α -관련 Lck 활성을 초래하였기 때문에, 이러한 상호작용은 CD8 β 의 세포질 도메인의 존재에 의해 조절되는 것으로 보인다. 문헌[Irie et al. (1998) The cytoplasmic domain of CD8 β Regulates Lck Kinase Activation and CD8 T cell Development, J. Immunol. 161:183-91]. Lck 활성의 감소는 T 세포 발생에 있어서의 손상과 관련되었다. *Id.*

[0085] 적절한 세포, 예를 들면, 세포독성 T 세포에 대한 CD8의 발현은, CD8 유전자좌 전반에 걸쳐 위치한 각종 인핸서 요소에 의해 염격히 조절된다. 예를 들면, 조절인자 결합과 종종 관련되는 영역인 DNase I-고감도의 적어도 4 개의 영역이 CD8 유전자좌에서 확인되었다. 문헌[Hosert et al. (1997) A CD8 genomic fragment that directs subset-specific expression of CD8 in transgenic mice, J. Immunol. 158:4270-81]. CD8 유전자좌에서의 이들 DNase I-고감도 영역의 발견 때문에, 적어도 5개의 인핸서 요소가 확인되었으며, CD8 유전자좌 전반에 걸쳐 퍼져 있어, DP, CD8 SP T 세포를 포함하는 다양한 계통의 T 세포, 또는 γ δ TCR을 발현하는 세포에서 CD8 α 및/ 또는 β 의 발현을 조절한다. 예를 들면, 문헌[Kioussis et al. (2002) Chromatin and CD4, CD8A, and CD8B gene expression during thymic differentiation, Nature Rev. 2:909-919 and Online Erratum; Ellmeier et al. (1998) Multiple Development Stage-Specific Enhancers Regulate CD8 Expression in Developing Thymocytes and in Thymus-Independent T cells, Immunity 9:485-96]을 참조한다.

[0086] 따라서, 사람 또는 사람화된 CD4 유전자 변형된 동물에 대한 조절 요소 및 내인성 CD4 프로모터를 보유함으로써 유도된 이익과 유사하게, 몇몇 실시형태에서, 사람 또는 사람화된 CD8의 발현을 조절하는 조절 요소와 내인성 마우스 프로모터를 보유하는 유전자 변형된 비-사람 동물을 개발하는 것이 이로울 수 있다. CD8 α 및/또는 β 단백질을 암호화하는 내인성 비-사람 서열을 본원에 기재된 바와 같이 사람 또는 사람화된 CD8 α 및/또는 β 단백질을 암호화하는 것으로 대체함을 포함하는 유전자 변형된 동물을 생성하는 것이 특히 이로울 수 있다.

[0087] 각종 실시형태에서, 본 발명은, 이의 계놈에, 예를 들면, 이의 내인성 CD8 유전자좌에, 키메라 사람/비-사람 CD8 폴리펩타이드(예를 들면, CD8 α 및/또는 β 폴리펩타이드)를 암호화하는 적어도 하나의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 유전자 변형된 비-사람 동물을 제공하며, 여기서, 폴리펩타이드의 사람 부분은 사람 CD8(예를 들면, CD8 α 및/또는 β)의 세포외 도메인의 전부 또는 실질적으로 전부를 포함하고, 비-사람 부분은 비-사람 CD8(예를 들면, CD8 α 및/또는 β)의 적어도 막관통 및 세포질 도메인을 포함하며, 동물은 키메라 CD8 폴리펩타이드(예를 들면, CD8 α 및/또는 β 폴리펩타이드)를 발현한다. 따라서, 한 실시형태에서, 본 발명은, 이의 내인성 비-사람 CD8 유전자좌에 키메라 사람/비-사람 CD8 α 폴리펩타이드를 암호화하는 제1 뉴클레오타이드 서열 및 키메라 사람/비-사람 CD8 β 폴리펩타이드를 암호화하는 제2 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 유전자 변형된 비-사람 동물을 제공하고, 여기서, 제1 뉴클레오타이드 서열은, 사람 CD8 α 폴리펩타이드의 세포외 도메인의 전부 또는 실질적으로 전부 및 비-사람 CD8 α 폴리펩타이드의 적어도 막관통 및 세포질 도메인을 암호화하는 서열을 포함하고, 제2 뉴클레오타이드 서열은, 사람 CD8 β 폴리펩타이드의 세포외 도메인의 전부 또는 실질적으로 전부 및 비-사람 CD8 β 폴리펩타이드의 적어도 막관통 및 세포질 도메인을 암호화하는 서열을 포함하며, 동물은 기능성 키메라 사람/비-사람 CD8 단백질을 발현한다. 한 양상에서, 비-사람 동물은 사람화된 CD8 폴리펩타이드(예를 들면, 키메라 사람/비-사람 CD8 α 및/또는 β 폴리펩타이드)만을 발현하고, 내인성 CD8 유전자좌로부터 상응하는 기능성 비-사람 CD8 폴리펩타이드(들)는 발현하지 않는다.

[0088] 한 실시형태에서, 키메라 사람/비-사람 CD8 α 폴리펩타이드는 이의 사람 부분에 사람 CD8 α 폴리펩타이드의 세포외 도메인의 전부 또는 실질적으로 전부를 포함한다. 한 실시형태에서, 키메라 CD8 α 폴리펩타이드의 사람 부분은 사람 CD8 α 폴리펩타이드의 적어도 MHC I 결합 도메인을 포함한다. 한 실시형태에서, 키메라 CD8 α 폴리펩타이드의 사람 부분은 사람 CD8 α 의 면역글로불린 V-유사 도메인의 적어도 전부 또는 실질적으로 전부의 서열을 포함한다. 한 실시형태에서, 키메라 CD8 α 폴리펩타이드의 사람 부분을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열은, 적어도 사람 CD8 α 폴리펩타이드의 세포외 도메인을 암호화하는 엑손을 포함한다. 한 실시형태에서, 뉴클레오타이드 서열은, 적어도 Ig V-유사 도메인을 암호화하는 엑손을 포함한다. 한 실시형태에서, 사람 CD8 α 폴리펩타이드의 세포외 도메인은, 막관통 또는 세포질 도메인이 아닌 폴리펩타이드의 도메인을 포함하는 영역이다. 한 실시형태에서, 키메라 사람/비-사람 CD8 α 폴리펩타이드를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열은, 비-사람(예를 들면, 설치류, 예를 들면, 마우스) CD8 α 신호 웨პ타이드를 암호화하는 서열을 포함한다. 대안으로, 뉴클레오타이드 서열은, 사람 CD8 α 신호 서열을 암호화하는 서열을 포함할 수 있다. 한 실시형태에서, 키메라 사람/비-사람 CD8 α 폴리펩타이드는, 서열번호 54에 제시된 아미노산 서열을 포함하고, 키메라 폴리펩타이

드의 사람 부분은 서열번호 54의 아미노산 28-179에 제시되어 있다(서열번호 59에 별도로 나타냄).

[0089] 유사하게, 한 실시형태에서, 키메라 사람/비-사람 CD8 β 폴리펩타이드는 이의 사람 부분에 사람 CD8 β 폴리펩타이드의 세포외 도메인의 전부 또는 실질적으로 전부를 포함한다. 한 실시형태에서, 키메라 CD8 β 폴리펩타이드의 사람 부분은 CD8 β 의 면역글로불린 V-유사 도메인의 전부 또는 실질적으로 전부의 서열을 포함한다. 한 실시형태에서, 키메라 CD8 β 폴리펩타이드의 사람 부분을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열은, 적어도 사람 CD8 β 폴리펩타이드의 세포외 도메인을 암호화하는 액손을 포함한다. 한 실시형태에서, 키메라 사람/비-사람 CD8 β 폴리펩타이드의 사람 부분은, 적어도 CD8 β 의 IgG V-유사 도메인을 암호화하는 액손을 포함한다. 한 실시형태에서, 키메라 사람/비-사람 CD8 β 폴리펩타이드를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열은, 비-사람(예를 들면, 설치류, 예를 들면, 마우스) CD8 β 신호 펩타이드를 암호화하는 서열을 포함한다. 대안으로, 뉴클레오타이드 서열은, 사람 CD8 β 신호 서열을 암호화하는 서열을 포함할 수 있다. 한 실시형태에서, 키메라 사람/비-사람 CD8 β 폴리펩타이드는, 서열번호 53에 제시된 아미노산 서열을 포함하고, 키메라 폴리펩타이드의 사람 부분은 서열 번호 53의 아미노산 15-165에 제시되어 있다(서열번호 58에 별도로 나타냄).

[0090] 한 실시형태에서, 비-사람 동물은 키메라 사람/비-사람 CD8 α 및/또는 CD8 β 폴리펩타이드를 발현한다. 몇몇 실시형태에서, 키메라 사람/비-사람 CD8 α 및/또는 β 폴리펩타이드의 사람 부분은 하나 이상의 보존적 또는 비보존적 변형(들)을 포함한다.

[0091] 한 양상에서, 사람 CD8 α 및/또는 β 폴리펩타이드 서열을 발현하는 비-사람 동물이 제공되며, 여기서, 사람 CD8 α 및/또는 β 폴리펩타이드 서열은 각각 사람 CD8 α 및/또는 β 폴리펩타이드 서열과 적어도 약 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일하다. 특정 실시형태에서, 사람 CD8 α 및/또는 β 폴리펩타이드 서열은 실시예에 기재된 각각의 사람 CD8 α 및/또는 β 폴리펩타이드 서열과 적어도 약 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일하다. 한 실시형태에서, 사람 CD8 α 및/또는 β 폴리펩타이드 서열은 하나 이상의 보존적 치환을 포함한다. 한 실시형태에서, 사람 CD8 α 및/또는 β 폴리펩타이드 서열은 하나 이상의 비-보존적 치환을 포함한다.

[0092] 몇몇 실시형태에서, 키메라 CD8의 일부, 예를 들면, 사람 부분은, 본원에 나타낸 서열의 실질적으로 전부(예를 들면, 본원에 나타낸 단백질 도메인의 실질적으로 전부)를 포함할 수 있다. 서열의 실질적으로 전부란 일반적으로 단백질의 특정 부분(예를 들면, 특정 기능성 도메인, 등)을 나타내는 것으로 생각되는 아미노산의 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%를 포함한다. 당업계의 숙련가는, 기능성 도메인의 경계가 사용된 정렬 및 도메인 예측 방법에 따라 약간 변할 수 있음을 이해할 것이다.

[0093] 한 양상에서, 키메라 사람/비-사람 CD8 α 및/또는 β 폴리펩타이드의 비-사람 부분은 각각 비-사람 CD8 α 및/또는 β 폴리펩타이드의 적어도 막관통 및/또는 세포질 도메인을 포함한다. CD8 세포질 도메인에 의해 제공된 중요한 기능으로 인해, 유전자 조작된 동물에 내인성 비-사람(예를 들면, 마우스) 서열이 보유되어 보조-수용체의 적절한 세포내 신호전달 및 기타의 기능들이 보존된다. 한 실시형태에서, 비-사람 동물은 마우스이고, 비-사람 CD8 α 및/또는 β 폴리펩타이드는 각각 마우스 CD8 α 및/또는 β 폴리펩타이드이다. 특정 마우스 CD8 α 및 β 서열이 실시예에 기재되어 있지만, 이로부터 유도된 임의의 적합한 서열, 예를 들면, 보존적/비-보존적 아미노산 치환을 포함하는 서열도 본원에 포함된다. 한 실시형태에서, 비-사람 동물(예를 들면, 설치류, 예를 들면, 마우스)은 사람화되지 않은 내인성 서열을 보유한다.

[0094] 본원에 기재된 비-사람 동물은, 이의 내인성 유전자좌에 키메라 사람/비-사람 CD8 α 및/또는 β 폴리펩타이드를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함할 수 있다. 한 양상에서, 이것은 내인성 CD8 α 유전자의 일부를 사람 CD8 α 폴리펩타이드의 일부를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열로 대체하고/하거나 내인성 CD8 β 유전자의 일부를 사람 CD8 β 폴리펩타이드의 일부를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열로 대체한다. 한 실시형태에서, 이러한 대체는, 비-사람 CD8 α 및/또는 β 의 세포외 도메인의 전부 또는 실질적으로 전부를 암호화하는 내인성 뉴클레오타이드 서열의 이를 암호화하는 사람 뉴클레오타이드 서열을 갖는 사람 뉴클레오타이드로의 대체이다. 한 실시형태에서, 이러한 대체는, 비-사람 CD8 α 및/또는 β 의 면역글로불린 V-유사 도메인의 적어도 전부 또는 실질적으로 전부를 암호화하는 서열의 이를 암호화하는 사람 뉴클레오타이드 서열로의 대체이다. 한 실시형태에서, 대체는 비-사람 CD8 α 및/또는 β 폴리펩타이드의 막관통 및 세포질 도메인을 암호화하는 CD8 α 및/또는 β 서열의 대체를 포함하지 않는다. 따라서, 비-사람 동물은 내인성 비-사람 CD8 유전자좌로부터 키메라 사람/비-사람 CD8 α 및/또는 β 폴리펩타이드를 발현한다. 또 다른 실시형태에서, 대체는 각각 서열번호 54 및/또는 53에 제시된 폴리펩타이드 서열을 포함하는 CD8 α 및/또는 β 단백질을 초래한다.

[0095] 한 실시형태에서, 키메라 사람/비-사람 CD8 유전자좌(예를 들면, 키메라 설치류 CD8 유전자좌, 예를 들면, 키메라 마우스 CD8 유전자좌)의 뉴클레오타이드 서열이 제공된다. 한 양상에서, 키메라 사람/비-사람(예를 들면,

사람/설치류, 예를 들면, 사람/마우스) CD8 α 및/또는 β 서열은 각각의 내인성 비-사람(예를 들면, 설치류, 예를 들면, 마우스) CD8 α 및/또는 β 유전자좌에 있기 때문에, 이것은 내인성 CD8 α 및/또는 β 프로모터 및 조절 요소를 보유한다. 다른 실시형태에서, 키메라 유전자좌는 사람 CD8 α 및/또는 β 프로모터 및 조절 요소를 적절한 CD8 α 및/또는 β 발현(적절한 공간적 및 시간적 단백질 발현), CD8+ T 세포 발생, CD8 계통 선택, 및 보조-수용체 기능을 가능하게 하는 정도로 함유할 수 있다. 따라서, 한 양상에서, 본 발명의 동물은, 적절한 계통 선택 및 T 세포의 발생을 변화시키지 않는 유전자 변형을 포함한다. 한 양상에서, 본 발명의 동물(예를 들면, 설치류, 예를 들면, 마우스)은, CD8을 정상적으로 발현하는 세포 이외의 면역 세포에서는 키메라 CD8 단백질을 발현하지 않으며, 예를 들면, 동물은, B 세포 또는 CD4+ SP T 세포에 대해 CD8을 발현하지 않는다. 한 실시형태에서, 대체는, CD8 α 및/또는 β 발현의 적절한 공간적 및 시간적 조절을 가능하게 하는 요소들을 보유하게 한다.

[0096] 본원에 기재된 사람 또는 사람화된 CD8 폴리펩타이드를 포함하는 유전자 변형된 비-사람 동물은, 상기에 사람화된 CD4 동물과 관련된 섹션에 기재된 동물들로부터 선택될 수 있다. 한 실시형태에서, 비-사람 동물은 설치류, 예를 들면, 래트 또는 마우스일 수 있다.

[0097] 따라서, 한 실시형태에서, 본 발명은, 이의 계놈에, 예를 들면, 이의 내인성 CD8 유전자좌에, 키메라 사람/마우스 CD8 α 폴리펩타이드를 암호화하는 제1 뉴클레오타이드 서열 및 키메라 사람/마우스 CD8 β 폴리펩타이드를 암호화하는 제2 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 유전자 변형된 마우스를 제공한다. 한 실시형태에서, 제1 뉴클레오타이드 서열은, 사람 CD8 α 폴리펩타이드의 세포외 도메인의 전부 또는 실질적으로 전부 및 마우스 CD8 α 폴리펩타이드의 적어도 막관통 및 세포질 도메인을 암호화하는 서열을 포함하고, 제2 뉴클레오타이드 서열은, 사람 CD8 β 폴리펩타이드의 세포외 도메인의 전부 또는 실질적으로 전부 및 마우스 CD8 β 폴리펩타이드의 적어도 막관통 및 세포질 도메인을 암호화하는 서열을 포함하며, 마우스는 기능성 키메라 사람/마우스 CD8 단백질을 발현한다. 한 실시형태에서, 제1 뉴클레오타이드 서열은, 사람 CD8 α 폴리펩타이드의 적어도 면역글로불린 V-유사 도메인을 암호화하는 서열 및 마우스 CD8 α 폴리펩타이드의 나머지 서열을 포함하고, 제2 뉴클레오타이드 서열은, 사람 CD8 β 폴리펩타이드의 적어도 면역글로불린 V-유사 도메인을 암호화하는 서열 및 마우스 CD8 β 폴리펩타이드의 나머지 서열을 포함한다. 한 실시형태에서, 제1 뉴클레오타이드 서열은 사람 CD8 α 폴리펩타이드의 적어도 MHC I-결합 도메인을 포함한다. 한 실시형태에서, 제1 및 제2 뉴클레오타이드 서열은 적어도 각각 사람 CD8 α 폴리펩타이드 및/또는 CD8 β 폴리펩타이드의 세포외 도메인을 암호화하는 엑손을 포함한다. 한 실시형태에서, 사람 CD8 α 폴리펩타이드 및/또는 CD8 β 폴리펩타이드의 세포외 도메인은, 막관통 또는 세포질 도메인이 아닌 사람 CD8 α 폴리펩타이드 및/또는 CD8 β 폴리펩타이드의 도메인을 포함하는 영역이다. 한 실시형태에서, 사람 CD8 α 폴리펩타이드의 도메인이 도 4 및 도 5에 개략적으로 도시되어 있다. 한 실시형태에서, 사람 CD8 β 폴리펩타이드의 도메인이 도 3 및 도 5에 개략적으로 도시되어 있다. 한 실시형태에서, 키메라 사람/마우스 CD8 α 폴리펩타이드 및/또는 CD8 β 폴리펩타이드를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열은, 각각 마우스 CD8 α 및/또는 CD8 β 신호 웨პ타이드를 암호화하는 서열을 포함한다. 대안으로, 뉴클레오타이드 서열은, 사람 CD8 α 및/또는 CD8 β 신호 서열을 암호화하는 서열을 포함할 수 있다. 한 실시형태에서, 마우스는, 마우스 CD8 α 및/또는 CD8 β 세포외 도메인의 전부 또는 실질적으로 전부를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열의 각각 사람 CD8 α 및/또는 CD8 β 세포외 도메인의 전부 또는 실질적으로 전부를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열로의 대체를 포함한다.

[0098] 한 실시형태에서, 마우스는 이의 내인성 CD8 유전자좌로부터 기능성 내인성 마우스 CD8 α 및/또는 CD8 β 폴리펩타이드를 발현하지 않는다. 한 실시형태에서, 본원에 기재된 바와 같은 마우스는 이의 생식계열에 키메라 사람/마우스 CD8 서열을 포함한다.

[0099] 한 양상에서, 키메라 사람/마우스 CD8 α 및/또는 CD8 β 폴리펩타이드를 발현하는 마우스는 마우스 CD8 α 및/또는 CD8 β 프로모터 및 조절 서열을 보유하고, 예를 들면, 키메라 사람/마우스 CD8을 암호화하는 마우스의 뉴클레오타이드 서열은 내인성 마우스 CD8 프로모터 및 조절 서열에 작동가능하게 연결된다. 한 양상에서, 마우스에 보유된 이들 조절 서열은, T 세포 발생의 적절한 단계에서 CD8 단백질 발현을 조절하는 서열을 포함한다. 한 양상에서, 유전자 변형된 마우스는, CD4 계통의 B 세포 또는 T 세포, 또는 내인성 CD8을 정상적으로 발현하지 않는 임의의 세포, 예를 들면, 면역 세포에 대해 키메라 CD8을 발현하지 않는다.

[0100] 각종 실시형태에서, 본원에 기재된 바와 같이 키메라 CD8 유전자좌로부터 기능성 키메라 CD8 단백질(예를 들면, CD8 α β 또는 CD8 α α)을 발현하는 비-사람 동물(예를 들면, 설치류, 예를 들면, 마우스 또는 래트)은 세포 표면에 키메라 단백질을 나타낸다. 한 실시형태에서, 비-사람 동물은 사람에서 관찰되는 바와 동일한 세포 분포로 세포 표면에 키메라 CD8 단백질을 발현한다. 한 양상에서, 본 발명의 CD8 단백질은 2차 세포의 표면에서 발

현된 MHC I 단백질과 상호작용할 수 있다.

[0101]

한 실시형태에서, 본 발명의 비-사람 동물(예를 들면, 설치류, 예를 들면, 마우스)은, 동물의 T 세포의 표면에서 발현된 키메라 CD8 단백질이 2차 세포, 예를 들면, 항원 제시 세포의 표면에서 발현된 사람 또는 사람화된 MHC I과 상호작용할 수 있도록, 사람 또는 사람화된 MHC I 단백질을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 추가로 포함한다. 한 실시형태에서, MHC I 단백질은 사람 MHC I 폴리펩타이드의 세포외 도메인을 포함한다. 한 실시형태에서, 동물은 사람 또는 사람화된 β -2 마이크로글로불린 폴리펩타이드를 추가로 포함한다. 사람 또는 사람화된 MHC I 폴리펩타이드 및/또는 β -2 마이크로글로불린 폴리펩타이드를 발현하는 예시적인 유전자 변형된 동물은, 2012년 10월 26일자로 출원된 미국 특허 출원 제13/661,159호 및 2013년 3월 11일자로 출원된 미국 특허 출원 제13/793,812호에 기재되어 있으며, 상기 출원 둘 다는 전문이 본원에 인용에 의해 포함되어 있다. 따라서, 한 실시형태에서, 본원에 기재된 키메라 CD8 단백질을 포함하는 동물은, 사람화된 MHC I 복합체를 추가로 포함할 수 있으며, 여기서, 사람화된 MHC I 복합체는 다음을 포함한다: (1) 사람화된 MHC I 폴리펩타이드[예를 들면, 여기서, 사람화된 MHC I 폴리펩타이드는 사람 MHC I 세포외 도메인 및 내인성(예를 들면, 마우스) MHC I의 막관통 및 세포질 도메인을 포함하고, 예를 들면, 사람화된 MHC I은 사람 MHC I 폴리펩타이드의 α 1, α 2, 및 α 3 도메인을 포함한다], 및 (2) 사람 또는 사람화된 β 2 마이크로글로불린 폴리펩타이드(예를 들면, 동물은 이의 게놈에 사람 β 2 마이크로글로불린의 엑손 2, 3, 및 4에 제시된 뉴클레오타이드 서열을 포함한다). 한 양상에서, 사람화된 MHC I 및 사람 또는 사람화된 β 2 마이크로글로불린 폴리펩타이드 둘 다는 각각 내인성 MHC I 및 β 2 마이크로글로불린 유전자좌에 위치한 뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화되고; 한 양상에서, 동물은 기능성 내인성 MHC I 및 β 2 마이크로글로불린 폴리펩타이드를 발현하지 않는다. 따라서, 동물에 의해 발현된 MHC I은 키메라 사람/비-사람, 예를 들면, 사람/설치류(예를 들면, 사람/마우스) MHC I 폴리펩타이드일 수 있다. 키메라 MHC I 폴리펩타이드의 사람 부분은, HLA-A, HLA-B, 및 HLA-C, 예를 들면, HLA-A2, HLA-B27, HLA-B7, HLA-Cw6, 또는 사람 개체군에 존재하는 기타의 HLA 클래스 I 문자로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 사람 HLA 클래스 I 단백질로부터 유도될 수 있다. 동물이 마우스인 실시형태에서, 키메라 MHC I 폴리펩타이드의 비-사람(즉, 마우스) 부분은, H-2D, H-2K 및 H-2L로부터 선택되는 마우스 MHC I 단백질로부터 유도될 수 있다. 한 양상에서, 본원에 기재된 키메라 사람/비-사람 CD8 및 미국 특허 출원 제13/661,159호 및 제13/793,812호에 기재된 사람화된 MHC I 및/또는 β -2 마이크로글로불린을 포함하는 비-사람 동물은, 본원에 기재된 바와 같은 키메라 CD8 유전자좌(예를 들면, 키메라 CD8 α 및/또는 β 유전자좌)를 포함하는 동물을 사람화된 MHC I 및/또는 β -2 마이크로글로불린 유전자좌를 포함하는 동물과 브리딩함으로써 생성될 수 있다. 동물은, 또한, 예를 들면, 내인성 CD8 유전자좌(예를 들면, 키메라 CD8 α 및/또는 β 유전자좌)에서의 대체를 위해 사람화된 MHC I 및/또는 β -2 마이크로글로불린 유전자좌를 포함하는 동물의 ES 세포에 키메라 CD8(예를 들면, 키메라 CD8 α 및/또는 β)를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 도입하거나; 키메라 CD8 유전자좌(예를 들면, 키메라 CD8 α 및/또는 β 유전자좌)를 포함하는 동물의 ES 세포에 사람화된 MHC I 및/또는 β -2 마이크로글로불린을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열(들)을 도입함으로써 생성될 수 있다.

[0102]

유전자 조작된 비-사람 동물 이외에, 비-사람 배아(예를 들면, 설치류, 예를 들면, 마우스 또는 래트 배아)가 또한 제공되며, 여기서, 배아는, 본원에 기재된 바와 같은 비-사람 동물(예를 들면, 설치류, 예를 들면, 마우스 또는 래트)로부터 유도된 공여자 ES 세포를 포함한다. 한 양상에서, 배아는, 키메라 CD8 유전자를 포함하는 ES 공여자 세포, 및 숙주 배아 세포를 포함한다.

[0103]

본원에 기재된 바와 같은 비-사람 동물(예를 들면, 설치류, 예를 들면, 마우스 또는 래트)로부터 유도되고 키메라 CD8 단백질을 발현하는 조직도 제공된다.

[0104]

또한, 본원에 기재된 바와 같은 비-사람 동물로부터 단리된 비-사람 세포가 제공된다. 한 실시형태에서, 세포는 ES 세포이다. 한 실시형태에서, 세포는 T 세포, 예를 들면, CD8+ T 세포이다. 한 실시형태에서, 세포는 세포독성 T 세포이다.

[0105]

또한, 본원에 기재된 바와 같은 비-사람 동물의 염색체 또는 이의 단편을 포함하는 비-사람 세포도 제공된다. 한 실시형태에서, 비-사람 세포는, 본원에 기재된 바와 같은 비-사람 동물의 핵을 포함한다. 한 실시형태에서, 비-사람 세포는 핵 전이의 결과로서 염색체 또는 이의 단편을 포함한다.

[0106]

한 양상에서, 본원에 기재된 바와 같은 키메라 CD8 폴리펩타이드(예를 들면, CD8 α 및/또는 CD8 β 폴리펩타이드)를 암호화하는 유전자를 포함하는 비-사람 유도된 다능성 세포가 제공된다. 한 실시형태에서, 유도된 다능성 세포는, 본원에 기재된 바와 같은 비-사람 동물로부터 유도된다.

[0107]

한 양상에서, 본원에 기재된 바와 같은 비-사람 동물의 세포로부터 유도된 하이브리도마 또는 쿼드로마가 제공

된다. 한 실시형태에서, 비-사람 동물은 마우스 또는 래트이다.

[0108] 한 양상에서, 표면에 키메라 CD8 단백질을 갖는 T 세포 및 키메라 CD8에 결합하는 2차 세포를 포함하는 시험관내 제제가 제공된다. 한 실시형태에서, 2차 세포는 MHC I 폴리펩타이드, 예를 들면, 키메라 사람/비-사람 MHC I 단백질을 발현하는 세포이다. 한 실시형태에서, 1차 세포의 표면 상의 키메라 CD8은 2차 세포의 표면 상의 키메라 MHC I과 상호작용한다. 한 실시형태에서, 키메라 CD8 단백질은 내인성 시토졸 분자, 예를 들면, 내인성 시토졸 신호전달 분자(예를 들면, 내인성 Lck 등)와의 상호작용을 보유한다.

[0109] 본원에 기재된 유전자 조작된 비-사람 동물의 제조 방법이 또한 본원에 제공된다. 상기 방법은, 내인성 CD8 유전자좌에 키메라 사람/비-사람 CD8 α 및/또는 CD8 β 폴리펩타이드를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열(들)을 포함하는 동물을 초래한다. 상기 방법은, VELOCIGENE® 기술을 사용하여 제조된 표적화 작제물을 이용할 수 있고, 이는, 실시예에 기재된 바와 같이 상기 작제물을 ES 세포에 도입하고, VELOCIMOUSE® 기술을 사용하여 표적화된 ES 세포 클론을 마우스 배아에 도입한다.

[0110] 한 실시형태에서, 본 발명은, 본원에 기재된 키메라 사람/비-사람 CD8 폴리펩타이드를 발현하도록 비-사람 동물의 CD8 유전자좌를 변형시키는 방법을 제공한다. 한 양상에서, 마우스의 내인성 CD8 유전자좌에서 내인성 마우스 CD8 폴리펩타이드를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 키메라 사람/마우스 CD8 폴리펩타이드를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열로 대체함을 포함하는, 키메라 사람/마우스 CD8 폴리펩타이드를 발현하도록 마우스의 CD8 유전자좌를 변형시키는 방법이 제공된다. CD8 폴리펩타이드는 CD8 α , CD8 β , 및 이들의 조합으로부터 선택될 수 있다. 한 양상에서, 키메라 폴리펩타이드는 사람 CD8 폴리펩타이드의 세포외 도메인의 전부 또는 실질적으로 전부 및 내인성 마우스 CD8 폴리펩타이드의 적어도 막관통 및 세포질 도메인을 포함한다.

[0111] 따라서, 본원에 기재된 유전자 변형된 동물을 생성하기 위한 뉴클레오타이드 작제물이 또한 제공된다. 한 양상에서, 뉴클레오타이드 작제물의 서열은 5' 및 3' 상동성 아암, 사람 CD8 α 또는 CD8 β 서열을 포함하는 DNA 단편, 및 재조합 부위에 의해 플랭킹된 선택 카세트를 포함한다. 몇몇 실시형태에서, 사람 서열은, 사람 CD8 α 또는 CD8 β 의 인트론 및 엑손, 예를 들면, 각각 사람 CD8 α 또는 CD8 β 의 세포외 도메인을 암호화하는 엑손을 포함한다. 한 실시형태에서, 상동성 아암은 비-사람 CD8 α 또는 CD8 β 서열에 대해 상동성이다. CD8 α 및 CD8 β 에 대한 예시적인 작제물이 각각 도 4 및 도 3에 도시되어 있다.

[0112] CD8 α 및 CD8 β 를 암호화하는 유전자의 긴밀한 염색체 위치 때문에, 2개의 유전자의 순차적 표적화가 성공적인 사람화의 기회를 개선시킨다. 한 실시형태에서, 표적화 전략은, 본원에 기재된 키메라 CD8 β 작제물을 ES 세포에 도입하고, 표적화된 ES 세포로부터 마우스를 생성하고, 상기 마우스로부터 유전자 변형된 ES 세포를 유도하고, 본원에 기재된 키메라 CD8 α 작제물을 상기 유전자 변형된 ES 세포에 도입함을 포함한다. 다른 실시형태에서, 표적화 전략은 본원에 기재된 키메라 CD8 β 작제물을 ES 세포에 도입하고, 키메라 CD8 β 작제물을 함유한 세포를 선택하고, 본원에 기재된 키메라 CD8 α 작제물을 키메라 CD8 β 작제물을 함유하고 이를 잡복하고 있는 ES 세포에 도입하고, 키메라 CD8 β 및 CD8 α 둘 다를 함유한 세포를 선택함을 포함한다. 이러한 실시형태의 한 양상에서, 선택 단계는, 상이한 선택 마커를 사용하여 수행된다. 대안의 실시형태에서, 우선 CD8 α 사람화를 수행할 수 있다. 유전자 표적화의 완료시, 각종 방법(예를 들면, CD4 사람화에 대해 상기 기재된 방법들, 예를 들면, 특히, Valenzuela, supra에 기재된 대립유전자 검정법의 변형)에 의해 유전자 변형된 비-사람 동물의 ES 세포를 선별하여 목적하는 외인성 뉴클레오타이드 서열의 성공적인 혼입 또는 외인성 폴리펩타이드의 발현을 확인할 수 있다.

[0113] 한 양상에서, 본원에 기재된 바와 같은 뉴클레오타이드 작제물(들)로부터 키메라 CD8 폴리펩타이드(들)를 단일 세포에서 발현시킴을 포함하는, 키메라 사람/비-사람 CD8 분자(예를 들면, CD8 α 및/또는 CD8 β)의 제조 방법이 제공된다. 한 실시형태에서, 뉴클레오타이드 작제물은 바이러스 벡터이고; 특정 실시형태에서, 바이러스 벡터는 렌티바이러스 벡터이다. 한 실시형태에서, 세포는 CHO, COS, 293, HeLa, 및 바이러스성 핵산 서열을 발현하는 망막 세포(예를 들면, PERC.6™ 세포)로부터 선택된다.

[0114] 한 양상에서, 키메라 CD8 단백질을 발현하는 세포가 제공된다. 한 실시형태에서, 세포는, 본원에 기재된 바와 같은 키메라 CD8 서열(들)을 포함하는 발현 벡터를 포함한다. 한 실시형태에서, 세포는 CHO, COS, 293, HeLa, 및 바이러스성 핵산 서열을 발현하는 망막 세포(예를 들면, PERC.6™ 세포)로부터 선택된다.

[0115] 본원에 기재된 바와 같은 비-사람 동물에 의해 제조된 키메라 CD8 분자가 또한 제공되며, 여기서, 키메라 CD8 분자는 사람 CD8 단백질(예를 들면, CD8 α 및/또는 CD8 β)로부터의 세포외 도메인의 전부 또는 실질적으로 전부, 및 비-사람 CD8 단백질, 예를 들면, 마우스 CD8 단백질로부터의 적어도 막관통 및 세포질 도메인을 포함

한다. 예시적인 키메라 CD8 α 폴리펩타이드가 서열번호 54에 제시되어 있고, 예시적인 키메라 CD8 β 단백질이 서열번호 53에 제시되어 있다.

[0116] 유전자 변형된 CD4 및 CD8 동물의 용도

사람화된 CD4와 MHC II 또는 사람화된 CD8과 MHC I을 포함하는 유전자 변형된 비-사람 동물, 예를 들면, 설치류, 예를 들면, 마우스 또는 래트는 사람-유사 방식으로 펩타이드를 T 세포(각각 CD4+ 또는 CD8+ T 세포)에 제시하는데, 그 이유는 복합체의 구성성분들 중의 실질적으로 전부가 사람이거나 사람화되기 때문이다. 본 발명의 유전자 변형된 비-사람 동물은, 사람화된 동물에서 사람 면역계의 기능을 연구하기 위해; 면역 반응을 유발하는 항원 및 항원 에피토프(예를 들면, T 세포 에피토프, 예를 들면, 독특한 사람 암 에피토프)의 확인을 위해, 예를 들면, 백신 개발에 사용하기 위해; 사람 병원체 또는 암 항원에 대한 고친화도 T 세포(즉, 사람 MHC I 복합체의 맥락에서 높은 결합력으로 항원에 결합하는 T 세포)의 확인을 위해, 예를 들면, 적응성 T 세포 치료 요법에 사용하기 위해; 백신 후보물질 및 기타의 백신 전략의 평가를 위해; 사람 자가면역을 연구하기 위해; 사람 감염성 질환을 연구하기 위해; 및 그렇지 않으면 사람 MHC 및 CD4/CD8 발현에 기초한 보다 양호한 치료학적 전략을 고안하기 위해 사용될 수 있다.

[0118] 따라서, 각종 실시형태에서, 본 발명의 유전자 조작된 동물이, 다른 것들 중에서도, 사람에서 면역 반응을 개시할 수 있는 항원의 능력을 평가하는데, 그리고, 다양한 항원을 생성하고 사람 백신 개발에 사용될 수 있는 특정 항원을 확인하는데 유용하다.

[0119] 한 양상에서, 본원에 기재된 바와 같은 유전자 변형된 비-사람 동물을 펩타이드에 노출시키고, 비-사람 동물이 면역 반응을 시작하게 하고, 비-사람 동물에서 본원에 기재된 바와 같은 키메라 사람/비-사람 MHC I 또는 II 분자에 의해 제시된 펩타이드의 서열에 결합하는 세포(예를 들면, 각각 사람 CD8 또는 CD4를 포함하는 CD8+ 또는 CD4+ T 세포)를 검출함을 포함하는, 펩타이드가 사람에서 세포 면역 반응을 유발할 것인지를 결정하는 방법이 제공된다. 한 실시형태에서, 노출 후 비-사람 동물은, 펩타이드에 결합하는 MHC 클래스 I-제한된 CD8+ 세포독성 T 림프구(CTL)를 포함한다. 다른 실시형태에서, 노출 후 비-사람 동물은, 펩타이드에 결합하는 MHC II-제한된 CD4+ T 세포를 포함한다.

[0120] 한 양상에서, 본원에 기재된 바와 같은 비-사람 동물을 추정 T 세포 에피토프를 포함하는 항원에 노출시키고, 비-사람 동물이 면역 반응을 시작하게 하고, 비-사람 동물로부터 에피토프에 결합하는 MHC 클래스 I- 또는 MHC 클래스 II-제한된 T 세포를 단리하고, 상기 T 세포에 의해 결합된 에피토프를 확인함을 포함하는, 사람 T 세포 에피토프를 확인하는 방법이 제공된다.

[0121] 한 양상에서, 추정 항원을 본원에 기재된 바와 같은 마우스에 노출시키고, 마우스가 면역 반응을 발생시키도록 하고, HLA 클래스 I- 또는 클래스 II-제한된 분자에 의해 결합된 항원을 확인함을 포함하는, 사람에서 T 세포 반응을 발생시키는 항원을 확인하는 방법이 제공된다.

[0122] 한 양상에서, 본원에 기재된 바와 같은 마우스를 추정 항원에 노출시키고, 마우스에서 항원-특이적 HLA 클래스 I- 또는 HLA 클래스 II-제한된 면역 반응을 측정함을 포함하는, 추정 항원이 사람 면역계에 노출시 HLA 클래스 I- 또는 클래스 II-제한된 면역 반응을 생성하는 에피토프를 함유하는지를 결정하는 방법이 제공된다.

[0123] 또한, 본원에 기재된 유전자 조작된 비-사람 동물은, 목적하는 항원, 예를 들면, 종양 또는 기타 질환 항원을 인식하는 T 세포 수용체, 예를 들면, 고-결합력 T 세포 수용체의 확인에 유용할 수 있다. 상기 방법은, 본원에 기재된 비-사람 동물을 항원에 노출시키고, 비-사람 동물이 항원에 대한 면역 반응을 시작하게 하고, 사람 또는 사람화된 MHC I 또는 MHC II에 의해 제시된 항원에 결합하는 T 세포 수용체를 포함하는 T 세포를 비-사람 동물로부터 단리하고, 상기 T 세포 수용체의 서열을 결정함을 포함할 수 있다.

[0124] 한 실시형태에서, 본원에 기재된 바와 같은 유전자 변형된 동물을 추정 사람 치료제에 노출시키고(또는 예를 들면, 이러한 동물의 사람 또는 사람화된 MHC II- 또는 MHC I-발현 세포를 추정 치료제의 펩타이드 서열에 노출시키고), 사람 또는 사람화된 MHC/펩타이드 착물을 나타내는 유전자 변형된 동물의 세포를 유전자 변형된 동물의 세포에 결합할 수 있는 키메라 사람/비-사람(예를 들면, 사람/마우스) CD4 또는 CD8을 포함하는 T 세포에 노출시키고, 유전자 변형된 동물의 펩타이드-표시 세포에 의해 유도되는 T 세포의 활성화를 측정함을 포함하는, 추정 사람 치료제에 의해 T 세포 활성화를 결정하는 방법이 제공된다.

[0125] 사람 병원체 또는 신생물로부터의 항원 및 항원 에피토프를 확인할 수 있는 능력 이외에, 본 발명의 유전자 변형된 동물은, 사람 자가면역 질환, 예를 들면, 타입 I 당뇨병, 다발성 경화증 등과 관련된 자가항원을 확인하는데 사용될 수 있다. 또한, 본 발명의 유전자 변형된 동물은 사람 자가면역 질환의 각종 양상을 연구하는데 사

용될 수 있고, 자가면역 질환 모델로서 사용될 수 있다.

[0126] 본원에 기재된 유전자 변형된 동물, 즉, 사람 또는 사람화된 T 세포 보조-수용체(예를 들면, 키메라 사람/비-사람 CD4 또는 CD8)를 포함하고, 임의로 사람 또는 사람화된 MHC II 또는 I 단백질을 추가로 포함하는, 동물의 다른 용도가 본 기재내용으로부터 자명할 것이다.

실시예

[0128] 본 발명은 하기 비제한적 실시예에 의해 추가로 예시될 것이다. 이들 실시예는, 본 발명의 이해를 돋기 위해 제시되는 것이지만, 어떠한 방식으로든 본 발명의 범위를 제한하도록 의도되지 않고, 제한하는 것으로 해석되어서도 안된다. 실시예는, 당해 분야의 통상의 숙련가에게 익히 공지되어 있는 통상의 방법들(분자 클로닝 기술 등)에 대한 상세한 설명을 포함하지 않는다. 달리 명시되지 않는 한, 부는 중량부이고, 분자량은 평균 분자량이며, 온도는 섭씨로 표시되고, 압력은 대기압 또는 대기압 부근이다.

실시예 1. 유전자 변형된 CD4 마우스의 작제 및 특성확인

실시예 1.1: 키메라 CD4 유전자좌의 조작

[0131] 마우스 CD4 유전자좌는, VELOCIGENE® 기술을 사용한 사람 및 마우스 박테리아성 인공 염색체(BAC) DNA로부터의 독특한 표적화 벡터의 작제에 의해 단일 단계로 사람화시켰다(예를 들면, 미국 특허 제6,586,251호 및 문헌[참조; Valenzuela et al. (2003) High-throughput engineering of the mouse genome coupled with high-resolution expression analysis. Nat. Biotech. 21(6): 652-659]. 표적화 벡터를 생성하기 위해, 박테리아성 인공 염색체(BAC) DNA를 사용한 일련의 박테리아성 상동 재조합(BHR)뿐만 아니라 기타의 유전자 조작 단계도 수행하였다.

[0132] 간략하게, 4개의 DNA 단편 (1) (마우스 CD4 유전자의 엑손 2 및 3에 의해 암호화된) 마우스 신호 펩타이드를 함유하는 단편, (2) 마우스 신호 펩타이드의 다운스트림에 사람 엑손 3을 함유하는 단편, (3) Asc I 및 PI-SceI 부위에 의해 플랭킹된 SPEC 내성 카세트를 함유하는 단편, 및 (4) 마우스 CD4 엑손 6의 약 200bp 다운스트림에서 시작한 160bp의 마우스 CD4 인트론 6(엑손 6과 7 사이의 인트론)을 함유하는 단편을 주입 연결(infusion ligation)(Clonetech)에 의해 연결하였다. 생성된 DNA 단편은 5'에서 3'으로: 마우스 엑손 2, 마우스 인트론 2, 신호 펩타이드를 함유하는 마우스 엑손 3의 일부, 사람 신호 펩타이드의 다운스트림에 있는 사람 엑손 3, 사람 인트론 3의 일부, SPEC 카세트, 마우스 인트론 6의 일부를 함유하였다. 마우스 CD4 Ig-유사 도메인 1-3을 암호화하는 마우스 서열을 결합시키고 사람 CD4의 엑손 3을 도입하기 위해 이 DNA 단편을 BHR에서 사용하여 마우스 BAC 클론 BMQ391F08을 변형시켰다. BAC의 CM 카세트를 SPEC 카세트로 치환하여 제1 BAC 벡터를 생성하였다(도 1, 상부 다이아그램).

[0133] 사람 BAC RP11-101F21을 BHR에 의해 변형시켜, 사람 엑손 3의 60bp 다운스트림에 AscI-LoxP-PGK-neo-LoxP 카세트를 도입하고, 엑손 6의 약 100bp 다운스트림에 PI-SceI 제한 부위 및 SPEC 카세트를 도입하여, 제2 BAC 벡터를 생성하였다(도 1, 중간 다이아그램). 이 단계에 이어서 AscI 및 PI-SceI 제한 효소로 소화시킨 후 제1 및 제2 BAC 벡터를 BAC 내지 BAC 연결시켜 CD4 표적화 벡터를 생성하였다(도 1, 하부 다이아그램). 각각 마우스-사람 및 사람-마우스 서열의 업스트림 및 다운스트림 접합부가 아래 표 1에 열거되어 있으며, 서열목록에 제시되어 있다. 사람 인트론 3 - lox-neo 카세트 접합부(카세트의 5' 말단)를 가로지르는 서열이 서열번호 55에 제시되어 있고, lox-neo 카세트 - 사람 인트론 3 접합부(카세트의 3' 말단)를 가로지르는 서열이 서열번호 56에 제시되어 있으며; 상기 서열 둘 다는 또한 표 1에 열거되어 있다. 도 1에 도시된 pgk-neo 카세트를 포함하는 사람화된 CD4 조각의 완전 핵산 서열이 서열번호 3에 제시되어 있다. pgk-neo 카세트는 서열번호 3의 잔기 307-2176에 걸쳐 있고, 2개의 lox 부위는 잔기 267-300 및 2182-2215에 위치하고, 한편, 사람 서열은 잔기 1-234 및 2222-18263에 걸쳐 있다. 완전 사람화된 CD4 단백질의 아미노산 서열이 서열번호 4에 제시되어 있고, 이때 사람 서열은 아미노산 27-319에 걸쳐 있다(서열번호 57에 제시됨).

표 1

키메라 CD4 표적화 벡터의 접합부 서열

접합부	서열	서열번호
5' 마우스/ 사람 접합부	AGGGGAAACCGCAAAGGATGGGACATAGGGAGACAGCTGTTAACAT CTGAAACATGACCTCTTCTGTGCAGCACAACTCCTAGCTGTGAC TCAAGGG (AAGAAAGTGGTCTGGCAAAAAGGGGATACAGTGGAA CTGACCTGTACAGCTCCAGAAGAAGAGCATAACAATTCCACTGGAA AAACTCCAACACAGAT)	1
3' 사람/ 마우스 접합부	(CTGGTCACCTGGATGAAGTGAGGGAGGGCCCTGGGTTGGGCT GGTTTGAACTGAGACATCCATGAGCCAGCCTGGGCTGGCTTCACT GAAGATC) ATCTATGTCGGGTGCCGAGAAAGAGGTAATGAAATGCGA CATGCTATGTCACAAACTCTATTGCTGAGCAGCACCCAGTCAGCT GGCTCTGAATTGAGGGTGAATTACACATCTCCCAACATCTAT AATCTGG	2
사람/5' lox 부위	(TATGGAGTGAAAGCCTTGGTCTGAGATCTGGTCTTAGTTAAC CTGGGATC) GGCAGCCGAATTCTGCAGCCGGCTCGAGATAAC TTCGTATAATGTTATGCTATACGAAGTTATGTCATCCGGTAGGG GGCGCTTTCCC	55
3' lox 부위/사람	AGTATTTGCAAGGTTCTAATCCATCAGACCTCGACCTGCAGC CCTAGATAACTTCGTATAATGTTATGCTATACGAAGTTATCCTAGG (C CAGAGGGCTGGGTTGACAGAAACTCAGTGGCATTCTTATCCAGAGT TTCTCTACACC)	56

사람 서열은 팔호 안에 기재되어 있고, 제한 효소 부위(PI-Sce I)를 함유하는 서열은 볼드체로 기재되어 있다. 선택 카세트 서열은 이탤릭체로 기재되어 있다.

[0134]

[0135] 사람 CD4 표적화 벡터를 Not I로 선형화시키고, F1H4 마우스 ES 세포에 전기천공시켰다. 사람화된 CD4 유전자좌를 갖는 표적화된 ES 세포는, 네오마이신 카세트 및 사람 CD4 유전자 뿐만 아니라 마우스 CD4 유전자의 하나의 카피의 존재를 검출한 대립유전자 검정(Valenzuela et al.)의 변형법을 사용하는 유전형 분석(genotyping)에 의해 확인하였다. 검정법에서 사용된 프라이머 및 프로브는 표 2에 나타내어져 있고, 서열목록에 제시되어 있다.

표 2

키메라 CD4 를 유전형 분석하기 위한 프라이머 및 프로브

검출된 영역	검정	5' 프라이머	3' 프라이머	프로브
마우스 CD4 인트론 3 (1765m2)	LOA	GAAGTGGGTGTGCC ATTCCAGA (서열번호 5)	AAAGCTCAGAACCA GACAGAGTC (서열번호 6)	TTCCAAAAGCCTACAA GCAGGCCAG (서열번호 7)
마우스 CD4 인트론 5 (1765m4)	LOA	TCATCTCCCTTC TGAACCT (서열번호 8)	CCCGAGCCACAAGAA GAAGAAA (서열번호 9)	CTTCCCCCGCATCCA TTTTCTGTTC (서열번호 10)
엑손 3 과 4 사이의 사람 CD4 인트론 (pgk-neo 의 다운스트림) (1765h1)	GOA	GGTCTCGAACTCAT GAGCTCAA (서열번호 11)	GGCATAGTGACACA CACCTGTAAATT (서열번호 12)	TGATCCACTCACCTT GGCCTCTCAGAG (서열번호 13)
엑손 5 와 6 사이의 사람 CD4 인트론 (1765h2)	GOA	GTCAGGGAGCTTAC TTCTTGTG (서열번호 14)	TGTTAGTGTCCCTG AGTAAGTGTGATT (서열번호 15)	CTCAGCTCACACCC CTACCAAGTTGG (서열번호 16)

[0136]

[0137] 플록스트(floxed) 네오마이신 내성 카세트는, Cre 재조합 효소를 발현하는 플라스미드를, 사람화된 CD4 유전자좌를 함유하는 ES 세포에 전기천공함으로써 제거하였다.

[0138] 내성 마커 부재시 사람화된 CD4 유전자좌를 갖는 표적화된 ES 세포는, 네오마이신 카세트의 부재 및 사람 CD4 유전자의 하나의 카피 및 마우스 CD4 유전자의 하나의 카피의 존재를 검출하는 유전형 분석에 의해 확인하였다.

[0139] 상기한 표적화된 ES 세포를 공여자 ES 세포로서 사용하고, VELOCIMOUSE® 방법에 의해 8-세포 단계 마우스 배아에 도입하였다[문헌 참조; 예를 들면, 미국 특허 제7,294,754호 및 Poueymirou et al. (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]. 독립적으로 키메라 CD4 유전자를 갖는 VELOCIMICE®(공

여자 ES 세포로부터 완전 유도된 F0 마우스)을, 독특한 사람 CD4 유전자 서열의 존재를 검출하는 대립유전자 검정(특히 Valenzuela *et al.*)의 변형법을 사용하는 유전형 분석에 의해 확인하였다.

[0140] 실시예 1.2: 유전자 조작된 마우스에서의 키메라 CD4의 발현

WT 또는 이형접합성 사람화된 CD4 마우스("1766HET")로부터의 비장을 콜라제나제(Collagenase) D(Roche Bioscience)로 판류시키고, 적혈구를 ACK 용해 완충액으로 용해시켰다. 사람 CD4 또는 마우스 CD4의 세포 표면 발현을, 각각 항-사람 CD4 또는 항-마우스 CD4 항체를 사용하여 FACS에 의해 분석하였다. 도 2A 및 도 2B에 도시된 바와 같이, 사람 CD4는, 본원에 기재된 사람화된 CD4에 대해 이형접합성인 마우스로부터 입수한 T 세포의 표면에서 발현된다.

[0142] 실시예 2: 유전자 변형된 CD8 마우스의 작제 및 특성확인

CD8 단백질은, 2개의 서브유닛의 디설파이드-연결된 동형이량체(예를 들면, CD8 α 동형이량체) 또는 동형다량체로서 또는 2개의 단백질, CD8 α (CD8a) 및 CD8 β (CD8b)의 이형이량체로서 발생한다. CD8 α 및 CD8 β 유전자는 게놈에, 예를 들면, 마우스 염색체 6 상에 공동편재하며, 이들은 서로 약 37kb 떨어져 위치한다. 이러한 가까운 연결은, 브리딩에 의해 CD8 α 및 CD8 β 유전자좌 둘 다에서 사람화를 포함하는 유전자 변형된 마우스를 생성하기가 매우 어렵게 한다. 따라서, 우선 하나의 유전자, 예를 들면, CD8 β 를 도입한 다음 두번째 유전자, 예를 들면, CD8 α 를 도입함으로써 순차적 표적화를 수행한다.

[0144] 실시예 2.1: 키메라 CD8 β 유전자좌의 조작

마우스 CD8b 유전자좌는 VELOCIGENE® 기술을 사용한 마우스 박테리아성 인공 염색체(BAC) DNA로부터의 독특한 표적화 벡터의 작제에 의해 단일 단계로 사람화시켰다(예를 들면, 미국 특허 제6,586,251호 및 문헌[참조; Valenzuela *et al.* (2003) High-throughput engineering of the mouse genome coupled with high-resolution expression analysis. Nat. Biotech. 21(6): 652-659]. BAC RP23-431M6으로부터의 DNA를 BHR에 의해 변형시켜 거대 표적화 벡터(LTVEC), MAID 1737을 생성하여, CD8 엑토 도메인을 암호화하는 마우스 엑손 2-3(인트론 1의 5' 접합부에서 인트론 3의 3' 접합부)의 상동성 사람 서열(도 3)로의 대체를 함유하였다. loxp-Ub-Hyg 카세트를 인트론 3의 3' 접합부에 삽입하였다. 생성된 벡터의 다양한 접합부에서의 뉴클레오파이드 서열이 표 3에 열거되어 있으며, 서열목록에 제시되어 있다. 사람화된 CD8 β 단백질의 완전 아미노산 서열이 서열번호 53에 제시되어 있고; 이때 사람 서열은 아미노산 15-165에 걸쳐 있다(서열번호 58에 제시됨).

표 3

키메라 CD8 β 표적화 벡터의 접합부 서열

접합부	서열	서열번호
인트론 1에서의 마우스/사람	TGTTTGCCTGTGACATGAACTCATTGTGACACAAACCACTGTGC TAGGGGGGATCCACTAGTAACGCCGCCAGTGTGCTGGAAATTG CCC (TCGCAAGGGCCAGGCATAATAAGTACACAATAAACAAATGG CAGCTCTCTCC)	17
인트론 3에서의 사람/lox 부위의 5'	(CCCGCTCTCCCTTCCCCAGGCACTTTCCAAGTGTCAACTCTAG AGCCTAT) CGCGGCCGCACCGTATAACTCGTATAATGTATGC TATACGAAGTTAT	18
인트론 3에서의 lox 부위의 3' /마우스	ATAACTTCTGTATAATGTATGCTATACGAAGTTATGTCGACCTAG CCTATTTCTCTAGATCCAAAATGATGACAAACAAAGGTACCTTG TG	19

사람 서열은 괄호 안에 기재되어 있고, lox 부위는 이탈릭체로 기재되어 있고, 제한 효소 부위, 다중 클로닝 부위, 및 벡터-유도된 서열은 볼드체로 기재되어 있다.

[0146]

[0147] 표적화 벡터를 F1H4 마우스 ES 세포에 전기천공시켰다(도 5, 좌측). 사람화된 CD8b 유전자좌를 갖는 표적화된 ES 세포는, 사람 CD8b 유전자의 존재를 검출하는 대립유전자 검정(Valenzuela *et al.*)의 변형법을 사용하는 유전형 분석에 의해 확인하였다. 검정법에서 사용된 프라이머 및 프로브는 표 4에 나타내어져 있으며, 서열목록에 제시되어 있다.

표 4

키메라 CD8 β 를 유전형 분석하기 위한 프라이머 및 프로브

검출된 영역	검정	5' 프라이머	3' 프라이머	프로브
마우스 엑손 2	LOA	GCAGCTCTGCCCTCATTC AG (서열번호 20)	CATCTTGCCGTAT GGTTGGT (서열번호 21)	CCCTTCGTCCCTGC TGGTTCA (서열번호 22)
마우스 엑손 3	LOA	CAAGAAGACTACCCTGAA GATGAAGA (서열번호 23)	TGTGAGTGCAACAA TGGAAAACT (서열번호 24)	CGTTCCCCCACCCAG AGACCCA (서열번호 25)
사람 엑손 2	GOA	GGCACCGAGCAGTGACAG T (서열번호 26)	TTCACCGTGGATAG TCCCTTT (서열번호 27)	AGTTCTGGCCCTCT GGGATTCCG (서열번호 28)
사람 엑손 3	GOA	TTGCTTTCTTCTGTAGT TGATTTCC (서열번호 29)	CCGGCACACTCTCT TCTTGAG (서열번호 30)	TCCCACCACTGCCCA GCCCA (서열번호 31)
Hyg	GOA	TGCGGCCGATCTTAGCC (서열번호 32)	TTGACCGATTCTT GCGG (서열번호 33)	ACGAGCGGGTTCGGC CCATTC (서열번호 34)

LOA=대립 유전자의 소실; GOA=대립 유전자의 획득.

[0148]

[0149] 상기에 기재된 표적화된 ES 세포를 공여자 ES 세포로서 사용하고, VELOCIMOUSE® 방법에 의해 8-세포 단계 마우스 배아에 도입하였다[문헌 참조; 예를 들면, 미국 특허 제7,294,754호 및 Poueymirou et al. (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]. 독립적으로 키메라 CD8 β 유전자를 갖는 VELOCIMICE®(공여자 ES 세포로부터 완전 유도된 F0 마우스)를, 독특한 사람 CD8 β 유전자 서열의 존재를 검출하는 대립유전자 검정(특히 Valenzuela et al.)의 변형법을 사용하는 유전형 분석에 의해 확인하였다.

[0150]

선택 카세트는, 숙련가에 의해 공지되어 있는 방법으로 제거할 수 있다. 예를 들면, 키메라 사람/마우스 CD8 β 유전자좌를 갖는 ES 세포는, 사람 CD8 β 유전자 서열을 함유하는 표적화 작제물의 삽입에 의해 도입된 "loxed" 하이그로마이신 카세트를 제거하기 위해 Cre를 발현하는 작제물로 형질전환시킬 수 있다. 하이그로마이신 카세트는, Cre 재조합 효소를 발현하는 마우스에 브리딩함으로써 임의로 제거할 수 있다. 임의로, 하이그로마이신 카세트를 마우스에 보유시킨다. 한 실시형태에서, 카세트를 결실시켜 MAID 1739를 생성하였다.

[0151]

실시예 2.2: 키메라 CD8 α 유전자좌의 조작

[0152]

마우스 CD8 α 유전자좌는, VELOCIGENE® 기술을 사용한 마우스 박테리아성 인공 염색체(BAC) DNA로부터의 독특한 표적화 벡터의 작제에 의해 단일 단계로 사람화시켰다[문헌 참조; 예를 들면, 미국 특허 제6,586,251호 및 Valenzuela et al., supra]. BAC RP23-431M6로부터의 DNA를 BHR에 의해 변형시켜 거대 표적화 벡터(LTVEC), MAID 1738를 생성하여, CD8 α 엑토 도메인을 암호화하는 마우스 엑손 1-2(마우스 엑손 1의 Ala 코돈 27에서의 5' 접합부에서 마우스 인트론 2의 3' 접합부)의 상동성 사람 서열(사람 엑손 2의 5' 접합부에서 인트론 3의 3' 접합부(도 4))로의 대체를 함유하였다. 이것은 엑손 1의 초기에 마우스 리더 서열을 보유한다. lox2372-Ub-Neo 카세트를 사람/마우스 서열의 3' 접합부에 삽입하였다. 생성된 벡터의 다양한 접합부에서의 뉴클레오타이드 서열이 표 5에 열거되어 있으며, 서열목록에 제시되어 있다. 사람화된 CD8 α 폴리펩타이드의 완전 아미노산 서열이 서열번호 54에 제시되어 있고, 이때 사람 서열은 아미노산 28-179에 걸쳐 있다(서열번호 59에 제시됨).

표 5

키메라 CD8 α 표적화 벡터의 접합부 서열

접합부	서열	서열번호
엑손 1(마우스) 및 엑손 2(사람)에서의 마우스/사람	TGAACCTGCTGCTGGGTGAGTCGATTATCCTGGGGAGTGG AGAACGCT (AGGCCGAGCCAGTTCCGGGTGCGCCGCTGGATCG GACCTGGAAACCTGGG)	35
사람/lox 2372 부위의 5'	(ATGCCAGGGACAGCCTGATACTGTAGGTAGAGTCAGGGCT GTCCAAGT) ACCGGTATAACTTCGTATAAGGTATCCTATACGA AGTTAT	36
lox 2372 부위의 3' /마우스	ATAACTTCGTATAAGGTATCCTATACGAAGTTATCTCGACCTG ATCTGGAGGGAGACCTGGACCGGGAGACGTTGCTGGGGCAGG GTT	37

사람 서열은 괄호 안에 기재되어 있고, lox 부위는 이텔릭체로 기재되어 있고, 제한 효소 부위, 다중 클로닝 부위, 및 벡터-유도된 서열은 볼드체로 기재되어 있다.

[0153]

[0154] 상기에 기재된 사람화된 CD8a 표적화 벡터를, 사람화된 CD8b 유전자좌를 함유하는 마우스 ES 세포에 전기천공시켜 사람화된 CD8b 및 CD8a 유전자좌를 포함하는 변형된 ES 세포를 생성하였다(도 5). 사람화된 CD8a 유전자좌를 갖는 표적화된 ES 세포를, 사람 CD8a 유전자의 존재를 검출하는 대립유전자 검정(Valenzuela et al.)의 변형법을 사용하는 유전형 분석에 의해 확인하였다. 검정법에서 사용된 프라이머 및 프로브가 표 6에 나타내어져 있으며, 서열목록에 제시되어 있다.

표 6

키메라 CD8 α 를 유전형 분석하기 위한 프라이머 및 프로브

검출된 영역	검정	5' 프라이머	3' 프라이머	프로브
마우스 엑손 1	LOA	GATGCTCTGGCTCTT CCAGAA (서열번호 38)	ATGAAGCCATATAGAC AACGAAGGT (서열번호 39)	CCAGCTCCAAACTCCC CCAGCC (서열번호 40)
마우스 엑손 2	LOA	TCAGCCCCAGAGACCA GAAG (서열번호 41)	TCAAATCGCTTGAGAGC ACCTAA (서열번호 42)	TTGTCGGCCCCGTGGC TCA (서열번호 43)
사람 엑손 2	GOA	GCGTTCTCGGGCAAG A (서열번호 44)	TCAGGGCCGAGCAGAA ATAG (서열번호 45)	ACACCTTCGTCCTCAC CCTGAGCGA (서열번호 46)
사람 인트론 2	GOA	GGTTCACCTCAACCTG TTTTCC (서열번호 47)	CGCTTCCAGGTGCGCT AA (서열번호 48)	ACCTGGCCCTGCTTT CAAGCC (서열번호 49)
Neo	GOA	GGTGGAGGGCTATTG GGC (서열번호 50)	GAACACGGCGGCATCA G (서열번호 51)	TGGGCACAAACAGACAA TCGGCTG (서열번호 52)

LOA=대립 유전자의 소설; GOA=대립 유전자의 획득.

[0155]

[0156] 상기에 기재된 표적화된 ES 세포를 공여자 ES 세포로서 사용하고, VELOCIMOUSE® 방법에 의해 8-세포 단계 마우스 배아에 도입하였다(문헌 참조; 예를 들면, 미국 특허 제7,294,754호 및 Poueymirou et al, *supra*). 키메라 CD8b 유전자 및 키메라 CD8a 유전자를 갖는 VELOCIMICE®(공여자 ES 세포로부터 완전 유도된 F0 마우스)를, 독특한 사람 CD8b 및 CD8a 유전자 서열의 존재를 검출하는 대립유전자 검정(Valenzuela et al., *supra*)의 변형법을 사용하는 유전형 분석에 의해 확인하였다.

[0157] 대안으로, 본원에 기재된 사람화된 CD8a 표적화 벡터를 사람화된 CD8b 유전자좌를 함유하지 않는 마우스 ES 세포에 전기천공시켜 사람화된 CD8a 유전자좌만을 포함하는 마우스를 생성한다.

[0158] CD8a 유전자좌에서의 선택 카세트는, 예를 들면, 상기 실시예 2.1에 기재된 바와 같이 숙련가에 의해 공지되어 있는 방법으로 제거할 수 있다. 한 실시형태에서, 선택 카세트를 결실시켜 MAID 1740 마우스를 생성하였다.

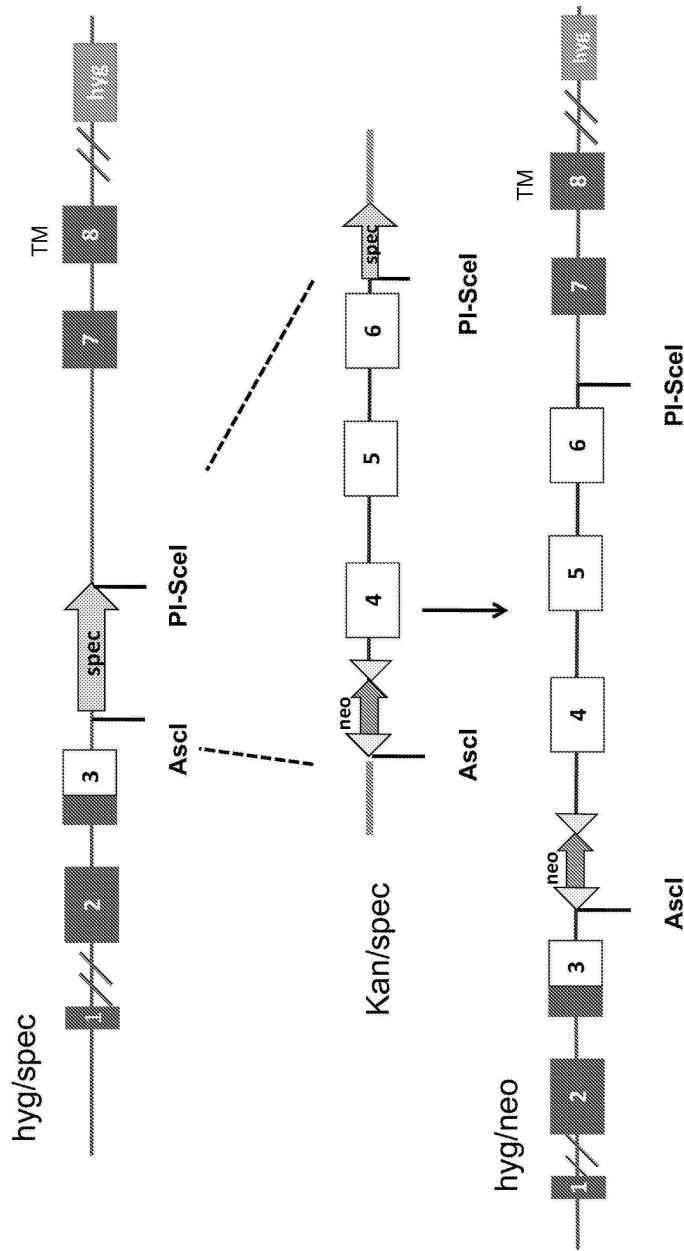
[0159] 실시예 2.3: 유전자 조작된 마우스에서의 키메라 CD8의 발현

[0160] 사람화된 CD8a(MAID 1740) 및 CD8b(MAID 1739) 유전자 둘 다에 대해 이형접합성인 마우스를 사람 CD8의 발현에 대해 분석하였다.

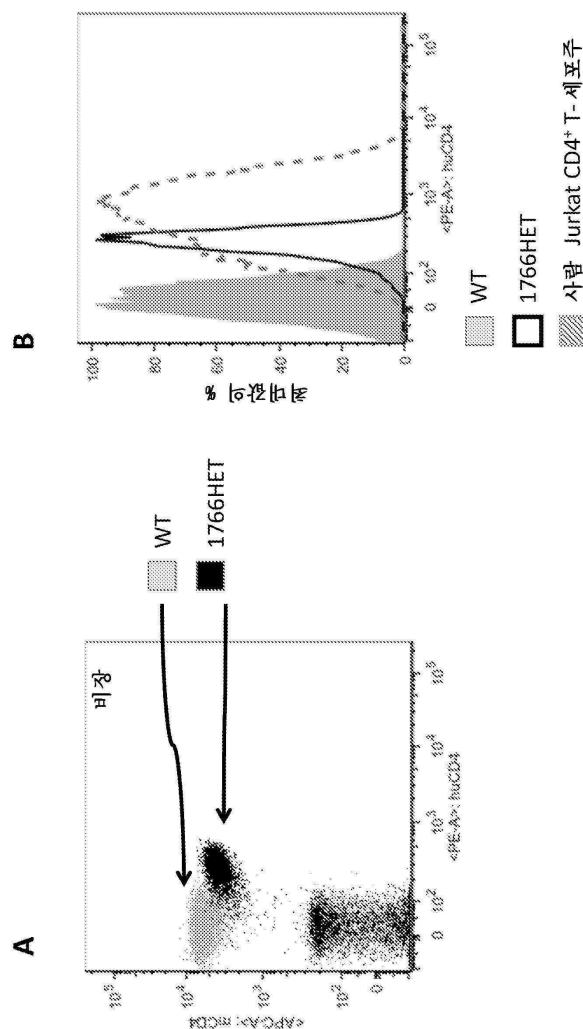
- [0161] 사람 CD8a 및 CD8b의 발현은, 야생형 동물이 아닌 이형접합체의 비장으로부터 유도된 CD3+CD4- T 세포의 표면에서 명확히 검출가능하였다(도 6).
- [0162] 사람 CD8a 및 CD8b의 발현은, 또한, 야생형 동물이 아닌 이형접합체로부터 수득된 흉선세포의 표면에서 검출가능하였다(도 7).
- [0163] **등가범위**
- [0164] 당업계의 숙련가들은 불과 일상적인 실험을 사용하여 본원에 기재된 본 발명의 특정 실시형태의 다수의 등가범위를 인식하거나 알아낼 수 있을 것이다. 이러한 등가범위는, 하기 청구범위에 포함되는 것으로 의도된다.
- [0165] 본 출원 전반에 걸쳐 인용된 모든 비특허 문헌, 특히 출원 및 특허의 전체 내용은 그 전문이 본원에 인용에 의해 포함된다.

도면

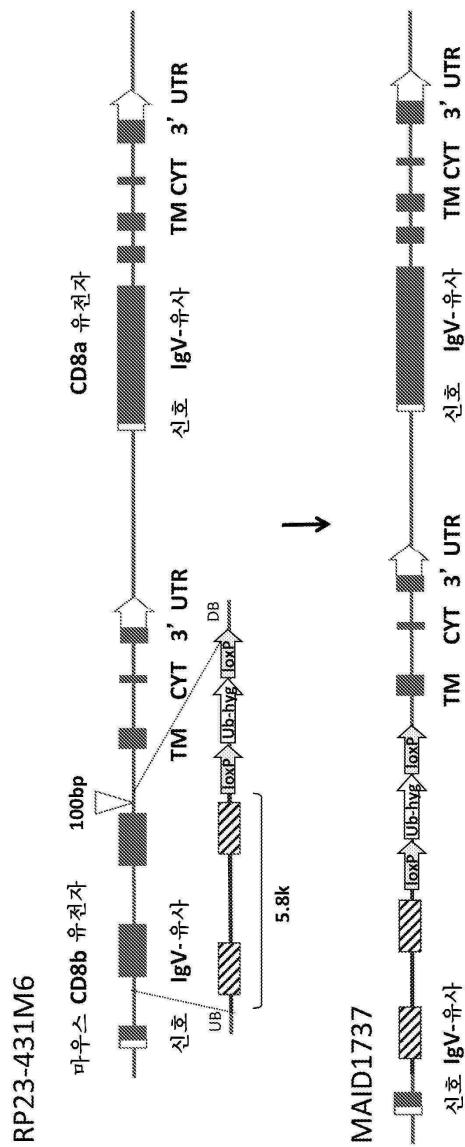
도면1



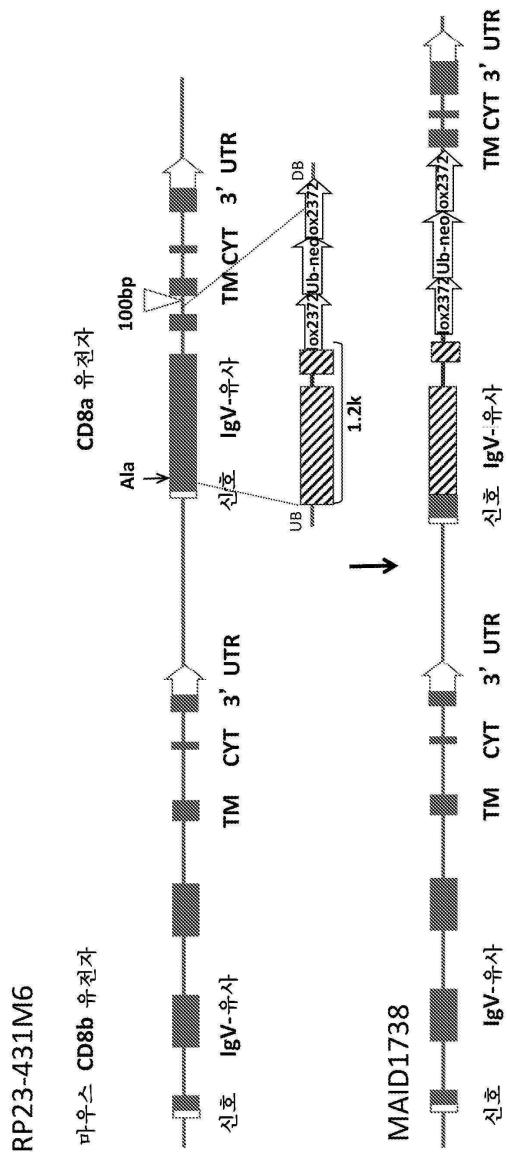
도면2



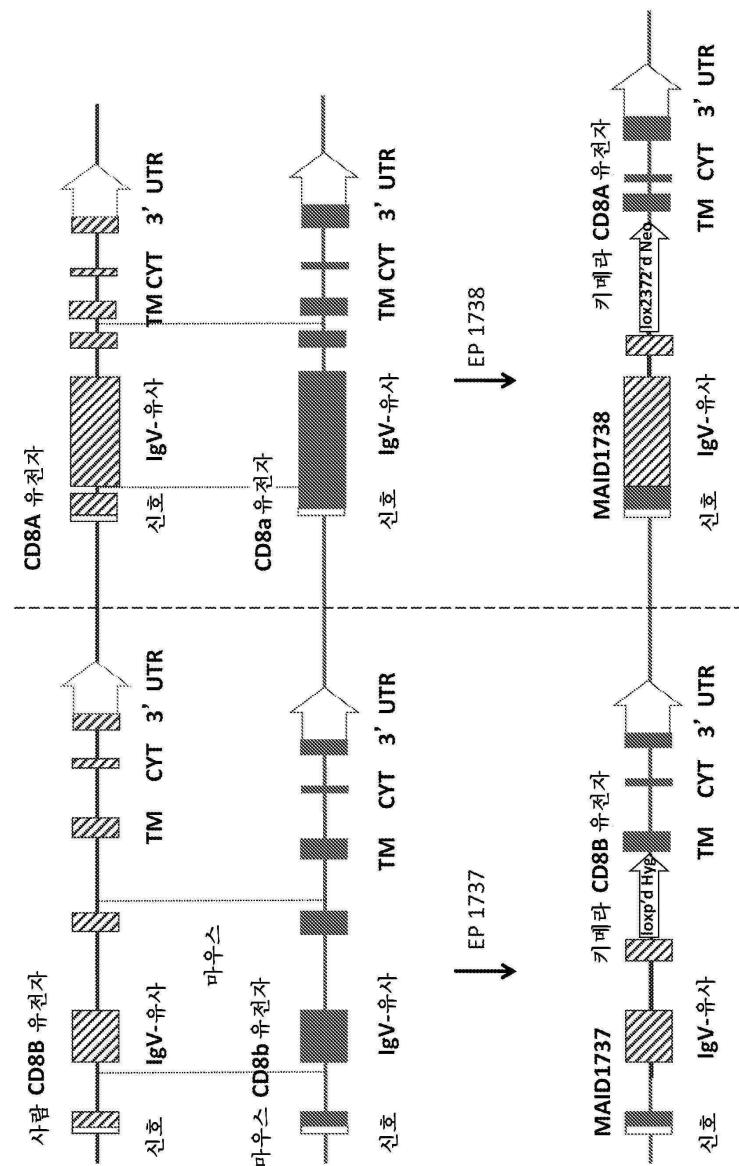
도면3



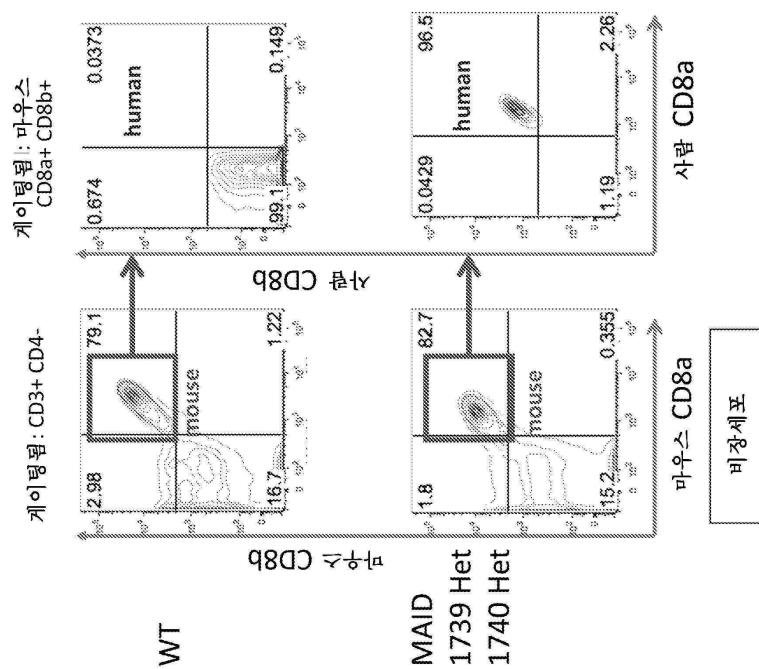
도면4



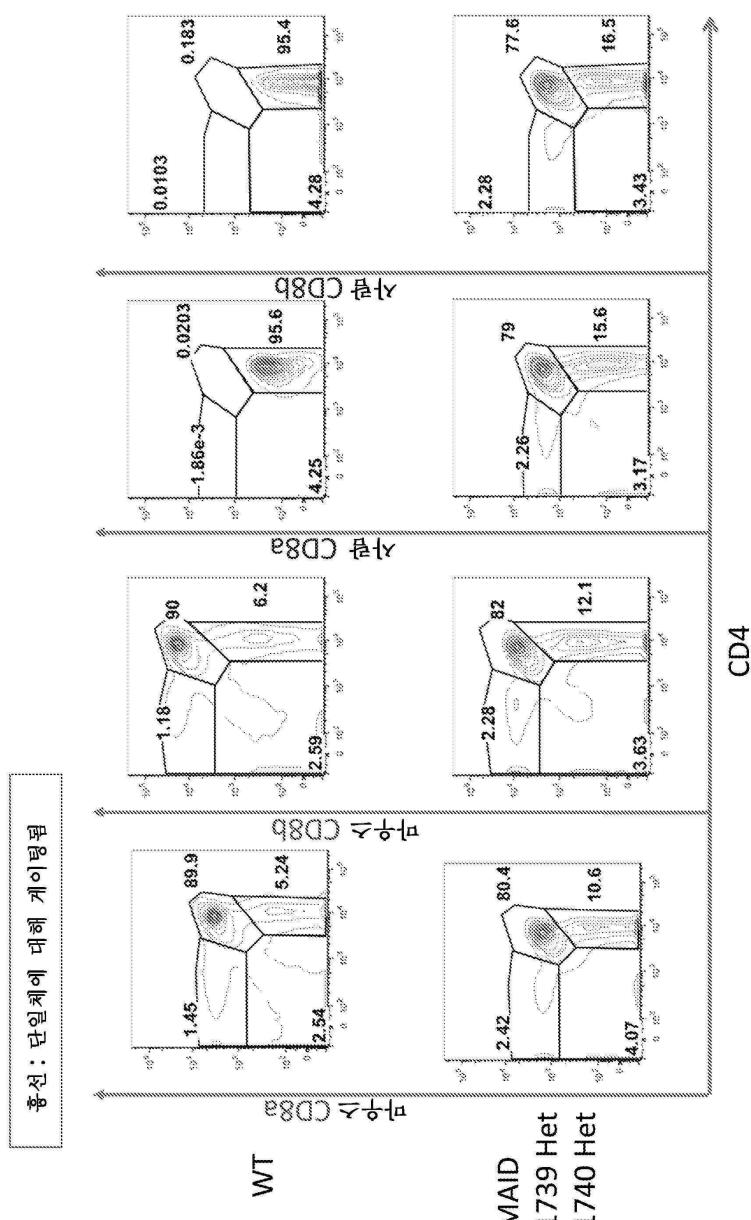
도면5



도면6



도면7



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> REGGENERON PHARMACEUTICALS, INC.

<120> MICE EXPRESSING HUMANIZED T-CELL CO-RECEPTOR

<130> 2010794-0441

<150> US 61/766,762

<151> 2013-02-20

<150> US 61/890,915

<151> 2013-10-15

<160> 59

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 202

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> synthetic

<400> 1

aggggaaacc cgcaaaggat gggacatagg gagacagctg ttaacatctg aaacatgacc 60
 ttctttctg tgacgcacaa ctcctagctg tcactcaagg gaagaaagtg gtgctggca 120
 aaaaagggta tacagtggaa ctgacctgta cagctccca gaagaagagc atacaattcc 180

actggaaaaa ctccaaccag at 202

<210> 2

<211> 240

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Synthetic

<400> 2

ctggtcacct ggatgaagtg agggagggcc ctctgggtt gggctgggtt ttgaactgag 60
 acatccatga gccagcctgg ggctggcttc actgaagatc atctatgtcg ggtgcggaga 120
 aagaggtaat gaaatggcac atgctatgta caaactctat tgctgagcag caccctatcc 180
 tgagctggct ctgaatttag ggtgaaattc acacattctc ccccaacatc tataatctgg 240

<210> 3

<211> 18263

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Synthetic

<220><221> misc_feature

<222> (2957)..(2957)

<223> n is a, c, g, or t

<220><221> misc_feature

<222> (3193)..(3193)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 3

aagaagaatgg tgcgtggcaa aaaaggggat acagtggAAC tgacctgtac agcttcccag	60
aagaagagca tacaattcca ctggaaaaac tccaaaccaga taaagattct gggaaatcag	120
ggctccctct taactaaagg tagggttgcc tggctccca tccagggagg aaaacacact	180
atggagtgaa agccttgggt gtctgagatc tggcttagt taaactctgg gatggcgcg	240
ccgaattcct gcagcccgaa ctcgagataa cttcgataa tgtatgtat acgaagttat	300
atgcatccgg gttagggagg cgctttccc aaggcagtct ggagcatgct cttagcagc	360
cccgctggc acttggcgct acacaagtgg cctctggcct cgcacacatt ccacatccac	420
cggtaggcgc caaccggctc cgttcttgg tggcccttc ggcacccctt ctactccctc	480
cctagtctgg aagttccccc ccgccccgca gctcgctcg tgcaggacgt gacaaatgga	540
agttagcactt ctcactatgtc tcgtgcagat ggacagcacc gctgagcaat ggaagcgggt	600
aggccttgg ggcagcggcc aatagcagct ttgctccttc gcttctggg ctcagaggct	660
gggaagggggt gggccgggg gcgggctcag gggccggctc agggccgggg cggccggcccg	720
aaggctctcc ggaggcccg cattctgac gcttcaaag cgcacgtctg ccgcgtgtt	780
ctcctcttcc tcatctccgg gccttcgac ctgcagccaa ttgttgacaa ttaatcatcg	840
gcatagtata tcggcatagt ataatacgac aagggtgagga actaaaccat gggatcgcc	900
attgaacaag atggattgca cgcaggctct ccggccgctt gggtgagag gctattcgcc	960
tatgacttggg cacaacagac aatcgctgc tctgatgcgg ccgtgtccg gctgtcagcg	1020
cagggccgc cggctctttt tgtcaagacc gacctgtccg gtgcctgaa tgaactgcag	1080
gacgaggcag cgcggctatc gtggctggcc acgacggcg ttcctgcgc agctgtgctc	1140
gacgttgtca ctgaagcggg aaggactgg ctgttattgg gcaaggatgcc gggcaggat	1200
ctcctgtcat ctacacccgc tcctgccgag aaagtatcca tcatggctga tgcaatgcgg	1260
cggctgcata cgcttgcattt ggcttacccgc ccattcgacc accaaggcggaa acatcgatc	1320
gagcgagcac gtactcgat ggaagccggt ctgtcgatc aggatgtatc ggacgaagag	1380
catcaggggc tcgcgcgc cgaactgttc gccaggctca aggccgcgtt gcccacggc	1440
gatgatctcg tcgtgaccca tggcgatgcc tgcttgcga atatcatggt ggaaaatggc	1500
cgctttctg gattcatcga ctgtggccgg ctgggtgtgg cggaccgcta tcaggacata	1560
gcgttgtgcta cccgtgatat tgctgaagag ctggccggc aatggctga ccgccttcctc	1620
gtgccttacg gtatcgccgc tcccgattcg cagcgcgtatcg cttctatcg cttcttgcac	1680
gagttttctt gaggggatcc gctgtaaatc tgcagaaattt gatgtatctat taaacaataa	1740
agatgtccac taaaatggaa gttttccctg tcatactttt ttaagaagg tgagaacaga	1800

gtacctacat ttgtatggaa aggattggag ctacgggggt ggggggtgggg tgggattaga	1860
taaatgcctg ctcttactg aaggctctt actattgctt tatgataatg tttcatagtt	1920
ggatatacata attaaacaa gcaaaaccaa attaaggccc agtcattcc tccactcat	1980
gatctataga tctatagatc tctcggttgc tcattgttt tctcttgatt cccacttgt	2040
ggttctaagt actgtggttt ccaaatagtgt cagtttccata gcctgaagaa cgagatcagc	2100
agcctctgtt ccacatacac ttcattctca gtattgttt gccaaggttct aattccatca	2160
gacctcgacc tgcagcccta gataacttcg tataatgtat gctatacgaa gttatcctag	2220
gccagagggc ttgggttgac agaaactcag tggcattttt atccagagtt tctctacacc	2280
aactgcgtt gcccaggaa aaggtggat gtgaatttca atatttaat atttaatatt	2340
catgaactta ttttagtgag ttttagaaca atcactatca cttaaaaccc gtgatttctt	2400
gagtattgtt gctacagacc tatgttagata atacttgca cagtgactca tatgtataat	2460
cctagactg tggaggctg aggccggagg attgcttgag tccaggagtt caagaccagc	2520
ctgaacaaca tagtgagact ctgtctctat gaaaaaaaaat atatatatat ttttttgaa	2580
gacaaggctt agttctatca cccaggctcc agtgcagtttgg tttgatctcg gctcactgca	2640
atctccacct cccaggctca agtcatcatc ccacccatc ctcggacta gctggacta	2700
caggcatgca ccaccatgcc aggcttaattt ttgtatTTT tatagagaca gggtttcacc	2760
atgttggcca ggctggctc gaactcatga gctcaagtga tccactcacc ttggcccttc	2820
agagtgtgg aattacaggt gtgtgtcact atgcctagcc aaaaaaaaaatt ttttaatta	2880
aaaaaaaaaa ggccggctgt agtggctcac acctgtatc cagaactttg ggagttttag	2940
gtggcagat caccggnggt caggagttca agaccagttt gccaacatg gtggaaacccg	3000
gtctctacta aaaatacaaa aattagccag gtgtgggggt gcagtctgt acttccagct	3060
actcaggagg ctgaggcagg agactcgctt gaacctggaa ggcaaggct gcagttagct	3120
gagatigcac cactgcactc cagcctgggt gacagagcaa gacttcatct caaaaaaaaaa	3180
aaaaaaaaagctg canattttt attattttaa ttgtttttt tttttttttt tttgagacag	3240
agtctcggtc tgcgtccag gctggagtgc ggtggcgtga tcttggctca ttgcaccc	3300
caccccccgg gttcaagtga ttctcctgcc tcagcctccc gagtagctgg gactacaggc	3360
gtatgccacc atgcctggct aatttttgtt acttttagta gagacagagt ttacgggt	3420
tagccaggctt ggtttgtatc ttctgaccc tcgttacc ctccggcc tcccaaagtgt	3480
ctgggattac aggcgtgagt cactgtgccc ggcccagaat cattttttca tactttttt	3540

tttttgggc aaactctcg a tctgttgc c aggctggagt g c a g t g g c a t g a t c t t g g c	3600
tcactgcaag ctctgcctcc c aggttcaag caattctcct gcctcagcct cctgagtagc	3660
tgggactaca ggcgtgtgcc accatgcccg gctaattgc gtattttag tagagaccgg	3720
ttttcatcat attggccagg ctggcttga actcctgacc tcaagtgatt ctcccacctt	3780
agcctccaa agtgcgtggta ttacaggcat gagctactgc acttggcctt ttctcctggt	3840
tttaaaacta ttatatgctc attacaaaat atttggtcaa tgaagaaaag aatatgaa	3900
aaaatcaaat gcatgcatac ttctatcact cagagatatc ctctgcta aatttgattt	3960
attttctcc aatcttttt tttttttt tttttgagac agggctcac tctgctgccc	4020
aggctggagt acagtggcat gaccacaaca catcacagcc tcaagtgate ttcccactt	4080
agcctccca gtagctggta ctacaggtgc acgccaccat gttcacctaa tttttactt	4140
ttttagaga tgagacttca ccatgttgc caggctggc ttgaattcct aggctcaagt	4200
gatctcccg ctggcctc ccaaagtgc gggattatag gatgagcca ctgcattgtgg	4260
cctattttct tccactgttg ttggcgtgg agaatattat atacataatt acgtaaatga	4320
tatcataactg tatatacctt tttcctact cttcctaa gttatcat aatgagacta	4380
ccaattatta gactttttt cttttttg agacggagtc tcggctgtc acctaggctg	4440
gagtgcaatg ggcgcatctc agctcgctc aacctctgc tccaggttc aagcaattct	4500
gcctcagecct cccgagtagc tggactaca gacacgtgcc accatgccca gctaacttt	4560
ttatttttt attagagaca gggttccacc atgctagcag gatggctca atctctcgac	4620
ttcgtgtca gcccggcttgc ctcccaaa gtgcgtggag tacagggtgtg agccaccgca	4680
ctcggcctag actaactatt taaagtaatc tggcaatgtt taacgaatac aaaactctaa	4740
aacccttgga cctaataata gctatttgg aaagtctact tgacagaaat aaaattgtga	4800
atattctttt ttgtgtttt tttgagacag agtctcattt ggacgcctag gctggagtc	4860
agtggcatga tctcggttca ctgcaacctc cacctctgg gttcaagtga ttctcctgc	4920
tcagccttctt gagecagctgg gattacagggt gtgcaccacc atgtctggct aattttgc	4980
tttttagtag atgggtttc accatgttgc ccagggtggt ctggacttc taccctcaag	5040
tgatctaccc acctggcct cccaaagtgc tggattaca ggtgtgagcc accacgcctg	5100
accagtgaac actaataat atctatggaa aggtgttatt ataagaattt cttgtgggc	5160
cggcgtggc ggctcacgccc tggatccca gcaacttggg aggctgtggc aggccgtca	5220
cgaggtcagg agatcaagat catcctggct aacacggta aacccgtct ctactaaaaa	5280

taccaaaaa tttagccaggc gtgggtgcgg gcacttgtaa tcccagctat ccaggaggct	5340
gaggcaggag aattgcgtga acccaggagg cgagggtcgc agtgagctga gaccgtgcc	5400
ttgcactcca gcctgagtga cagagtgaga ctccatcaca aaaaataaat aaataaataa	5460
ataaaaatata aataagtaaa taaaggtcgagtggtggc tcacgcctgt aatcccagca	5520
ctttgggagg ccgaggtgga cagatcatga ggtcatgaga tcaagaccat cctggctaac	5580
acagtgaaac cctgcctcta ctaaaaataac aaaaagtcat ccaggtgtgg tggcacacac	5640
ctatagtccc agctacttgg gaggctgagg caggagaatc acttgaaccc aggaggcaga	5700
gtttgcagtg agctgagatc gcgccactac actccagcct aggcgcacaga gcaagactct	5760
gtctcaaat aaataaataa ataaataaat aaataaataa ataaataaaa taaaagcac	5820
acacacacac acacacacac acacacaatg caaaagaccc accctactac aactaacatt	5880
atatttaatg gtaaaaact gaattcttc tccctaagtgc caggaataag acaaagatgt	5940
ctgctttac tactttatt caacataata ctgcaatccc ttggcagtgc aataaggcaa	6000
aaaaaatgaa ataaaaggaa aactgatcg aaagaaagaa ataaaactgt tcctattgt	6060
ggatgacatg attacataga aaatctcaa gaatctgtaa gaaacttctt agaattaata	6120
aatgaattca tcaaggttgc agaatataag ataaacataa aaaatctatt gtatttctat	6180
atattagcaa ggaacatgtg tacacagaaa ttaaaactac aataccattt ataattgtc	6240
aaaaaggcca ggcattgtgg ctcacacctg taattcctgc actttgggag gccagggtgg	6300
gaagattgct taagcccagg agttcaagac cagccggc aacatagtga gaccttgtct	6360
ctacaaaaag taaaaaatta gctgagcatg gcccggcgtca gtggctact cctgtAACCC	6420
caacactttg ggaggctgag gcccggcgtcatgagatcgaccatctgg	6480
ctaacacggt gaaaccctgt ctctactaaa aacacaaaaa attagctgga tgtggcgtca	6540
ggcgcctgtta gacccagcta ctggaaagc tgaggcagga gaatggcgtg aacctgggag	6600
gcggagcttg cagttagctg agattgtgcc actgcactcc agcctgggtg acacagttag	6660
actacgtctc aaaaaaaaaaaaaat tagctgagca ttatgggtgtatgcctgttagt	6720
cccagctact gggggaggctg aggtgggagg attgcttgcgatggcgtccatggagg gcaaggctgc	6780
agttagccat gatcacacca ctgctttcca gcctcggttag gagagcaaga ccctatctca	6840
aaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaa agaaaagaaa agaaaagaaa agaaaagaaa agagagaaaag	6900
aaataacttag gtgtaaatct aaaaaacatg cgtagggcca ggtgcagtgg ctcatgcctg	6960
taatcccagc acttggaa gttgaggctg gcggtact tgaagtcgg agtttgagac	7020
cagcctggcc aacatggtga aaccccgctctactaaaaa tgcaaaaaatt aggccagggtgt	7080
tgtggcgtcat gcctgatccc agctacttgcgaggctgagg caggagaatt gcttcaaccc	7140

gggaggcaga ggttcagtg agccaagact gttccactgc actccagcct gggcaacaga	7200
gtaagagtct gtcctccgaa aaaaaaaaaa agaaaaaaga aagcatgaa ttgtatgcta	7260
aaaactacac gatgctgatt aaagaagtca aagaagatct aaatatatgg agagacatgc	7320
tgtactcatg gatitgatgga ttggaagact caacataaga cagatataaa ttttcccaa	7380
attaatatac aagtttaatc caattcctat aaaaataccca gcaagatttt ttgtatgat	7440
aaacaagttg gccaggtgta gtggcttaca cctgtatcc tagcacttg ggaggctgag	7500
gtgggaagat cgcttgagcc caggtgtca cgactgcagt gagctatgat tgtgtactg	7560
cattccagct ggcactccag cctaagtgac aaagggagac cctgtctcaa aaacaaaaac	7620
aaaaccaaaa taatttgct ctgaaaatc cctattaaga agaagaaaag aggctggca	7680
cagtggctca ccgctgtaat cccagcacgt tggaggctg aggcaggctg atcacttcag	7740
cccagaagtt tgagatcagc ctggcaaca tgagggaaacc ccgtctctac caaaaaaaaaa	7800
aaaaggtaca tacacacaca cacacacaca cacacacata cacaagtata tacacatata	7860
tatacacata caggtgaata gatgtatata catctattta ttgtgaatat acatctatac	7920
acacacgtgt gtgtacacat atataaaaa tttatttta tttatttatt tatttttag	7980
acagagtctt gctctgtcac ccaggctggg tgcacctgta ttcccaacga cacaggaggc	8040
tgaggtggga gaatcactga gccagggagg cagaggttgc agtgagccaa gatgttgct	8100
ggttgctgg gcaacagagc gagaccctat atcaaaaaag aagaataata agaaaagaca	8160
gtttacagaa tataagaaaa tatattcaca atccacatac ttagcaaagg actggtatct	8220
agaatatgat aaacaactct caaaaactaa aaccaaaaaa atgaacaatt caattagaaa	8280
acaggccgaa aaggacatac agttggcaa taagcacatg aaaagtgtt caacatcatt	8340
aatcattagg gatatgtaca taaaaccac aataggctat cactaaacct atcagaatgg	8400
ctaaatacaa aatttggaca ccaccaaattg ctgatgagga tgtggagaaa ctgggtcatt	8460
cttccaatat tggggagg ctaaaatggc aaagccactc tggaaaacag tttgatagtt	8520
tcttataaaa caaaaatgc ggccggcgc ggtagtcac gcctgtatc ccagcacattt	8580
gggaggccga ggcgggtgga tcacgaggc aggagatcga gaccatctg gctaacaacgg	8640
tgaaaccctg tctctactaa aaataaaaaa aattagccgg gcgtggtggc gggcgctgt	8700
agtcccagct actcgggagg ctgaggcagg agaatgggtt gaacccggga ggcggagctt	8760
gcagtggcc gagatcgcgc cattgcactc caacctggga gacggaggga gactccgtct	8820
aaaaaaaaaca aaaacaaaca aacaaaaac atgcaacaat ccagcaatat tgccatccata	8880
ggcatttatac cttagagcaat gaagacttat gcccacacaa aaagctgcac acaaataat	8940
atagcagctt tattcatggt agccaacaat tagaaacaat cttagatgtcc ttcaactggt	9000

ataacagtagt caccctcctt gttctccaa tttctgaaac acagagtcac gttttttct	10800
ctgcttaat ccctggtttc ctatcgcat caattatgac ctttccttgc tttgaaagt	10860
ttttggccg ggcatgatgt ctgccaccta ttgtaatcct agcacttgg gaggctgagg	10920
cggctggatg acttgacctg aggatttgcg gaccagctg ggcaacagg cgaaacctcg	10980
tctctacaaa aaatacaaaa gtttagtcggg agtggtgca catgctgtt gtcccgat	11040
cttggggggc tgaggtggca ggtatctttg agcccacgag gtatgttg cagtggccg	11100
tgattgcgcc actgcacccc agcctaggtg acagagttag accctgtctc aaaaaaaaaa	11160
aatgttcta gttcttcctt cttctttgtt cccatggaa tgccaccatc accagccaag	11220
gctcacatac ctcccacctg gattacagtg agcttccagg taatggtc tgctactagt	11280
ctcgccact tggatttccc ttccccctgc tgcagcattt cttccaaag ccatgcttg	11340
cacatgccac atcttagccc attagactaa gcctagaagc ctctgcaggcg ctttccac	11400
ctcagcgcca ctgctcgtt tccctggaa aacctctgca cccaggaggt ttccccacag	11460
cttgcctgtt ctgcctctt ggagctttc tcccttcctg taatgtcctt gctgtcccc	11520
gtctctagtc cattgcctat acctctttt tttttttt ttgagatggaa gtctctctt	11580
ctcatccagg ctggagtgca gtggcgcat ctggctcac tgcaacctt gtctctggg	11640
ttcaaggat tctctgcct cagccctcccg agtaactggg attacaggcg tgccaccacca	11700
ttcctggcta atttttgtat ttttagtaaa gactgggtt caccatgtt gccaggctgg	11760
tcttgaactc ctgcctcag gtgatccacc tgccctggcc tccctggatgt ctggattac	11820
aggcgtgagc caccgcacct gccacaggcc cataccttt ttaagtttc attcaatacc	11880
agttgtccca tgaatttgc ccaactac tcatatgtt agaccttca tattatctt	11940
ccatagctt ttcaaagtat gggacagcat ggacaaggcag gcatgggtt tctttgaag	12000
agaagcaagg aggcagagtt attttaggag gagggtata catttcattt tgaaccaatt	12060
cggtttgggg tgaatggcagg atattaacat aaacttattt ctggaccat tgaaatgt	12120
tgccttagaac tgaggagaga ggtcaggctt ggcagtaaca acttggccac aatctgcaga	12180
gctgactgg gatgaggtgg aattttagaaat gtctgttgg acggggaaaga gaaccaaaga	12240
cagagtctgg gacaacacctt aaatgttagat gtcagagcaa gagttcaaga cgaagaaaaa	12300
caaatcatac tttagaaatgg aggggaggaa caaaagaggc ggagcaaaat gggcagaac	12360
cagagtaggc cacgttttta agaagttgg taaaggaact gtgaaaggaa tgttagttgaa	12420
tttcaggta agctggggaa taaagcagt gtgttagatcc agggcaaca gcaagtaggg	12480
caggaaccac tgaaggaaca aataaagggg gaggtgggtt ccaggttgc ttgagtaggg	12540
aagttttttt aaaaagtgtt aaactgaagg tgggggtgg attgggtgcc tgccgtctc	12600

tgaggaagct tggggcaact gtgtgcttag gctgtgaggt tgtctggaag gggctcctgg	12660
acagtaagag ctgagcagtg ggaaagagga ctgtgtggc tggaaagagga gagaaaggag	12720
agtgagtgac tgaactggta tccaggctcc cacaccaagg cagaaagagg gagaggacct	12780
gggcatctca gggaggcaga ggcagtagca agcagggtaga gaggcttag tcttagccac	12840
cttgccccca ttccctccaaa tatacattct aagtaaaaac aaaacaaaac agaactgttt	12900
gctatgtaaa tttagcttct aaagccctgt tctacagaga tttggagct tccactgcac	12960
ccagaaaaatg cacagctaaa gagaaaaactt cccttggta tggttatttag attttacaag	13020
aagaggccaa aggagacaca tacttatgcc agaagaactt tccagagata gcattgcata	13080
gcgaaatagc ctgaattatt ttatTTTT aaaacatttt ttcTTTCTT ttttCTTT	13140
tttttCTTT tttttttttt ttttgagac agagtctcac tctgtcaccc aggctggagt	13200
gcagtggcgt gatctggct cactgcaatc tccacccc gggttcaagc catttcctc	13260
cctcagcctc ccaagtagct gggattacag gcatgcgtca ctatgcctg gctaattttt	13320
tttttCTTT ttttttgggt attttagta gagatggggt ttcaccatgt tggccaggct	13380
ggcttgaac tcctgacctc aagtgtatcca ccgccttggc ctcccaaagt gctgggattt	13440
caggcgtgag ccacccgacc cggccaaaaa ttctttct ttaagatgag gcctcactct	13500
gttgcCcagg ctggagtgca gtgttacaat catagtcac tgtaactttg aactcctggg	13560
ctcaagtgtat cctcctgctt cagcctctca agtagctggg attacaggca tgtgccacca	13620
caccagcta atttttta aaataatttt ttttagagac gaggctctcg attggctgcc	13680
taggttggtc ccagactcct gacgggctgc atttaatcc tagctccacc acttacggga	13740
gtcaaaattc aaaagataga aaagggcata taggctgggt gcagtggctc acacctgcaa	13800
tcccagcaat ttgggaggct gaggtggcgg ggttgcggta ggtcaggagt tcgagatcag	13860
cctggcaac atggcaaaac ttgtatctac taaaaataca aaaattagcc agatgtggtg	13920
gtgtacacct gtaatcccag ctactccgaa ggctgaggca agagaatccc ttgaactcag	13980
gaggcagagg ttacaatgag cagagatcga acactcgact ccataaaaac aaacaaacaa	14040
aaaaagaagagg caggctgggt gtggctggctc acgcctgtaa ccccagcact tcgggaggcc	14100
aaggcgagcg gatcacctga ggttggcat tcgagaccag cctgaccaac aaggagaac	14160
cctgtctcta ctgaaaatac aaaattagcc gggcttgggt gcgcacgcct gtaatctcag	14220
ctactcggga ggcagaggca agataattgc ttgaacccgg gaggcggagg ttgcggtgag	14280
ccaagatcat gccattgcac tccaacctgg gcaacaatag cggaaactcca tctcaaaaaa	14340
aaaaaaagcaa agggcatata gtgaaaagct ttcttcctac acatgagttat tcacttcctc	14400
ttccttagagg caaccaaggt tattttgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg	14460

tgttttggga cagtctca ctctcacca ggctggaatg cagtggtgcg atctca	14520
aaactctgcc tcccagtctc aagcgatctt gtgcctcagc ctcccagtt tttttctt	14580
taaatgggt ctcatctgt cgcccagggt ggagtgcagt ggcatgatca tagctca	14640
cagcctcgac ctccctggtc aggttacct cccacccag cctccggcat agctgggct	14700
actggcatgc accaccacac tcagttattt tttttctt tttgagacag agtctca	14760
tgtcacctag actggagtgc agtggtgcca tctcattgtt ttcactgcaa ccttgactt	14820
ctgggctcaa gtgattctcc cacctcagcc tcccaaggcg gctaattaaa aaaaatttt	14880
ttttttttt ttttagagat ggggttcgc catgttgccc aggctgatct cgaactcctg	14940
ggcacaaaca attttccac ctgcgttta caaagagctg ggatgagaga tttccaccat	15000
gcctggcctc attttctttt ttaattttt tttagacatt atagctttt ttaatggct	15060
cattttctta tggtaattt gagaattttt ctttcatat acaaagaata tattttctcc	15120
acctttaaaa acaaataatgta gactgtttaa catctcgctt tattcagttt gtgatgttc	15180
ttagatacgg gtccaaatta gtacacaaag cacttctca ttctctctt acggctgcat	15240
agcagtccac tgaatgggtg agctatgatc tatttaacctt attcttattt gatggacatt	15300
tggtttgta tatacatttg taattctgta tagattacaa atcaccatcc aaagaattt	15360
tactggttta ttctcctaca atgtgtgaga gttggtaat tacttaatct caatatgtga	15420
gagtttaggc agttacctaa tctctctgag tctcagtttc tctatctgca aaataaaca	15480
aacagtgtt acagtatcta ttctcgaa ttattgtgga gattactgag atgatgcctg	15540
taaagtattt ggcgtttagg agttgggtctt ctccaaataa ggatatgatt ttatttgat	15600
ttgtgagcta ctgtcccagc caggtaaatg gatatgtga gaccccttg ccagaccggg	15660
tttctctgat tagaacgagg agcagatgtt gcagggaaattt agcaactgat atcagaagag	15720
ccgtggccat tctcttgcca gaggtgcctt gtctccaggc cgcctcagtc ccccccata	15780
tgtctctgc tcccagggtcc atccaagctg aatgatcgctg ctgactcaag aagaagcctt	15840
tgggaccaag gaaactttcc cctgatcatc aagaatctt agatagaaga ctcagatact	15900
tacatctgtt aagtggagga ccagaaggag gaggtgcaat tgcttagtggt cggatgtgag	15960
tggggcaggt ggggatgagg atacctcctg cctgggtccc ttccccacta ctcccacccc	16020
tgcacccaaat ccagcctgag ctggtgatac cgcagcagcc ccaagaggac caggctgtca	16080
aactggcctc caaatgtttt aaaaccctt ttgtatggat gggatgtt ggtggcggga	16140
ggagggaaaga ggccttggga aaaggaaaga aaaggaaagg aggcaaggaa aggagggaga	16200

gagactgggg aagagaggat gagggggagag gaggaaagaa gagagagagg aggggagagg	16260
gaaaccctat ctggctggg ggtgcgcgc tgggtgtgg gaggaggag atgttggac	16320
ggcgataatg gagagatgtt gttgttcc tgggtctgc cttctcctt gggatggta	16380
tgtgtgtac acagctggcc ttccctcca cagtgactgc caactctgac acccaccigc	16440
ttcaggggca gacgctgacc ctgacccgttgg agagcccccc tggtagtagc ccctcagtgc	16500
aatgttaggag tccaagggggt aaaaacatac agggggggaa gaccctctcc gtgtctcagc	16560
tggagctcca ggatagtggc acctggacat gcactgtctt gcagaaccag aagaaggtag	16620
agttcaaaat agacatcggt gtgcttagta agggaaagccc ctcttcgcgc agtctccctc	16680
ctgccccagg ggcgtacgc ccctccctct gctctgactg ccctgtttct gttctgtgt	16740
ctggagggtc aggagtggag aagacttaggt cccctagagc tgaggcctgt cttgaaggac	16800
tcaactgggc cctcatcctc agggggctga ttggcagcca cccctcagtgc tggtggacat	16860
ggagaaagga aaggctgggg aaggttaagga tgctagaggc ccgagcttcc tttggaggcc	16920
ccaaaggagg aatgtcaggg agcttacttt ctttggcc tcagctccac acccctacca	16980
agttggcaaa tccacttact cagggacact aacaccagta agccaaccct gatgtatgttc	17040
tatgttgta cttctggaccc ctaagccagg ccactgtggg gagaccaagg tcctacccca	17100
gatcctgtcc cttgggtgt tatgtgactt aaggttagaca taaggtagtg tgccagttta	17160
gtgcatgtac gctgattgaa atcctgggtc tgccacaacc atgtgacccctt gggtgagtt	17220
ctaaacctct ctgcacccctt gttcagccct ctgtgaaatg gggatgtatgt taactgccat	17280
agtgactacc tcgttataag ttgaggactg atatacgtaa ggcactgaaa atgggccttg	17340
gcacagagta agccctagtt aagtgttcgc tggatggatg tgaagggtga tgaatacgcc	17400
tctaaggagt ggaggccaaa tggcttctgt ggtccaggaa tcctaaggac agcaaggatc	17460
ccctgtggct gggctgctct gtgtatggctt ccggggaggag ggaggtggcc tgctgttaga	17520
aatgctggg tggagaagg gagagaaggc tggagaggta ggaaggaaact gaagtatctg	17580
aagtgacaag gtgggtgtct ggactcgctg ggtcccttc catctccctg ctgcctccac	17640
atgcaccaaccc cactcggtca ccctcatctt cctatctcct cacccagggt ctctcccttc	17700
ccacccctcag ctggccggaa ggcctccagc atagtcata agaaagaggg ggaacagggt	17760
gagttctctt tccactcgcc cttagtgcgtt gaaaagctga cggcactgtgg cgagctgtgg	17820
tggcaggccgg agaggcttc ctccctccaag tcttggatca ctttgcacccat gaagaacaag	17880
gaagtgtctg taaaacgggt tacccaggac cctaaatgtcc agatggccaa gaagctcccg	17940
ctccacccctca ccctggccca ggccttgcct cagtagtgcgt gctctggaaa cttccacccgt	18000
gcccttgaag cgaaaacagg aaagttgcatt caggaagtga acctgggtggt gatgagaggt	18060

gaggggccag gccagggagg ggtggcagg ggaaggagg tt ggagggcct ggccaggc	18120
tccctctgag gcaagccagg ccccaagagg ggatgcctag gccctggtca cctggatgaa	18180
gtgagggagg gccctctggg tttgggctg gtttgaact gagacatcca tgagccagcc	18240
tgggctggc ttcaactgaag atc	18263

<210> 4

<211> 458

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic

<400> 4

Met Cys Arg Ala Ile Ser Leu Arg Arg Leu Leu Leu Leu Leu Gln

1 5 10 15

Leu Ser Gln Leu Leu Ala Val Thr Gln Gly Lys Lys Val Val Leu Gly

20 25 30

Lys Lys Gly Asp Thr Val Glu Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gln Lys Lys

35 40 45

Ser Ile Gln Phe His Trp Lys Asn Ser Asn Gln Ile Lys Ile Leu Gly

50 55 60

Asn Gln Gly Ser Phe Leu Thr Lys Gly Pro Ser Lys Leu Asn Asp Arg

65 70 75 80

Ala Asp Ser Arg Arg Ser Leu Trp Asp Gln Gly Asn Phe Pro Leu Ile

85 90 95

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

100 105 110

Glu Asp Gln Lys Glu Glu Val Gln Leu Leu Val Phe Gly Leu Thr Ala

115 120 125

Asn Ser Asp Thr His Leu Leu Gln Gly Gln Ser Leu Thr Leu Thr Leu

130 135 140

Glu Ser Pro Pro Gly Ser Ser Pro Ser Val Gln Cys Arg Ser Pro Arg

145 150 155 160

Gly Lys Asn Ile Gln Gly Gly Lys Thr Leu Ser Val Ser Gln Leu Glu

165 170 175

Leu Gln Asp Ser Gly Thr Trp Thr Cys Thr Val Leu Gln Asn Gln Lys

180 185 190

Lys Val Glu Phe Lys Ile Asp Ile Val Val Leu Ala Phe Gln Lys Ala

195 200 205

Ser Ser Ile Val Tyr Lys Lys Glu Gly Glu Gln Val Glu Phe Ser Phe

210 215 220

Pro Leu Ala Phe Thr Val Glu Lys Leu Thr Gly Ser Gly Glu Leu Trp

225 230 235 240

Trp Gln Ala Glu Arg Ala Ser Ser Ser Lys Ser Trp Ile Thr Phe Asp

245 250 255

Leu Lys Asn Lys Glu Val Ser Val Lys Arg Val Thr Gln Asp Pro Lys

260 265 270

Leu Gln Met Gly Lys Lys Leu Pro Leu His Leu Thr Leu Pro Gln Ala

275 280 285

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

290 295 300

Lys Thr Gly Lys Leu His Gln Glu Val Asn Leu Val Val Met Arg Val

305 310 315 320

Ala Gln Leu Asn Asn Thr Leu Thr Cys Glu Val Met Gly Pro Thr Ser

325 330 335

Pro Lys Met Arg Leu Thr Leu Lys Gln Glu Asn Gln Glu Ala Arg Val

340 345 350

Ser Glu Glu Gln Lys Val Val Gln Val Val Ala Pro Glu Thr Gly Leu

355 360 365

Trp Gln Cys Leu Leu Ser Glu Gly Asp Lys Val Lys Met Asp Ser Arg

370 375 380

Ile Gln Val Leu Ser Arg Gly Val Asn Gln Thr Val Phe Leu Ala Cys

385 390 395 400

Val Leu Gly Gly Ser Phe Gly Phe Leu Gly Phe Leu Gly Leu Cys Ile

405 410 415

Leu Cys Cys Val Arg Cys Arg His Gln Gln Arg Gln Ala Ala Arg Met

420 425 430
 Ser Gln Ile Lys Arg Leu Leu Ser Glu Lys Lys Thr Cys Gln Cys Pro

435 440 445
 His Arg Met Gln Lys Ser His Asn Leu Ile

450 455

<210> 5

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Synthetic

<400> 5

gaagtgggtg tgccattcag a 21

<210> 6

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Synthetic

<400> 6

aaagctcaga agcagacaga gtca 24

<210> 7

<211> 25

<212>

> DNA

<213> Artificial

<220><223> Synthetic

<400> 7

ttccaaaagc ctacagcagg cccag 25

<210> 8

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Synthetic

<400> 8

tcatctcccc ttccctgaacc t 21

<210> 9	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Synthetic	
<400> 9	
cccagccaca agaagaagaa a	21
<210> 10	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Synthetic	
<400> 10	
cttcccccgc atccatttt ctgttc	26
<210> 11	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Synthetic	
<400> 11	
ggtctcgAAC tcatgagctc aa	22
<210> 12	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Synthetic	
<400> 12	
ggcatagtga cacacacctg taatt	25
<210> 13	
<211> 27	
<212> DNA	
<213>	
> Artificial	
<220><223> Synthetic	

<400> 13	
tgatccactc accttggcct ctcagag	27
<210> 14	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Synthetic	
<400> 14	
gtcaggaggc ttacttctt tgttg	25
<210> 15	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Synthetic	
<400> 15	
tgttagtgtc cctgagtaag tggatt	26
<210> 16	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Synthetic	
<400> 16	
ctcagctcca caccctacc aagttgg	27
<210> 17	
<211> 142	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Synthetic	
<400> 17	
tgttgctg tgacatgaac tcattgtgac acaaaccact gtgctaggg ggatccacta	60
gtaacggccg ccagtgtgct ggaattcgcc ctcgcaaggg ccaggcatat aagtacacaa	120
taaacaatg gcagctctcc	142
<210> 18	
<211> 99	

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Synthetic

<400> 18

ccctcccttc ctccccagg cacttccaa gtgtcaactc tagagctat cgccggccca 60

ccggtataac ttcgtataat gtatgctata cgaagttat 99

<210> 19

<211> 90

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Synthetic

<400> 19

ataacttcgt ataatgtatg ctatacgaag ttatgtcgac gtagccattt tctctagatc 60

caaaatgatg acaacaaaag gtaccttgc 90

<210> 20

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Synthetic

<400> 20

gcagctctgc cctcatttcag 20

<210> 21

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Synthetic

<400> 21

catcttgcc gtaggttgg t 21

<210> 22

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Synthetic

<400> 22	
cccttcgtc cctgctggtt ca	22
<210> 23	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Synthetic	
<400> 23	
caagaagact accctgaaga tgaaga	26
<210	
> 24	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Synthetic	
<400> 24	
tgtgagtgca acaatggaaa act	23
<210> 25	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Synthetic	
<400> 25	
cgttcccca cccagagacc ca	22
<210> 26	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Synthetic	
<400> 26	
ggcacccgagc agtgacagt	19
<210> 27	
<211> 22	
<212> DNA	

<213> Artificial	
<220><223> Synthetic	
<400> 27	
ttcacccgtgg atagtcctt tt	22
<210> 28	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Synthetic	
<400> 28	
agttcctggc cctctggat tccg	24
<210> 29	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Synthetic	
<400> 29	
ttgcttctt tctgttagttg atttcc	26
<210> 30	
<211>	
> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Synthetic	
<400> 30	
ccggcacact ctcttcttga g	21
<210> 31	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Synthetic	
<400> 31	
tcccaccact gcccagccca	20
<210> 32	
<211> 17	

<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> synthetic	
<400> 32	
tgcgcccgat cttagcc	17
<210> 33	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Synthetic	
<400> 33	
ttgaccgatt ccttgcgg	18
<210> 34	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Synthetic	
<400> 34	
acgagcgggt tcggcccatt c	21
<210> 35	
<211> 100	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Synthetic	
<400> 35	
tgaacctgct gctgctgggt gagtcgatta tcctggggag tggagaagct aggccgagcc	60
agttccgggt gtcgcgcgtg gatcgaccc ggaacctggg	100
<210> 36	
<211> 90	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Synthetic	
<400> 36	

atgccaggga cagccctgat actgttaggt aagtcaaggg ctgtccaagt accggataa	60
cttcgtataa ggtatcctat acgaagttat	90
<210> 37	
<211> 89	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Synthetic	
<400> 37	
ataacttcgt ataaggatc ctatacgaag ttatctcgac ctgatcttgg agggagacct	60
ggaccgggag acgtgctggg ggcagggtt	89
<210> 38	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Synthetic	
<400> 38	
gatgctttg gctttccag aa	22
<210> 39	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Synthetic	
<400> 39	
atgaagccat atagacaacg aaggt	25
<210> 40	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Synthetic	
<400> 40	
ccagactccaa actccccag cc	22
<210> 41	
<211> 20	
<212>	

> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Synthetic	
<400> 41	
tcagccccag agaccagaag	20
<210> 42	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Synthetic	
<400> 42	
tcaatcgctt gagagcacct aa	22
<210> 43	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Synthetic	
<400> 43	
ttgtcgcccc cgtggctca	19
<210> 44	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Synthetic	
<400> 44	
gcggttctcg ggcaaga	17
<210> 45	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Synthetic	
<400> 45	
tcagggccga gcagaaatag	20
<210> 46	

<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Synthetic	
<400> 46	
acacacctcgta cctcaccctg agcgaa	25
<210> 47	
<211> 22	
<212> DNA	
<213>	
> Artificial	
<220><223> Synthetic	
<400> 47	
ggttcacccaa aacctgtttt cc	22
<210> 48	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Synthetic	
<400> 48	
cgcgtccagg tgcgctaa	18
<210> 49	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Synthetic	
<400> 49	
acctggggcc ttgtttcaag cc	22
<210> 50	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Synthetic	
<400> 50	

ggtggagagg ctatccgc	19
<210> 51	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Synthetic	
<400> 51	
gaacacggcg gcattcag	17
<210> 52	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Synthetic	
<400> 52	
tgggcacaac agacaatcg ctg	23
<210> 53	
<211> 210	
<212> PRT	
<213> Artificial	
<220>	
><223> synthetic	
<400> 53	
Met Gln Pro Trp Leu Trp Leu Val Phe Ser Met Lys Leu Ala Val Leu	
1 5 10 15	
His Gly Asn Ser Val Leu Gln Gln Thr Pro Ala Tyr Ile Lys Val Gln	
20 25 30	
Thr Asn Lys Met Val Met Leu Ser Cys Glu Ala Lys Ile Ser Leu Ser	
35 40 45	
Asn Met Arg Ile Tyr Trp Leu Arg Gln Arg Gln Ala Pro Ser Ser Asp	
50 55 60	
Ser His His Glu Phe Leu Ala Leu Trp Asp Ser Ala Lys Gly Thr Ile	
65 70 75 80	
His Gly Glu Glu Val Glu Gln Glu Lys Ile Ala Val Phe Arg Asp Ala	
85 90 95	

Ser Arg Phe Ile Leu Asn Leu Thr Ser Val Lys Pro Glu Asp Ser Gly

100 105 110

Ile Tyr Phe Cys Met Ile Val Gly Ser Pro Glu Leu Thr Phe Gly Lys

115 120 125

Gly Thr Gln Leu Ser Val Val Asp Phe Leu Pro Thr Thr Ala Gln Pro

130 135 140

Thr Lys Lys Ser Thr Leu Lys Lys Arg Val Cys Arg Leu Pro Arg Pro

145 150 155 160

Glu Thr Gln Lys Gly Leu Thr Cys Ser Leu Thr Thr Leu Ser Leu Leu

165 170 175

Val Val Cys Ile Leu Leu Leu Ala Phe Leu Gly Val Ala Val Tyr

180 185 190

Phe Tyr Cys Val Arg Arg Ala Arg Ile His Phe Met Lys Gln Phe

195 200 205

His Lys

210

<210> 54

<211> 243

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic

<400> 54

Met Ala Ser Pro Leu Thr Arg Phe Leu Ser Leu Asn Leu Leu Leu

1 5 10 15

Gly Glu Ser Ile Ile Leu Gly Ser Gly Glu Ala Arg Pro Ser Gln Phe

20 25 30

Arg Val Ser Pro Leu Asp Arg Thr Trp Asn Leu Gly Glu Thr Val Glu

35 40 45

Leu Lys Cys Gln Val Leu Leu Ser Asn Pro Thr Ser Gly Cys Ser Trp

50 55 60

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

65 70 75 80

Leu Ser Gln Asn Lys Pro Lys Ala Ala Glu Gly Leu Asp Thr Gln Arg

85 90 95

Phe Ser Gly Lys Arg Leu Gly Asp Thr Phe Val Leu Thr Leu Ser Asp

100 105 110

Phe Arg Arg Glu Asn Glu Gly Tyr Tyr Phe Cys Ser Ala Leu Ser Asn

115 120 125

Ser Ile Met Tyr Phe Ser His Phe Val Pro Val Phe Leu Pro Ala Lys

130 135 140

Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile

145 150 155 160

Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala

165 170 175

Gly Gly Ala Val Lys Gly Thr Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr

180 185 190

Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Ile Cys Val Ala Leu Leu Ser Leu

195 200 205

Ile Ile Thr Leu Ile Cys Tyr His Arg Ser Arg Lys Arg Val Cys Lys

210 215 220

Cys Pro Arg Pro Leu Val Arg Gln Glu Gly Lys Pro Arg Pro Ser Glu

225 230 235 240

Lys Ile Val

<210> 55

<211> 151

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Synthetic

<400> 55

tatggagtga aagcctttgg tgtctgagat ctggcttag ttaaactctg ggatcggcgc 60

gccgaattcc tgcagcccg gctcgagata acttcgtata atgtatgcta tacgaagtta 120

tatgcattcg gtaggggag gcgctttcc c 151

<210> 56

<211> 151

<212>

> DNA

<213> Artificial

<220><223> Synthetic

<400> 56

agtattgtt	tgccaagttc	taattccatc	agacctcgac	ctgcagccct	agataacttc	60
gtataatgt	tgctatacga	agttatccta	ggccagaggg	cttgggttga	cagaaactca	120
gtggcattct	tatccagagt	ttctctacac	c			151

<210> 57

<211> 293

<212> PRT

<213> Human

<400> 57

Lys Lys Val Val Leu Gly Lys Lys Gly Asp Thr Val Glu Leu Thr Cys

1 5 10 15

Thr Ala Ser Gln Lys Ser Ile Gln Phe His Trp Lys Asn Ser Asn

20 25 30

Gln Ile Lys Ile Leu Gly Asn Gln Gly Ser Phe Leu Thr Lys Gly Pro

35 40 45

Ser Lys Leu Asn Asp Arg Ala Asp Ser Arg Ser Leu Trp Asp Gln

50 55 60

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

65 70 75 80

Thr Tyr Ile Cys Glu Val Glu Asp Gln Lys Glu Glu Val Gln Leu Leu

85 90 95

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

100 105 110

Ser Leu Thr Leu Thr Leu Glu Ser Pro Pro Gly Ser Ser Pro Ser Val

115 120 125

Gln Cys Arg Ser Pro Arg Gly Lys Asn Ile Gln Gly Gly Thr Leu

130 135 140

Ser Val Ser Gln Leu Glu Leu Gln Asp Ser Gly Thr Trp Thr Cys Thr

145 150 155 160

Val Leu Gln Asn Gln Lys Lys Val Glu Phe Lys Ile Asp Ile Val Val

165 170 175

Leu Ala Phe Gln Lys Ala Ser Ser Ile Val Tyr Lys Lys Glu Gly Glu

180 185 190

Gln Val Glu Phe Ser Phe Pro Leu Ala Phe Thr Val Glu Lys Leu Thr

195 200 205

Gly Ser Gly Glu Leu Trp Trp Gln Ala Glu Arg Ala Ser Ser Ser Lys

210 215 220

Ser Trp Ile Thr Phe Asp Leu Lys Asn Lys Glu Val Ser Val Lys Arg

225 230 235 240

Val Thr Gln Asp Pro Lys Leu Gln Met Gly Lys Lys Leu Pro Leu His

245 250 255

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

260 265 270

Thr Leu Ala Leu Glu Ala Lys Thr Gly Lys Leu His Gln Glu Val Asn

275 280 285

Leu Val Val Met Arg

290

<210> 58

<211> 151

<212> PRT

<213> Human

<400> 58

Val Leu His Gly Asn Ser Val Leu Gln Gln Thr Pro Ala Tyr Ile Lys

1 5 10 15

Val Gln Thr Asn Lys Met Val Met Leu Ser Cys Glu Ala Lys Ile Ser

20 25 30

Leu Ser Asn Met Arg Ile Tyr Trp Leu Arg Gln Arg Gln Ala Pro Ser

35 40 45

Ser Asp Ser His His Glu Phe Leu Ala Leu Trp Asp Ser Ala Lys Gly

50 55 60

Thr Ile His Gly Glu Glu Val Glu Gln Glu Lys Ile Ala Val Phe Arg

65 70 75 80

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

85 90 95

Ser Gly Ile Tyr Phe Cys Met Ile Val Gly Ser Pro Glu Leu Thr Phe

100 105 110

Gly Lys Gly Thr Gln Leu Ser Val Val Asp Phe Leu Pro Thr Thr Ala

115 120 125

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

130 135 140

Arg Pro Glu Thr Gln Lys Gly

145 150

<210> 59

<211> 152

<212> PRT

<213> Human

<400> 59

Arg Pro Ser Gln Phe Arg Val Ser Pro Leu Asp Arg Thr Trp Asn Leu

1 5 10 15

Gly Glu Thr Val Glu Leu Lys Cys Gln Val Leu Leu Ser Asn Pro Thr

20 25 30

Ser Gly Cys Ser Trp Leu Phe Gln Pro Arg Gly Ala Ala Ala Ser Pro

35 40 45

Thr Phe Leu Leu Tyr Leu Ser Gln Asn Lys Pro Lys Ala Ala Glu Gly

50 55 60

Leu Asp Thr Gln Arg Phe Ser Gly Lys Arg Leu Gly Asp Thr Phe Val

65 70 75 80

Leu Thr Leu Ser Asp Phe Arg Arg Glu Asn Glu Gly Tyr Tyr Phe Cys

85 90 95

Ser Ala Leu Ser Asn Ser Ile Met Tyr Phe Ser His Phe Val Pro Val

100	105	110
Phe Leu Pro Ala Lys Pro Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr		
115	120	125
Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala		
130	135	140
Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala		
145	150	

【심사관 직권보정사항】

【직권보정 1】

【보정항목】 청구범위

【보정세부항목】 청구항 5

【변경전】

5'에서 3'으로 하기를 포함하는 키메라 사람/마우스 핵산 분자:

- (i) 마우스 CD4 유전자의 엑손 2를 포함하는 뉴클레오타이드 서열,
- (ii) 마우스 CD4 신호 펩타이드를 암호화하는 마우스 CD4 유전자의 엑손 3의 일부를 포함하는 뉴클레타이드 서열,
- (iii) 사람 CD4 신호 펩타이드의 다운스트림에 있는 사람 CD4 폴리펩타이드를 암호화하는 사람 CD4 유전자의 엑손 3의 일부를 포함하는 뉴클레오타이드 서열,
- (iv) 사람 CD4 유전자의 엑손 4, 엑손 5 및 엑손 6을 포함하는 뉴클레오타이드 서열, 및
- (v) 마우스 CD4 유전자의 인트론 6를 포함하는 뉴클레오타이드 서열.

【변경후】

5'에서 3'으로 하기를 포함하는 키메라 사람/마우스 핵산 분자:

- (i) 마우스 CD4 유전자의 엑손 2를 포함하는 뉴클레오타이드 서열,
- (ii) 마우스 CD4 신호 펩타이드를 암호화하는 마우스 CD4 유전자의 엑손 3의 일부를 포함하는 뉴클레오타이드 서열,
- (iii) 사람 CD4 신호 펩타이드의 다운스트림에 있는 사람 CD4 폴리펩타이드를 암호화하는 사람 CD4 유전자의 엑손 3의 일부를 포함하는 뉴클레오타이드 서열,
- (iv) 사람 CD4 유전자의 엑손 4, 엑손 5 및 엑손 6을 포함하는 뉴클레오타이드 서열, 및
- (v) 마우스 CD4 유전자의 인트론 6를 포함하는 뉴클레오타이드 서열.