



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108707608 A

(43)申请公布日 2018. 10. 26

(21)申请号 201810239690.4

(22)申请日 2012.10.26

(30)优先权数据

61/552,584 2011.10.28 US

(62)分案原申请数据

201280065075.7 2012.10.26

(71)申请人 瑞泽恩制药公司

地址 美国纽约州

(72)发明人 L·麦克唐纳 A·J·莫菲 N·图

C·古雷尔 V·沃罗宁那

S·史蒂文斯

(74)专利代理机构 北京市君合律师事务所

11517

代理人 张怡 孙倩

(51)Int.Cl.

C12N 15/12(2006.01)

C07K 14/74(2006.01)

C12N 5/10(2006.01)

C07K 19/00(2006.01)

权利要求书1页 说明书24页

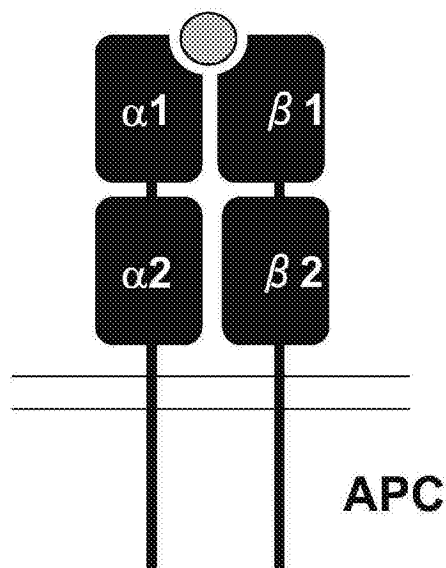
序列表6页 附图12页

(54)发明名称

表达嵌合主要组织相容性复合物(MHC)II类分子的基因修饰小鼠

(57)摘要

本发明提供了一种表达人源化的MHC II蛋白(人源化的MHC II α 和 β 多肽)的基因修饰非人动物,以及包含该人源化MHC II蛋白的胚胎、细胞和组织。本发明还提供了制备所述基因修饰动物的构建体以及制备该构建体的方法。本发明提供了使用所述基因修饰动物对人免疫系统的不同方面进行研究的方法。



1. 一种非人动物基因组, 所述非人动物基因组包含:

(a) 在内源性主要组织相容性复合物II (MHC II) α 基因座的编码人源/非人源嵌合MHC II α 多肽的核苷酸序列, 其中所述人源/非人源嵌合MHC II α 多肽包含人MHC II α 1和 α 2结构域, 所述人MHC II α 1和 α 2结构域可操作地连接至内源性非人MHC II α 多肽的跨膜和胞质结构域, 并且/或者

(b) 在内源性主要组织相容性复合物IIB基因座的编码人源/非人源嵌合MHC IIB β 多肽的核苷酸序列, 其中所述人源/非人源嵌合MHC IIB β 多肽包含人MHC IIB β 1和 β 2结构域, 所述人MHC IIB β 1和 β 2结构域可操作地连接至内源性非人MHC IIB β 多肽的跨膜和胞质结构域。

2. 一种分离的非人动物细胞, 所述非人动物细胞在内源性主要组织相容性复合物II (MHC II) α 基因座包含编码人源/非人源嵌合MHC II α 多肽的核苷酸序列, 并且/或者, 在内源性主要组织相容性复合物IIB基因座包含编码人源/非人源嵌合MHC IIB β 多肽的核苷酸序列,

其中所述人源/非人源嵌合MHC II α 多肽的人源部分包含人MHC II α 2结构域, 并且/或者, 所述人源/非人源嵌合MHC IIB β 多肽的人源部分包含人MHC IIB β 2结构域。

3. 一种体外组合物, 包括: 根据权利要求2所述的第一细胞。

4. 一种核酸, 所述核酸包含编码人源/非人源嵌合MHC II α 多肽的序列, 其中所述人源/非人源嵌合MHC II α 多肽的人源部分包含人MHC II α 多肽的 α 1和 α 2结构域。

5. 一种核酸, 所述核酸包含编码人源/非人源嵌合MHC IIB β 多肽的序列, 其中所述人源/非人源嵌合MHC IIB β 多肽的人源部分包含人MHC IIB β 多肽的 β 1和 β 2结构域。

6. 一种人源/非人源嵌合MHC II α 多肽, 其中所述人源/非人源嵌合MHC II α 多肽的人源部分包含人MHC II α 多肽的 α 1和 α 2结构域, 并且人源/非人源嵌合MHC II α 多肽的非人源部分包含非人动物MHC II α 多肽的跨膜和胞质结构域。

7. 一种人源/非人源嵌合MHC IIB β 多肽, 其中所述人源/非人源嵌合MHC IIB β 多肽的人源部分包含人MHC IIB β 多肽的 β 1和 β 2结构域, 并且人源/非人源嵌合MHC IIB β 多肽的非人源部分包含非人动物MHC IIB β 多肽的跨膜和胞质结构域。

8. 一种人源/非人源嵌合MHC II蛋白复合物, 包含:

(i) 人源/非人源嵌合MHC II α 多肽, 其中所述人源/非人源嵌合MHC II α 多肽的人源部分包含人MHC II α 多肽的 α 1和 α 2结构域, 并且人源/非人源嵌合MHC II α 多肽的非人源部分包含非人动物MHC II α 多肽的跨膜和胞质结构域; 和

(ii) 人源/非人源嵌合MHC IIB β 多肽, 其中所述人源/非人源嵌合MHC IIB β 多肽的人源部分包含人MHC IIB β 多肽的 β 1和 β 2结构域, 并且人源/非人源嵌合MHC IIB β 多肽的非人源部分包含非人动物MHC IIB β 多肽的跨膜和胞质结构域。

表达嵌合主要组织相容性复合物 (MHC) II 类分子的基因修饰小鼠

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请是申请号为201280065075.7、申请日为2012年10月26日、发明名称为“表达嵌合主要组织相容性复合物 (MHC) II 类分子的基因修饰小鼠”的中国发明专利申请的分案申请。原申请为国际申请号为PCT/US2012/062029的国家阶段申请,该国际申请要求申请日为2011年10月28日的美国临时专利申请号61/552,584的优先权,其全部内容通过引用并入本申请。

发明领域

[0003] 本发明涉及基因改造的表达人源化的主要组织相容性复合物 (MHC) II 类蛋白的非人动物例如啮齿动物 (例如小鼠或大鼠) 及胚胎、组织和细胞。本发明进一步涉及制备表达人源化MHC II 蛋白的基因修饰的非人动物的方法。本发明还提供了一种使用表达人源化MHC II 类蛋白的非人动物、细胞和组织鉴定激活淋巴细胞和结合T细胞的肽,以及用于研发人用疫苗和其他治疗方法。

[0004] 发明背景

[0005] 在适应性免疫应答中,通过B淋巴细胞 (例如免疫球蛋白) 和T淋巴细胞 (例如T细胞受体或TCR) 上的受体分子识别外来抗原。这些外来抗原被专门的蛋白以肽片段呈现在细胞表面上,这些专门的蛋白通常称为主要组织相容性复合物 (MHC) 分子。MHC分子由多个基因座编码,已发现其为跨距约4Mb的相连的基因簇。在小鼠中,MHC基因位于17号染色体上,并且由于历史原因将其称为组织相容性2 (H-2) 基因。在人中,该基因位于6号染色体上,将其称为人白细胞抗原 (HLA) 基因。在小鼠和人中的基因座是多基因的;其包括三个高多态性类型的MHC基因 (I、II和III类),其在人和小鼠基因组中具有相似的构造 (分别参见图2和图3)。

[0006] MHC基因座在基因组中显示出最高的多态性;一些基因由>300个等位基因表示 (例如人HLA-DRB和人HLA-B)。所有I类和II类MHC基因均能提呈肽片段,但是各基因表达具有不同结合特性的蛋白,这反应了多态性和等位基因变体。任何给定个体均具有在免疫应答过程中能够提呈至B和T细胞表面的独特的肽片段范围。

[0007] 人与小鼠均具有II类MHC基因 (参见图2和图3)。在人中,经典的MHC II基因被称为HLA-DP、HLA-DQ和HLA-DR,而在小鼠中将其称为H-2A和H-2E (通常分别缩写为I-A和I-E)。由MHC II基因座中的基因编码的其他蛋白,在人中为HLA-DM和HLA-DO,以及在小鼠中为H-2M和H-2O,不存在于细胞表面,而是位于内吞小泡,并确保MHC II分子与肽的正确装载。II类分子由两条多肽链组成: α 链和 β 链。 α 链的胞外部分含有两个胞外结构域 $\alpha 1$ 和 $\alpha 2$;并且 β 链的胞外部分也含有两个胞外结构域 $\beta 1$ 和 $\beta 2$ (参见图1)。 α 链和 β 链彼此之间非共价结合。

[0008] MHC II类分子在抗原提呈细胞 (APC) 上表达,例如B细胞、巨噬细胞、树突状细胞、处于炎症过程中的内皮细胞等。在APC表面上表达的MHC II分子通常提呈在细胞内的小泡中产生的针对CD4+T细胞的抗原。为了参与与CD4+T细胞的结合,MHC II类与所关注抗原的

复合物必须非常稳定的存在足够长时间以便与CD4+T细胞结合。当CD4+T辅助细胞与APC表面上的外源性肽/MHC II的复合物结合时，T细胞被活化以释放辅助针对侵入物的免疫应答的细胞因子。

[0009] 由于存在耐受机制，因而不是所有的抗原均激发T细胞活化。然而，在一些疾病（例如癌症、自身免疫性疾病）中来源于自身蛋白的肽成为免疫系统的靶细胞成分，结果导致提呈这种肽的细胞受到破坏。在识别具有临床意义的抗原方面已经取得了重要进步（例如与不同类型的癌症相关的抗原）。然而，为了改进对在人T细胞中激发适宜应答的肽的鉴定和选择，特别是具有临床意义抗原的肽，仍需要模拟人免疫系统各方面的体内和体外系统。因此，需要一种能够展示人免疫系统组分的生物系统（例如基因修饰的非人动物和细胞）。

[0010] 发明概述

[0011] 本申请提供了一种用于产生或鉴定肽的生物系统，所述的肽与人MHC II类蛋白及其嵌合体相关，并且与CD4+T细胞结合。本申请提供了一种非人动物，其包含表达在细胞免疫应答中具有功能的人源化分子的非人细胞。本申请还提供了一种编码人源化MHC II蛋白的人源化啮齿动物基因座。本申请还提供了一种表达人源化MHC分子的人源化啮齿动物细胞。本申请提供了包含人源化的啮齿动物细胞的体内和体外系统，其中所述啮齿动物细胞表达一个或多个个人源化的免疫系统分子。

[0012] 本申请提供了一种非人动物例如啮齿动物（例如小鼠或大鼠），在其基因组中包含编码人源化MHC II复合物的核苷酸序列，其中所述人源化MHC II复合物的人源部分包含人MHC II复合物的胞外结构域，例如人源化MHC II α 胞外结构域和人源化MHC II β 胞外结构域。

[0013] 在一个方面，本申请提供了一种非人动物，在其内源性MHC II α 基因座包含编码人源/非人源嵌合MHC II α 多肽的核苷酸序列。在一个实施方式中，这种人源/非人源嵌合MHC II α 多肽的人源部分包含人MHC II α 胞外结构域。在一个实施方式中，所述非人动物在动物细胞表面表达功能性MHC II复合物。在一个实施方式中，在动物中的人MHC II α 胞外结构域包含人MHC II α 1和 α 2结构域；在一个实施方式中，所述人源/非人源嵌合MHC II α 多肽的非人源部分包含内源性非人源MHC II α 多肽的跨膜和胞质结构域。在一个实施方式中，编码人源/非人源嵌合MHC II α 多肽的核苷酸序列在内源性非人源MHC II α 启动子和调控元件的调控下表达。在一个实施方式中，所述嵌合多肽的人源部分来源于选自下组的人源HLA II类蛋白：HLA-DR、HLA-DQ和HLA-DP，例如人源部分来源于HLA-DR4蛋白。所述非人动物可以是啮齿动物，例如小鼠。在一个方面，所述非人动物在其内源性MHC II α 基因座包含编码人源/非人源嵌合MHC II α 多肽的核苷酸序列，其在内源性MHC II β 基因座进一步包含编码人源/非人源嵌合MHC II β 多肽的核苷酸序列。本申请还提供了一种制备基因修饰的非人动物的方法，所述动物在内源性MHC II α 基因座包含编码人源/非人源嵌合MHC II α 多肽的核苷酸序列。这种方法可以包括在内源性MHC II α 基因座使用编码人源/非人源嵌合MHC II α 多肽的核苷酸序列取代编码内源性非人源MHC II α 多肽的核苷酸序列。

[0014] 本申请还提供了一种非人动物，所述动物在其内源性MHC II β 基因座包含编码人源/非人源嵌合MHC II β 多肽的核苷酸序列。在一个实施方式中，这种人源/非人源嵌合MHC II β 多肽的人源部分包含人源MHC II β 胞外结构域。在一个实施方式中，所述非人动物在动物细胞表面表达功能性MHC II复合物。在一个实施方式中，在所述动物中的人MHC II β 胞外

结构域包含人MHC II β 1和 β 2结构域;在一个实施方式中,所述人源/非人源嵌合MHC II β 多肽的非人部分包含内源性非人MHC II β 多肽的跨膜和胞质结构域。在一个实施方式中,编码人源/非人源嵌合MHC II β 多肽的核苷酸序列在内源性非人源MHC II β 启动子和调控元件的调控下表达。在一个实施方式中,所述嵌合多肽的人源部分来源于选自下组的人源HLA II类蛋白:HLA-DR、HLA-DQ和HLA-DP,例如所述人源部分来源于HLA-DR4蛋白。所述非人动物可以是啮齿动物,例如小鼠。在一个方面,所述非人动物在内源性MHC II β 基因座包含编码人源/非人源嵌合MHC II β 多肽的核苷酸序列,其进一步在内源性MHC II α 基因座包含编码人源/非人源嵌合MHC II α 多肽的核苷酸序列。本申请还提供了一种制备基因修饰的非人动物的方法,所述动物在内源性MHC II β 基因座包含编码人源/非人源嵌合MHC II β 多肽的核苷酸序列。这种方法可以包括在内源性MHC II β 基因座使用编码人源/非人源嵌合MHC II β 多肽的核苷酸序列取代编码内源性非人源MHC II β 多肽的核苷酸序列。

[0015] 在一个方面,本申请提供了一种非人动物,所述动物在内源性MHC II基因座包含编码人源/非人源嵌合MHC II α 多肽的第一核苷酸序列和编码人源/或人源嵌合MHC II β 多肽的核苷酸序列,其中所述人源/非人源嵌合MHC II α 多肽的人源部分包含人源MHC II α 胞外结构域和所述人源/非人源嵌合MHC II β 多肽的人源部分包含人源MHC II β 胞外结构域。在一个实施方式中,所述人源/非人源嵌合MHC II α 和 β 多肽在细胞表面形成功能性嵌合MHC II复合物(例如人源/非人源MHC II复合物)。在一个实施方式中,所述人源MHC II α 胞外结构域包含人源MHC II的人源 α 1和 α 2结构域。在一个实施方式中,所述人源MHC II β 胞外结构域包含人源MHC II的人源 β 1和 β 2结构域。在不同方面,所述第一核苷酸序列在内源性非人源MHC II α 启动子和调控元件的调控下表达。在不同方面,所述第二核苷酸序列在内源性非人源MHC II β 启动子和调控元件的调控下表达。在一些实施方式中,所述人源/非人源嵌合MHC II α 多肽的非人源部分包含内源性非人源MHC II α 多肽的跨膜和胞质结构域。在一些实施方式中,所述人源/非人源嵌合MHC II β 多肽的非人源部分包含内源性非人源MHC II β 多肽的跨膜和胞质结构域。

[0016] 在不同实施方式中,所述非人动物是啮齿动物,并且所述人源/啮齿动物嵌合MHC II α 和 β 多肽的人源部分包含来源于HLA II类蛋白选自下组的人源序列:HLA-DR、HLA-DQ和HLA-DP。在本发明的一些实施方式中,所述人源/小鼠嵌合MHC II α 和 β 序列的人源部分来源于人HLA-DR4序列;因此,编码MHC II α 胞外结构域的核苷酸序列来源于HLA-DR α *01基因的序列,并且编码MHC II β 胞外结构域的核苷酸序列来源于编码HLA-DR β 1*04基因的序列。

[0017] 在本发明的不同实施方式中,所述第一和第二核苷酸序列位于同一染色体。在一些方面,所述动物包含两个拷贝的MHC II基因座,其含有所述第一和第二核苷酸序列,而在其他方面,所述动物包含一个拷贝的MHC II基因座,其含有所述第一和第二核苷酸序列。因此,所述动物针对含有所述第一和第二核苷酸序列的MHC II基因座可以是纯合的或杂合的。

[0018] 在一些方面,所述嵌合MHC II α 多肽和/或嵌合MHC II β 多肽可操作地与非人先导序列连接。

[0019] 在一个方面,所述基因工程的非人动物是啮齿动物。在一个实施方式中,所述啮齿动物选自由小鼠和大鼠组成的组。因此,在一些实施方式中,所述嵌合MHC II α 和 β 基因的非人源序列来源于编码小鼠MHC II蛋白的核苷酸序列,例如小鼠H-2E蛋白。在一个实施方式

中,本发明的啮齿动物(例如小鼠或大鼠)不表达来自于其内源性基因座的功能性内源性MHC II多肽。在一个实施方式中,其中所述啮齿动物是小鼠,所述小鼠不表达来源于其内源性基因座的功能性内源性H-2E和H-2A多肽。

[0020] 因此,在一些实施方式中,本申请提供了一种小鼠,其在内源性小鼠MHC II基因座包含编码人源/小鼠嵌合MHC II α 多肽的第一核苷酸序列和编码人源/小鼠嵌合MHC II β 多肽的第二核苷酸序列,其中所述嵌合MHC II α 多肽的人源部分包含来源于人HLA-DR4蛋白的 α 多肽的胞外结构域和所述人源/小鼠嵌合MHC II β 多肽的人源部分包含来源于人HLA-DR4蛋白的 β 多肽的胞外结构域,其中所述嵌合MHC II α 多肽的小鼠部分包含小鼠H-2E α 链的跨膜和胞质结构域和所述嵌合MHC II β 多肽的小鼠部分包含小鼠H-2E β 链的跨膜和胞质结构域,并且其中所述小鼠表达功能性嵌合HLA-DR4/H-2E MHC II复合物。在一些方面,所述嵌合MHC II α 多肽的胞外结构域包含人 α 1和 α 2结构域;在一些方面,所述嵌合MHC II β 多肽的胞外结构域包含人 β 1和 β 2结构域。在一些实施方式中,所述第一核苷酸序列在内源性小鼠MHC II α 启动子和调控元件的调控下表达,以及所述第二核苷酸序列在内源性小鼠MHC II β 启动子和调控元件的调控下表达。在不同实施方式中,所述小鼠不表达来自于其内源性基因座的功能性内源性MHC II多肽,例如H-2E和H-2A多肽。在一些方面,所述小鼠包含两个拷贝的MHC II基因座,其含有所述第一和第二核苷酸序列,而在其他方面,所述小鼠包含一个拷贝的MHC II基因座,其含有所述第一和第二核苷酸序列。

[0021] 本申请还提供了一种制备如本申请所述的基因工程非人动物(例如啮齿动物,例如小鼠或大鼠)的方法。在不同实施方式中,通过使用编码人源/非人源(例如人/小鼠)嵌合MHC II α 和 β 多肽的核苷酸序列取代内源性MHC II序列制备发明的非人动物(例如啮齿动物,例如小鼠或大鼠)。在一个实施方式中,本发明提供了一种修饰啮齿动物(例如小鼠或大鼠)的MHC II基因座以表达人源/啮齿动物嵌合MHC II复合物的方法,所述方法包括在内源性小鼠MHC II基因座使用编码人源/啮齿动物嵌合MHC II复合物的核苷酸序列取代编码啮齿动物MHC II复合物的核苷酸序列。在所述方法的一个方面,编码人源/啮齿动物MHC II复合物的核苷酸序列包含编码人源MHC II α 链胞外结构域和啮齿动物MHC II α 链跨膜和胞质结构域的第一核苷酸序列以及编码人源MHC II β 链胞外结构域和啮齿动物MHC II β 链跨膜和胞质结构域的第二核苷酸序列。在一些方面,所述嵌合MHC II复合物的啮齿动物部分来源于小鼠H-2E蛋白,以及人源部分来源于人HLA-DR4蛋白。在一些实施方式中,在单个ES细胞中制备如本申请所述的内源性MHC II基因座取代,并将所述单个ES细胞引入啮齿动物(例如小鼠或大鼠)的胚胎以制备基因修饰的啮齿动物(例如小鼠或大鼠)。

[0022] 本申请还提供了一种细胞例如分离的抗原提呈细胞,所述细胞来源于本申请所述的非人动物(例如啮齿动物,例如小鼠或大鼠)。本申请还提供了来源于本申请所述的非人动物的组织和胚胎。

[0023] 本申请所述的任何实施方式和方面均可以彼此结合使用,除非另有说明或从上下文是显而易见的。通过随后的详细描述其他实施方式对本领域技术人员而言将是显而易见的。下文的详细描述包括对本发明不同实施方式的示例性描述,其对所主张的发明不具有限制性。附图构成了本说明书的一部分,其与说明书一起仅用于说明书实施方式,而不是限制本发明。

[0024] 附图的简要说明

[0025] 图1是在抗原提呈细胞(APC)表面表达的MHC II类分子的示意图,所述分子含有四个结构域: $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、 $\beta 1$ 和 $\beta 2$ 。灰色的圆圈表示在肽结合裂隙中结合的肽。

[0026] 图2是人HLA的相对基因组结构示意图(未按照比例),显示了I、II和III类基因。

[0027] 图3是小鼠MHC的相对基因组结构的示意图(未按照比例),显示了I、II和III类基因。

[0028] 图4(A-D)是制备包含人源化I-E β 和I-E α (即分别为H-2E β /HLA-DR $\beta 1$ *04和H-2E α /HLA-DR α *01嵌合体)的靶向载体的策略的示意图(未按照比例)。在图4C中,将来自图4B的最终人源化的MHC II序列连接至图4A的最终构建体的PI-SceI和I-CeuI限制性位点之间以产生包含人源化MHC II和BALB/c I-E α 的外显子1的构建体。Pg=假基因;HR=细菌同源重组;CM=氯霉素;pec=大观霉素;hyg=潮霉素;neo=新霉素;EP=电穿孔。三角形表示外显子,实心的三角形表示C57BL/6小鼠的小鼠外显子(除了填充散点的三角形以外,其表示BALB/c小鼠I-E α 的外显子1),空心的三角形表示人外显子。

[0029] 图5显示了使用潮霉素表达盒敲除小鼠基因座,随后引入包含人源化I-E β 和I-E α (即分别为H-2E β /HLA-DR $\beta 1$ *04和H-2E α /HLA-DR α *01嵌合体)的载体的MHC II类I-E和I-A基因的示意图,未按照比例。空心的三角形表示人外显子;实心的三角形表示小鼠外显子。圆圈内为用于基因分型的探针。

[0030] 图6显示了Cre介导除去图5中的新霉素表达盒的示意图,未按照比例。空心的三角形表示人外显子;实心的三角形表示小鼠外显子。上两条链表示在携带新霉素选择性表达盒的人源化MHC II杂合子小鼠中的MHC II基因座,下两条链表示在除去新霉素表达盒的人源化MHC II杂合子小鼠中的MHC II基因座。

[0031] 图7显示了小鼠和人II类基因座的比较性示意图,未按照比例。II类基因用方框表示,空心方框表示假基因。图中包括了不同核酸片段的相对尺寸(kb)。

[0032] 图8,左图是MHC II α 链人源化策略的示意图(未按照比例);特别地,图中显示了 $\alpha 1$ 和 $\alpha 2$ 结构域的编码序列被MHC II α 基因的外显子2和3取代,但保留了小鼠跨膜和胞质尾序列。在人源化基因座中,MHC II α 先导序列来源于小鼠BALB/c品系。右图显示了MHC II β 链的人源化;特别地,图中显示了 $\beta 1$ 和 $\beta 2$ 结构域的编码序列被MHC II β 基因的外显子2和3取代,但保留了小鼠先导序列以及小鼠跨膜和胞质尾序列。上面一行全部为人序列;中间一行全部为小鼠序列;下面一行全部为人源化序列,其外显子2和3来源于人源HLA-DR基因。

[0033] 图9显示了使用抗-HLA-DR抗体对B细胞进行的FACS分析,所述B细胞来自存在(1681HET+poly(I:C))或不存在(1681HET) poly(I:C)的条件下针对嵌合HLA-DR4(已除去新霉素表达盒)是杂合子的小鼠和野生型小鼠(WT小鼠)。

[0034] 发明详述

[0035] 定义

[0036] 本发明提供了表达人源或人源化MHC II多肽的基因修饰的非人动物(例如小鼠、大鼠、家兔等);以及包含其的胚胎、细胞和组织;制备其的方法;以及使用其的方法。除非另有定义,否则本申请使用的所有术语和短语包括所述术语和短语在本领域中所具有的含义,除非有相反的确切说明或根据使用所述术语或短语的上下文是显而易见的。

[0037] 当用于描述保守的氨基酸取代时,术语“保守的”包括氨基酸残基被另一个具有带有相似化学性质(例如电荷或疏水性)的侧链R基的氨基酸残基取代。可以通过修饰核苷酸

序列以引入将编码保守取代的核苷酸改变实现保守的氨基酸取代。在通常情况下,保守的氨基酸取代将基本上不会改变所关注蛋白的功能性性质,例如MHC I提呈所关注肽的能力。具有带有相似化学性质的侧链的氨基酸基团的例子包括脂肪族侧链如甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸;脂肪族-羟基侧链如丝氨酸和苏氨酸;含有酰胺的侧链如天冬酰胺和谷氨酰胺;芳香侧链如苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸;碱性侧链如赖氨酸、精氨酸和组氨酸;酸性侧链如天冬氨酸和谷氨酸;和含硫侧链如半胱氨酸和甲硫氨酸。保守的氨基酸取代基团包括例如缬氨酸/亮氨酸/异亮氨酸、苯丙氨酸/酪氨酸、赖氨酸/精氨酸、丙氨酸/缬氨酸、谷氨酸/天冬氨酸和天冬酰胺/谷氨酰胺。在一些实施方式中,保守的氨基酸取代可以是蛋白中的任意天然残基被丙氨酸取代,例如用于丙氨酸扫描诱变。在一些实施方式中,制备在PAM250log-似然性矩阵中具有正值的保守取代,如Gonnet等,(1992) Exhaustive Matching of the Entire Protein Sequence Database, Science 256:1443-45所公开的,其通过引用并入本申请。在一些实施方式中,所述取代是适度的保守取代,其中所述取代在PAM250log-似然性矩阵中具有非负值。

[0038] 因此,本发明还包括一种基因修饰的非人动物,所述动物的基因组包含编码人源或人源化MHC II多肽的核苷酸序列,其中所述多肽包含本申请所述的氨基酸序列的保守氨基酸取代。

[0039] 本领域技术人员将理解,除了本申请所述的编码人源或人源化MHC II多肽的核酸残基以外,由于遗传密码的简并性,其他核酸也可以编码本发明的多肽。因此,除了在其基因组中包含编码具有保守氨基酸取代的MHC II多肽的核苷酸序列的基因修饰非人动物以外,本申请还提供了由于遗传密码的简并性使得在其基因组包含不同于本申请所述的核酸序列的非人动物。

[0040] 术语“同一性”当与序列一起使用时包括由本领域公知的能够用于测定核苷酸和/或氨基酸序列同一性的多种不同算法确定的同一性。在本申请所述的一些实施方式中,使用open gap罚分为10.0和extend gap罚分为0.1的ClustalW v.1.83(slow)算法和使用Gonnet相似性矩阵(MacVector™ 10.0.2, Mac Vector Inc., 2008)确定同一性。用于序列同一性比较的序列的长度取决于特定的序列。在不同实施方式中,通过从其N末端至C末端对成熟蛋白的序列进行比较确定同一性。在不同实施方式中,当将人源/非人源嵌合序列与人序列进行比较时,将所述人源/非人源嵌合序列的人源部分(而不是非人源部分)用于比较,以确定人源序列和人源/非人源嵌合序列的人部分之间的同一性水平(例如对人源/小鼠嵌合蛋白的人胞外结构域与人蛋白的人胞外结构域进行比较)。

[0041] 术语“同源性”或“同源的”指序列例如核苷酸或氨基酸序列的两条序列经最佳比对和比较具有至少约75%的核苷酸或氨基酸、至少约80%的核苷酸或氨基酸、至少约90-95%的核苷酸或氨基酸,例如超过97%的核苷酸或氨基酸是相同的。本领域技术人员将理解,对于最佳基因靶向而言,靶向构建体应含有与内源性DNA序列同源的臂(即“同源臂”);因此,能够在靶向构建体与被靶向的内源性序列之间发生同源重组。

[0042] 术语“可操作地连接”指并列,其中被这样描述的组分处于允许其以预计方式发挥功能的关系中。因此,编码蛋白的核酸序列可以可操作地与调控序列(例如启动子、增强子、沉默子序列等)连接,以保持适宜的转录调控。此外,在细胞中本发明的嵌合或人源化蛋白的不同部分可以可操作地与使其保留折叠、加工、靶向、表达和其他功能性质的蛋白连接。

除非另有明示,本发明的嵌合或人源化蛋白的不同结构域彼此之间可操作地连接。

[0043] 如本申请所使用的,术语“MHC II复合物”、“MHC II蛋白”或类似表述包括MHC II α 多肽与MHC II β 多肽之间的复合物。如本申请所使用的,术语“MHC II α 多肽”或“MHC II β 多肽”(或类似表述)分别包括单独的MHC II α 多肽或单独的MHC II β 多肽。类似地,术语“HLA-DR4复合物”、“HLA-DR4蛋白”、“H-2E复合物”、“H-2E蛋白”或类似表述指 α 和 β 多肽之间的复合物。通常,术语“人MHC”和“HLA”可以互换使用。

[0044] 术语“取代”即基因取代,指在内源性基因座加入外源性遗传物质,以使用直系同源或同源核酸序列取代全部或部分内源性基因。如下述实施例所示,内源性MHC II基因座的核酸序列被包含编码人MHC II α 和 β 多肽的一部分的序列的核苷酸序列取代;特别地,为编码MHC II α 和 β 多肽的胞外部分。

[0045] 如本申请所使用的“功能性”,例如功能性多肽,指保留至少一个与天然蛋白相关的正常生物活性的多肽。例如,在本发明的一些实施方式中,在内源性基因座的取代(例如在内源性非人源MHC II基因座的取代)使得基因座无法表达功能性内源性多肽。

[0046] 基因修饰的MHC II动物

[0047] 在不同方面,本发明通常提供了一种基因修饰的非人动物,所述动物在其基因组中包含编码人源或人源化MHC II复合物的核苷酸序列;因此,所述动物表达人源或人源化的MHC II复合物(例如MHC II α 和 β 多肽)。

[0048] MHC基因分为三类:I类、II类和III类,其均在人6号染色体或小鼠17号染色体上编码。人和小鼠MHC类型相对结构的示意图分别见图2和图3。大多数MHC基因是多态性的,事实上其为小鼠和人基因组中最具多态性的基因。MHC多态性被推定为在提供进化益处方面是重要的;改变序列能够导致肽结合的差异,以便更好地将病原体提呈至细胞毒性T细胞。一个例外是人HLA-DR α 链及其小鼠同源物E α (即H-2E α),其是单态的。

[0049] MHC II类复合物包含两个非共价结合的结构域: α 链和 β 链,在本申请中也称为 α 多肽和 β 多肽(图1)。该蛋白横跨细胞质膜;因此其含有胞外结构域、跨膜结构域和胞质结构域。 α 链的胞外部分包括 α 1和 α 2结构域, β 链的胞外部分包括 β 1和 β 2结构域。 α 1和 β 1结构域在细胞表面形成肽结合裂隙。由于MHC II复合物的肽结合裂隙的三维构象,理论上对所结合抗原的长度没有上限,但是通常MHC II提呈肽的长度为13至17个氨基酸。

[0050] 除了其与抗原肽相互作用以外,在MHC II复合物形成和肽获取过程中MHC II分子的肽结合裂隙与恒定链(Ii)相互作用。 α/β MHC II二聚体在内质网组装并与Ii链结合,其负责控制肽结合并且将MHC II靶向至内吞通路。在内涵体中,Ii发生蛋白水解,Ii的小片段II类相关恒定链肽(CLIP)仍在肽结合裂隙。在内涵体中,在HLA-DM的控制下(在人中),CLIP被交换为抗原肽。

[0051] 在 α 2和 β 2结构域交界处的疏水性裂隙,MHC II与T细胞辅助受体CD4相互作用。Wang和Reinherz(2002) Structural Basis of T Cell Recognition of Peptides Bound to MHC Molecules, *Molecular Immunology*, 38:1039-49。当CD4和T细胞受体与同肽复合的同一MHC II分子结合时,T细胞对抗原的敏感性增加,其活化所需的抗原降低100倍。参见Janeway's *Immunobiology*, 第7版, Murphy等编辑。Garland Science, 2008, 其通过引用并入本申请。

[0052] 已经提出了MHC II跨膜和胞质结构域的很多功能。在质膜结构域的情况下,已发

现其对细胞内信号传导、运输至细胞质膜和最终的抗原提呈均是重要的。例如,已发现T细胞杂交瘤对转染了胞质结构域截短的MHC II β 链的抗原提呈细胞(APC)应答较弱,并且诱导B细胞分化受阻。参见例如Smiley等,(1996) Truncation of the class II β -chain cytoplasmic domain influences the level of class II/invariant chain-derived peptide complexes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93:241-44。II类分子的截短似乎会削弱cAMP的产生。据推测MHC II胞质尾的缺失影响细胞内运输,从而阻止复合物在内吞途径中遇到相关抗原。Smiley等(同上)证明了II类分子在胞质结构域的截短减少了CLIP/II类复合物的数量,推测其影响了CLIP有效调节抗原提呈的能力。

[0053] 根据一种假说,由于MHC II簇对T细胞受体(TCR)的触发具有重要作用,因而如果在胞质结构域截短的MHC II分子无法与细胞骨架结合并且因此而聚集,则向T细胞的抗原提呈将受到影响。Ostrand-Rosenberg等,(1991) Abrogation of Tumorigenicity by MHC Class II Antigen Expression Requires the Cytoplasmic Domain of the Class II Molecule, *J. Immunol.* 147:2419-22。事实上,最近发现寡聚化后在胞质结构域截短的HLA-DR无法与细胞骨架结合。El Fakhy等,(2004) Delineation of the HLA-DR Region and the Residues Involved in the Association with the Cytoskeleton, *J. Biol. Chem.* 279:18472-80。重要的是,肌动蛋白细胞骨架是局部信号转导活性的位点,其能够影响抗原提呈。除了与细胞骨架结合以外,最近的研究还发现在全部HLA-DR分子中有高达20%组成性地存在于APC中的脂筏,其是富含胆固醇和鞘糖脂的微区,并且这种定位对抗原提呈、免疫突触的形成和MHC II介导的信号传导均具有重要作用。参见例如Dolan等,(2004) Invariant Chain and the MHC II Cytoplasmic Domains Regulate Localization of MHC Class II Molecules to Lipid Rafts in Tumor Cell-Based Vaccines, *J. Immunol.* 172:907-14。Dolan等提出MHC II胞质结构域的截短减少MHC II在脂筏的组成性定位。

[0054] 此外,MHC II的胞质结构域,特别是 β 链,含有具有被泛素化连接酶泛素化的亮氨酸残基,控制MHC II的胞内运输、内化和降解的膜结合RING-CH I (MARCH I);并且发现树突状细胞成熟导致的MARCH-介导的泛素化停止结果使得细胞质膜MHC II的水平升高。Shin等,(2006) Surface expression of MHC class II in dendritic cells is controlled by regulated ubiquitination, *Nature* 444:115-18;De Gassart等,(2008) MHC class II stabilization at the surface of human dendritic cells is the result of maturation-dependent MARCH I down-regulation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105:3491-96。

[0055] MHC II的 α 和 β 链的跨膜结构域彼此之间相互作用并且该相互作用对II类MHC复合物的适宜组装具有重要作用。Cosson和Bonifacino (1992) Role of Transmembrane Domain Interactions in the Assembly of Class II MHC Molecules, *Nature* 258:659-62。事实上, α 和 β 链的跨膜结构域被IL-2受体的 α 链取代的MHC II分子仍保留在ER中,并且其在细胞表面几乎检测不到,同上。通过诱变研究,发现在 α 和 β 跨膜结构域的保守Gly残基负责MHC II在细胞表面的组装,同上。因此,跨膜和胞质结构域对MHC II复合物的正常功能均是至关重要的。

[0056] 在不同实施方式中,本发明提供了一种基因修饰的非人动物(例如小鼠、大鼠、家

兔等),所述动物在其基因组中包含编码人源或人源化MHC II复合物的核苷酸,例如人源或人源化MHC II α 和/或 β 多肽。所述非人动物可以在其基因组中包含编码部分是人源和部分是而非人源的MHC II复合物的核苷酸序列,例如表达人源/非人源嵌合MHC II复合物非人动物(例如表达人源/非人源嵌合MHC II α 和 β 多肽的非人动物)。在一个方面,所述非人动物仅表达人源或非人源MHC II复合物,例如人源/非人源嵌合MHC II复合物,并且不表达来自内源性MHC II基因座的内源性非人源MHC II复合物。在一些实施方式中,所述动物不能表达来自内源性MHC II基因座的任何内源性非人源MHC II复合物,但是仅表达人源或人源化MHC II复合物。在不同实施方式中,所述基因修饰的非人动物(例如小鼠、大鼠、家兔等)在其种系中包含编码人源或人源化MHC II复合物的核苷酸序列,例如人源或人源化MHC II α 和/或 β 多肽。

[0057] 在一个方面,本申请提供了一种人源/非人源嵌合MHC II复合物。在一个实施方式中,所述人源/非人源嵌合MHC II复合物包含人源/非人源嵌合MHC II α 多肽和人源/非人源嵌合MHC II β 多肽。在一个方面,所述嵌合MHC II α 多肽的人源部分和/或所述嵌合MHC II β 多肽的人源部分分别包含人MHC II α 多肽和/或人MHC II β 多肽的肽结合结构域。在一个方面,所述嵌合MHC II α 和/或 β 多肽的人源部分分别包含人源MHC II α 和/或 β 多肽的胞外结构域。在一个实施方式中,所述嵌合MHC II α 多肽的人源部分包含人MHC II α 多肽的 α 1结构域;在另一个实施方式中,所述嵌合MHC II α 多肽的人源部分包含人源MHC II α 多肽的 α 1和 α 2结构域。在又一个实施方式中,所述嵌合MHC II β 多肽的人源部分包含人源MHC II β 多肽的 β 1结构域;在另一个实施方式中,所述嵌合MHC II β 多肽的人源部分包含人源MHC II β 多肽的 β 1和 β 2结构域。

[0058] 本申请所述的MHC II α 和 β 多肽的人源部分可以由HLA-DP、-DQ和-DR基因座中的任意一个编码。常用的HLA抗原和等位基因列表参见Shankarkumar等((2004) *The Human Leukocyte Antigen (HLA) System*, *Int. J. Hum. Genet.* 4 (2) :91-103),其通过引用并入本申请。Shankarkumar等还提供了对本领域使用的HLA命名法的简要说明。HLA命名法和不同HLA等位基因的其他信息可以参见Holdsworth等,(2009) *The HLA dictionary 2008: a summary of HLA-A,-B,-C,-DRB1/3/4/5, and DQB1 alleles and their association with serologically defined HLA-A,-B,-C,-DR, and-DQ antigens*, *Tissue Antigens* 73:95-170,以及最新的Marsh等,(2010) *Nomenclature for factors of the HLA system*, 2010, *Tissue Antigens* 75:291-455,其均通过引用并入本申请。因此,所述人源或人源化MHC II多肽可以来源于本申请所述的任意功能性人HLA分子。

[0059] 在一个特定方面,本申请所述的人源化MHC II复合物的人源部分来源于人HLA-DR,例如HLA-DR4。典型地,HLA-DR的 α 链是单一形态的,例如HLA-DR复合物的 α 链由HLA-DRA基因(例如HLA-DR α *01基因)编码。另一方面,HLA-DR的 β 链是多形态的。因此,HLA-DR4包含由HLA-DRA基因编码的 α 链和由HLA-DRB1基因编码的 β 链(例如HLA-DR β 1*04基因)。如本申请的下文所述,HLA-DR4已知与多种自身免疫性疾病的发生相关,例如类风湿性关节炎、I型糖尿病、多发性硬化症等。在本发明的一个实施方式中,HLA-DRA等位基因是HLA-DR α *01等位基因,例如HLA-DR α *01:01:01:01。在另一个实施方式中,HLA-DRB等位基因是HLA-DR β 1*04,例如HLA-DR β 1*04:01:01。尽管本实施例描述了这些特定的HLA序列;但是任意适宜的HLA-DR序列均包含在本申请中,例如在人群中显示出的多态性变体,具有一个或多个保守性或

非保守性氨基酸修饰的序列,由于密码子的简并性等与本申请所述的核酸序列不同的序列。

[0060] 所述人源化MHC II复合物的人源部分可以由已知与常见的人类疾病相关的HLA等位基因的核苷酸序列编码。这种HLA等位基因包括但不限于HLA-DRB1*0401、-DRB1*0301、-DQA1*0501、-DQB1*0201、-DRB1*1501、-DRB1*1502、-DQB1*0602、-DQA1*0102、-DQA1*0201、-DQB1*0202、-DQA1*0501及其组合。对于与HLA等位基因/疾病相关的概述,参见Bakker等,(2006)A high-resolution HLA and SNP haplotype map for disease association studies in the extended human MHC,Nature Genetics 38:1166-72和补充资料,通过引用并入本申请。

[0061] 在一个方面,所述人源/非人源嵌合MHC II复合物的非人源部分包含内源性非人源(例如啮齿动物,例如小鼠,大鼠等)MHC II复合物的跨膜和/或胞质结构域。因此,所述人源/非人源嵌合MHC II α 多肽的非人源部分可以包含内源性非人源MHC IIB多肽的跨膜和/或胞质结构域。所述人源/非人源嵌合MHC II α 多肽的非人源部分可以包含内源性非人源MHC IIB多肽的跨膜和/或胞质结构域。在一个方面,所述动物是小鼠,所述嵌合 α 和 β 多肽的非人源部分来源于小鼠H-2E蛋白。因此,所述嵌合 α 和 β 多肽的非人源部分可以包含来源于小鼠H-2E蛋白的跨膜和胞质结构域。尽管在实施例中包含了特定的H-2E序列,但是任意适宜的序列例如多态性变体、保守性和/或非保守性氨基酸取代等可以包含在本申请中。

[0062] 在本发明的不同方面,编码人源/非人源嵌合MHC II多肽的序列位于内源性非人源MHC II基因座(例如小鼠H-2A和/或H-2E基因座)。在一个实施方式中,这导致内源性MHC II基因或其部分被编码人源或人源化MHC II蛋白的核苷酸序列取代,例如编码本申请所述的人源/非人源嵌合MHC II蛋白的嵌合基因。由于编码MHC II α 和 β 多肽的核苷酸序列在染色体上彼此之间邻近,因此可以将取代设计为单独或同时靶向至两个基因,这两种可能性均包含在本申请中。在一个实施方式中,所述取代包括编码MHC II α 和 β 多肽的内源性核苷酸序列被编码人源/非人源嵌合MHC α 多肽和编码人源/非人源嵌合MHC β 多肽的核苷酸序列取代。在一个方面,所述取代包含取代一个或多个(例如两个)内源性MHC II基因的核苷酸序列。因此,所述非人动物在内源性MHC II基因座含有人源/非人源嵌合核苷酸序列,并且表达来自于内源性非人源基因座的人源/非人源嵌合MHC II蛋白。

[0063] 因此,本申请提供了一种非人动物,所述动物在内源性MHC II基因座包含编码人源/非人源嵌合MHC II α 多肽的第一核苷酸序列和编码人源/非人源嵌合MHC IIB多肽的第二核苷酸序列,其中所述人源/非人源嵌合MHC II α 多肽的人源部分包含人源MHC II α 胞外结构域和所述人源/非人源嵌合MHC IIB多肽的人源部分包含人源MHC IIB,并且其中所述人源/非人源嵌合MHC II α 和MHC IIB多肽在细胞表面形成功能性MHC II复合物。

[0064] 所述人源/非人源嵌合多肽可以是这样的,其包含人源或非人源先导(信号)序列。在一个实施方式中,所述嵌合MHC II α 多肽包含内源性MHC II α 多肽的非人源先导序列。在一个实施方式中,所述嵌合MHC IIB多肽包含内源性MHC IIB多肽的非人源先导序列。在一个替代实施方式中,所述嵌合MHC II α 和/或MHC IIB多肽分别包含来自于另一种非人动物例如另一种啮齿动物或另一种小鼠品系的MHC II α 和/或MHC IIB多肽的非人源先导序列。因此,编码所述嵌合MHC II α 和/或MHC IIB多肽的核苷酸序列可以可操作地分别与编码非人源MHC II α 和/或MHC IIB先导序列的核苷酸序列连接。在又一个实施方式中,所述嵌合

MHC II α 和/或MHC II β 多肽分别包含人MHC II α 和/或人MHC II β 多肽的人先导序列(例如分别为人HLA-DRA和/或人HLA-DR β 1*04的先导序列)。

[0065] 人源/或非人源嵌合MHC II α 和/或MHC II β 多肽可以在其人源部分分别包含完整或基本完整的人源MHC II α 和/或人源MHC II β 多肽的胞外结构域。因此,人源部分可以包含至少80%、优选至少85%、更优选至少90%例如95%或以上的编码人源MHCII α 和/或人源MHC II β 多肽(例如人HLA-DRA和/或人HLA-DR β 1*04)胞外结构域的氨基酸。在一个实施例中,人源MHC II α 和/或人MHC II β 多肽基本上完整的胞外结构域缺乏人先导序列。在另一个例子中,人源/或非人源嵌合MHC II α 和/或人源/或非人源嵌合MHC II β 多肽包含人先导序列。

[0066] 此外,所述嵌合MHC II α 和/或MHC II β 多肽可以在内源性非人源启动子和调控元件(例如分别为小鼠MHC II α 和/或MHC II β 调控元件)的调控下表达。这种排列有利于所述嵌合MHC II多肽在非人动物中,例如在非人动物免疫应答期间正确表达,。

[0067] 基因修饰的非人动物可以选自下组:小鼠、大鼠、家兔、猪、牛(例如奶牛、公牛、水牛)、鹿、绵羊、山羊、鸡、猫、狗、雪貂、灵长类动物(例如狨猴、猕猴)。对于适宜的基因修饰的ES细胞不易于获得的非人动物而言,可以使用其他方法制备包含基因修饰的非人动物。这种方法包括例如修饰非ES细胞基因组(例如成纤维细胞或诱导多能干细胞)以及引入核转移以便将经修饰的基因组转移至适宜细胞例如卵母细胞,并且在适宜条件下在非人动物中使经修饰的细胞(例如经修饰的卵细胞)妊娠以形成胚胎。

[0068] 在一个方面,所述非人动物是哺乳动物。在一个方面,所述非人动物是小型哺乳动物,例如跳鼠科或鼠科超家族。在一个实施方式中,所述基因修饰的动物是啮齿动物。在一个实施方式中,所述啮齿动物选自小鼠、大鼠和仓鼠。在一个实施方式中,所述啮齿动物选自鼠科超家族。在一个实施方式中,所述基因修饰的动物来自选自丽仓鼠科(例如小鼠样仓鼠)、仓鼠科(例如仓鼠、新世界大鼠和小鼠、田鼠)、鼠科(真小鼠和大鼠、沙鼠、刺毛鼠、冠毛大鼠)、马岛鼠科(登山小鼠、岩小鼠、有尾大鼠、马达加斯加大鼠和小鼠)、刺山鼠科(例如多刺睡鼠)和鼯形鼠科(例如摩尔大鼠、竹大鼠和鼯鼠)家族。在一个特定实施方式中,所述基因修饰的啮齿动物选自真小鼠或大鼠(鼠科)、沙鼠、刺毛鼠和黄冠鼠。在一个实施方式中,所述基因修饰的小鼠是鼠科家族成员。在一个实施方式中,所述动物是啮齿动物。在一个特定实施方式中,所述啮齿动物选自小鼠和大鼠。在一个实施方式中,所述非人动物是小鼠。

[0069] 在一个特定实施方式中,所述非人动物是啮齿动物,其为选自C57BL/A、C57BL/An、C57BL/GrFa、C57BL/KaLwN、C57BL/6、C57BL/6J、C57BL/6ByJ、C57BL/6NJ、C57BL/10、C57BL/10ScSn、C57BL/10Cr和C57BL/01a的C57BL品系的小鼠。在另一个实施方式中,所述小鼠是选自下组的129品系:129P1、129P2、129P3、129X1、129S1(例如129S1/SV、129S1/SvIm)、129S2、129S4、129S5、129S9/SvEvH、129S6(129/SvEvTac)、129S7、129S8、129T1、129T2(参见例如Festing等(1999) Revised nomenclature for strain 129 mice, Mammalian Genome 10: 836, 亦参见Auerbach等(2000) Establishment and Chimera Analysis of 129/SvEv-and C57BL/6-Derived Mouse Embryonic Stem Cell Lines)。在一个特定实施方式中,所述基因修饰的小鼠是前述129品系和前述C57BL/6品系的混合物。在另一个特定实施方式中,所述小鼠是前述129品系的混合物或前述BL/6品系的混合物。在一个特定实施方式中,所述混合的129品系是129S6(129/SvEvTac)品系。在另一个实施方式中,所述小鼠是BALB品系,例如BALB/c品系。在又一个实施方式中,所述小鼠是BALB品系和另一个前述品系的混合物。

[0070] 在一个实施方式中,所述非人动物是大鼠。在一个实施方式中,所述大鼠选自Wistar大鼠、LEA品系、Sprague Dawley品系、Fischer品系、F344、F6和黑刺鼠。在一个实施方式中,所述大鼠品系是两种或多种选自下组的品系的混合物:Wistar、LEA、Sprague Dawley、Fischer、F344、F6和黑刺鼠。

[0071] 因此,在一个实施方式中,本发明涉及一种基因修饰小鼠,所述小鼠在其基因组中包含编码人源/小鼠嵌合MHC II复合物的核苷酸序列,例如人源/小鼠嵌合MHC II α 和 β 多肽。在一个实施方式中,所述人源/小鼠嵌合MHC II α 多肽的人源部分包含人源MHC II α 肽结合或胞外结构域并且所述人源/小鼠嵌合MHC II β 多肽的人源部分包含人源MHC II β 肽结合或胞外结构域。在一些实施方式中,所述小鼠不表达来自内源性小鼠基因座(例如H-2A和/或H-2E基因座)的内源性小鼠 α 和/或 β 多肽的肽结合或胞外结构域。在一些实施方式中,所述小鼠包含缺乏编码包括H-2Ab1、H-2Aa、H-2Eb1、H-2Eb2、H-2Ea及其组合的功能性MHC II类分子基因的基因组。所述人源MHC II α 多肽的肽结合结构域可以包含 α 1结构域并且所述人源MHC II β 多肽的肽结合结构域可以包含 β 1结构域;因此,所述嵌合MHC II复合物的肽结合结构域可以包含人 α 1和 β 1结构域。所述人源MHC II α 多肽的胞外结构域可以包含 α 1和 α 2结构域并且所述人源MHC II β 多肽的胞外结构域可以包含 β 1和 β 2结构域,因此,所述嵌合MHC II复合物的胞外结构域可以包含人 α 1、 α 2、 β 1和 β 2结构域。在一个实施方式中,所述嵌合MHC II复合物的鼠部分包含小鼠MHC II的跨膜和胞质结构域,例如小鼠H-2E(例如小鼠H-2E α 和 β 链的跨膜和胞质结构域)。

[0072] 因此,在一个实施方式中,本申请提供了一种基因修饰小鼠,其中所述小鼠在内源性小鼠MHC II基因座包含编码人源/小鼠嵌合MHC II α 多肽的第一核苷酸序列以及编码人源/小鼠嵌合MHC II β 多肽的第二核苷酸序列,其中所述嵌合MHC II α 多肽的人源部分包含来源于人HLA-DR4蛋白 α 多肽的胞外结构域以及所述嵌合MHC II β 多肽的人源部分包含来源于人HLA-DR4蛋白 β 多肽的胞外结构域,其中所述嵌合MHC II α 多肽的小鼠部分包含小鼠H-2E α 链的跨膜和胞质结构域并且所述嵌合MHC II β 多肽的小鼠部分包含小鼠H-2E β 链的跨膜和胞质结构域,以及其中所述小鼠表达功能性嵌合HLA-DR4/H-2E MHC II复合物。在一个实施方式中,所述嵌合HLA-DR4/H-2EMHC II复合物包含MHC II α 链,其包括来源于HLA-DR4蛋白(HLA-DRA α 1和 α 2结构域)的胞外结构域(例如 α 1和 α 2结构域)和小鼠H-2E α 链的跨膜和胞质结构域,以及MHC II β 链,其包括来源于HLA-DR4蛋白(HLA-DRB1*04 β 1和 β 2结构域)的胞外结构域(例如 β 1和 β 2结构域)和小鼠H-2E β 链的跨膜和胞质结构域。在一个方面,所述小鼠不表达来自于其内源性小鼠基因座的功能性内源性H-2A和H-2E多肽(例如所述小鼠不表达H-2Ab1、H-2Aa、H-2Eb1、H-2Eb2和H-2Ea多肽)。在不同实施方式中,所述第一和第二核苷酸序列的表达在其各自的内源性小鼠启动子和调控元件的调控下进行。在本发明的不同实施方式中,所述第一和第二核苷酸序列位于同一染色体。在一些方面,所述小鼠包含两个拷贝的含有所述第一和第二核苷酸序列的嵌合MHC II基因座,而在其他方面,所述小鼠包含一个拷贝的含有所述第一和第二核苷酸序列的MHC II基因座。因此,所述小鼠针对含有所述第一和第二核苷酸序列的嵌合MHC II基因座可以是纯合的或杂合的。在不同实施方式中,所述第一和第二核苷酸序列包含在小鼠的种系中。

[0073] 在本申请所述的一些实施方式中,提供了一种小鼠,所述小鼠在内源性小鼠MHC II基因座包含嵌合的MHC II基因座,例如通过内源性小鼠H-2A和H-2E基因的取代。在一些

方面,所述嵌合基因座包含编码人源HLA-DRA的胞外结构域以及小鼠H-2E α 链的跨膜和胞质结构域,以及人源HLA-DR β 1*04的胞外结构域以及小鼠H-2E β 链的跨膜和胞质结构域的核苷酸序列。所述嵌合基因座的不同结构域以这种形式连接,从而所述基因座表达功能性嵌合人源/小鼠MHC II复合物。

[0074] 在不同实施方式中,表达来自于如本申请所述的嵌合MHC II基因座的功能性嵌合MHC II蛋白的非人动物(例如啮齿动物,例如小鼠或大鼠)在细胞表面展示嵌合蛋白。在一个实施方式中,所述非人动物在细胞表面表达的嵌合MHC II蛋白在细胞中的分布与在人中所观察到的结果相同。在一个方面,所述细胞展示的肽片段(抗原片段)与所述嵌合MHC II蛋白的细胞外部分(例如人HLA-DR4的细胞外部分)结合。

[0075] 在不同实施方式中,展示嵌合MHC II蛋白例如HLA-DR4/H-2E蛋白的细胞是抗原提呈细胞(APC),例如巨噬细胞、树突状细胞或B细胞。在一些实施方式中,通过嵌合蛋白提呈的肽片段来自肿瘤。在其他实施方式中,通过所述嵌合MHC II蛋白提呈的肽片段来自病原体,例如细菌、病毒或寄生虫。

[0076] 本申请所述的嵌合MHC II蛋白可以与相同细胞或另一个细胞表面的其他蛋白相互作用。所述嵌合MHC II蛋白与所述细胞表面的内源性非人蛋白相互作用。所述嵌合MHC II蛋白还可以与相同细胞或另一个细胞表面的人源或人源化蛋白相互作用。在一些实施方式中,所述另一个细胞是T细胞,并且所述嵌合MHC II蛋白与T细胞受体(TCR)及其辅助受体CD4相互作用。在一些实施方式中,所述T细胞是内源性小鼠T细胞。在其他实施方式中,所述T细胞是人T细胞。在一些实施方式中,所述TCR是人源或人源化TCR。在附加实施方式中,所述CD4是人源或人源化CD4。在其他实施方式中,所述TCR和CD4之一或二者均是非人源的,例如小鼠或大鼠。

[0077] 在一个实施方式中,如本申请所述提供了一种基因修饰的非人动物,其与缺乏嵌合MHC II基因的野生型动物相比不会以更高的比率发展肿瘤。在一些实施方式中,所述动物不会与野生型动物相比以更高的比率发展血液系统恶性肿瘤,例如各种T和B细胞淋巴瘤、白血病、复合性淋巴瘤(例如霍奇金氏淋巴瘤)。

[0078] 除了基因修饰的非人动物以外,本申请还提供了非人胚胎(例如啮齿动物胚胎,例如小鼠或大鼠胚胎),其中所述胚胎包含供体ES细胞,其来源于如本申请所述的非人动物(例如啮齿动物,例如小鼠或大鼠)。在一个方面,所述胚胎包含包括所述嵌合MHC II基因的ES供体细胞和宿主胚胎细胞。

[0079] 本申请还提供了一种组织,其中所述组织来源于如本申请所述的非人动物(例如啮齿动物,例如小鼠或大鼠),并且表达所述嵌合MHC II多肽(例如HLA-DR4/H-2E多肽)。

[0080] 此外,本申请提供了分离自如本申请所述的非人动物的非人细胞。在一个实施方式中,所述细胞是ES细胞。在一个实施方式中,所述细胞是抗原提呈细胞,例如树突状细胞、巨噬细胞、B细胞。在一个实施方式中,所述细胞是免疫细胞。在一个实施方式中,所述免疫细胞是淋巴细胞。

[0081] 本申请还提供了一种非人细胞,所述细胞包含如本申请所述的非人动物的染色体或其片段。在一个实施方式中,所述非人细胞包含如本申请所述的非人动物的细胞核。在一个实施方式中,所述非人细胞包含核转移得到的染色体或其片段。

[0082] 在一个方面,本申请提供了一种非人诱导多能干细胞,所述细胞包含编码如本申

请所述的嵌合MHC II蛋白(例如HLA-DR4/H-2E蛋白)的基因。在一个实施方式中,所述诱导多能干细胞来源于如本申请所述的非人动物。

[0083] 在一个方面,本申请提供了一种杂交瘤或四价体瘤,其来源于如本申请所述的非人动物细胞。在一个实施方式中,所述非人动物是小鼠或大鼠。

[0084] 在一个方面,本申请提供了一种体外制备物,其包含携带含有结合的肽以形成人源/啮齿动物嵌合MHC II/肽复合物的人源/啮齿动物嵌合MHC II表面蛋白的第一细胞,以及与所述人源/啮齿动物嵌合MHC II/肽复合物结合的第二细胞。在一个实施方式中,所述第二细胞包含人源或人源化T细胞受体,并且在一个实施方式中进一步包含人源或人源化CD4。在一个实施方式中,所述第二细胞是啮齿动物(例如小鼠或大鼠)细胞,所述细胞包含人源或人源化T细胞受体以及人源或人源化CD4蛋白。在一个实施方式中,所述第二细胞是人细胞。

[0085] 本申请还提供了一种制备如本申请所述的基因工程非人动物(例如基因工程啮齿动物,例如小鼠或大鼠)的方法。该制备基因工程非人动物的方法得到在其基因组中包含编码嵌合MHC II蛋白(例如嵌合MHC II α 和 β 多肽)的核苷酸序列的动物。在一个实施方式中,所述方法产生的基因工程小鼠,其基因组在内源性MHC II基因座包含编码人源/小鼠嵌合MHC II蛋白的核苷酸序列,其中所述嵌合MHC II蛋白的人源部分包含人源HLA-DR4的胞外部分和小鼠部分包含小鼠H-2E的跨膜和胞质结构域。在一些实施方式中,如实施例中所描述的,所述方法利用使用VELOCIGENE®技术制备的靶向构建体,将所述构建体引入ES细胞并使用VELOCIMOUSE®技术将被靶向的ES细胞克隆引入小鼠胚胎。在一个实施方式中,所述ES细胞是129和C57BL/6小鼠品系的混合物;所述ES细胞是BALB/c和129小鼠品系的混合物。

[0086] 本申请还提供了用于产生本申请所述的基因工程非人动物的核苷酸构建体。在一个方面,所述核苷酸构建体包含:5'和3'非人同源臂、包含人HLA-DR α 和 β 链序列的DNA片段和重组位点翼侧的选择性表达盒。在一个实施方式中,所述人HLA-DR α 和 β 链序列是包含人HLA-DR α 和 β 链基因的内含子和外显子的基因组序列。在一个实施方式中,所述非人同源臂与非人MHC II基因组序列具有同源性。

[0087] 在一个实施方式中,所述人源HLA-DR α 链序列包含 α 1和 α 2结构域编码序列。在一个特定实施方式中,其包含,从5'至3': α 1外显子(外显子2)、 α 1/ α 2内含子(内含子2)和 α 2外显子(外显子3)。在一个实施方式中,所述人源HLA-DR β 链序列包含 β 1和 β 2结构域编码序列。在一个特定实施方式中,其包含,从5'至3': β 1外显子(外显子2)、 β 1/ β 2内含子(内含子2)和 β 2外显子(外显子3)。

[0088] 选择性表达盒是插入靶向构建体的核苷酸序列,其有助于选择已插入所关注构建体的细胞(例如ES细胞)。多种适宜的选择性表达盒是本领域公知的。通常,在存在特定抗生素(例如Neo、Hyg、Pur、CM、Spec等)的条件下选择性表达盒能够得到阳性选择。此外,选择性表达盒可以被重组位点翼侧包围,这使得在使用重组酶处理后可以删除选择性表达盒。常用的重组位点是loxP和Frt,其分别由Cre和Flp酶识别,但其他的也是本领域公知的。选择性表达盒可以位于构建体编码区外的任意位置。在一个实施方式中,所述选择性表达盒位于 β 链内含子,例如 β 2/跨膜结构域内含子(内含子3)。

[0089] 在一个实施方式中,5'和3'同源臂包含位于内源性非人源MHC II基因座5'和3'位

置的基因组序列。在一个实施方式中,所述5'同源臂包含小鼠H-2Ab1基因上游的基因组序列和所述3'同源臂包含小鼠H-2Ea基因下游的基因组序列。在这个实施方式中,所述构建体允许小鼠H-2E和H-2A基因都被取代。

[0090] 因此,在一个方面,本申请提供了一种核苷酸构建体,其从5'至3'包含:含有小鼠H-2Ab1基因上游的小鼠基因组序列的5'同源臂、含有编码人源/小鼠嵌合MHC II β 链序列的第一核苷酸序列、含有编码人源/小鼠嵌合MHC II α 链序列的第二核苷酸序列,以及含有小鼠H-2Ea基因下游的小鼠基因组序列的3'同源臂。在一个特定实施方式中,所述第一核苷酸序列包含编码人源/小鼠嵌合MHC II β 链的序列,其含有人 β 1外显子、 β 1/ β 2内含子、 β 2外显子、插入人 β 2外显子序列和小鼠跨膜结构域外显子序列之间内含子区域的被重组位点翼侧包围的选择性表达盒。在一个特定实施方式中,所述第二核苷酸序列包含编码人源/小鼠嵌合MHC II α 链的序列,其含有人 α 1外显子、 α 1/ α 2内含子和人 α 2外显子。本发明的一个示例性构建体如图5所示(MAID 1680)。

[0091] 在基因靶向完成后,对ES细胞或基因修饰的非人动物进行筛选以确证成功掺入了所关注的外源性核苷酸序列或表达了外源性多肽。多种技术是本领域技术人员公知的,包括(但不限于)Southern印迹、长PCR、定量PCT(例如使用TAQMAN®的实时PCR)、荧光原位杂交、Northern印迹、流式细胞术、Western分析、免疫细胞化学、免疫组化等。在一个例子中,可以通过筛选小鼠等位基因的缺失情况和/或人等位基因的获得情况对携带所关注基因修饰的非人动物(例如小鼠)进行鉴定,其采用Valenzuela等,(2003) High-throughput engineering of the mouse genome coupled with high-resolution expression analysis, Nature Biotech. 21 (6) :652-659中所述的经修订的等位基因检测。鉴定基因修饰动物中的特定核苷酸或氨基酸序列的其他检测是本领域技术人员所公知的。

[0092] 本公开还提供了一种修饰非人动物的MHC II基因座以表达本申请所述的人源/非人源嵌合MHC II复合物的方法。在一个实施方式中,本发明提供了一种修饰小鼠的MHC II基因座以表达人源/小鼠嵌合MHC II复合物的方法,所述方法包括在内源性小鼠MHC II基因座使用编码人源/小鼠嵌合MHC II复合物的核苷酸序列取代编码小鼠MHC II复合物的核苷酸序列。在一个特定的方面,编码人源/小鼠嵌合MHC II复合物的核苷酸序列包含编码人源MHC II α 链(例如HLA-DR4 α 链)胞外结构域以及小鼠MHC II α 链(例如H-2E α 链)的跨膜和胞质结构域的第一核苷酸序列以及编码人源MHC II β 链(例如HLA-DR4 β 链)的胞外结构域以及小鼠MHC II β 链(例如H-2E β 链,例如H-2Eb1链)的跨膜和胞质结构域的第二核苷酸序列。在一些实施方式中,所述经修饰的小鼠MHC II基因座表达嵌合HLA-DR4/H-2E蛋白。

[0093] 在一个方面,本申请提供了一种制备人源HLA II类/非人源MHC II类嵌合分子的方法,所述方法包括在单个细胞中表达来自如本申请所述的核苷酸构建体的嵌合HLA-DR4/H-2E蛋白。在一个实施方式中,所述核苷酸构建体是病毒载体;在一个特定实施方式中,所述病毒载体是慢病毒载体。在一个实施方式中,所述细胞选自CHO、COS、293、HeLa和表达病毒核酸序列的视网膜细胞(例如PERC.6TM细胞)。

[0094] 在一个方面,本申请提供了一种表达嵌合HLA-DR4/H-2E蛋白的细胞。在一个实施方式中,所述细胞包含含有如本申请所述的嵌合MHC II类序列的表达载体。在一个实施方式中,所述细胞选自CHO、COS、293、HeLa和表达病毒核酸序列的视网膜细胞(例如PERC.6TM细胞)。

[0095] 本申请还提供了一种使用本申请所述的非人动物制备的嵌合MHC II类分子,其中所述嵌合MHC II类分子包含来自人源MHC II蛋白的 $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、 $\beta 1$ 和 $\beta 2$ 结构域,例如HLA-DR4 protein,以及来自非人源MHC II蛋白的跨膜和胞质结构域,例如小鼠H-2E蛋白。可以使用抗-HLA-DR抗体检测包含如本申请所述的HLA-DR4胞外结构域的嵌合MHC II复合物。因此,可以使用抗-HLA-DR抗体检测和/或选择展示人源/非人源嵌合MHC II多肽的细胞。

[0096] 尽管下述实施例描述了一种基因工程动物,其基因组包含编码小鼠H-2A和H-2E蛋白的核苷酸序列被编码人源/小鼠嵌合HLA-DR4/H-2E蛋白的核苷酸序列取代,本领域技术人员将理解可以使用类似的策略引入包含其他人源MHC II基因(HLA-DP和HLA-DQ)的嵌合体。因此,本发明的一个附加实施方式涉及一种基因工程动物,其基因组包含编码嵌合HLA-DQ/H-2A蛋白的核苷酸序列。在一个实施方式中,所述核苷酸序列编码嵌合HLA-DQ2.5/H-2A蛋白。在另一个实施方式中,所述核苷酸序列编码嵌合HLA-DQ8/H-2A蛋白。此外,还涉及引入多个人源化的MHC II分子(例如嵌合HLA-DR/H-2E和HLA-DQ/H-2A)。

[0097] 基因修饰动物的用途

[0098] 在不同实施方式中,本申请所述的基因修饰的非人动物生成在细胞表面具有人源或人源化MHC II的APC,并且因为复合物基本上所有的组分均是人源或人源化的,导致以人样方式针对T细胞的表位提呈衍生自胞质蛋白的肽。本发明基因修饰的非人动物可以用于在人源化动物中研究人免疫系统的功能;用于鉴定激发免疫应答(例如T细胞表位,例如独特的人癌表位)的抗原和抗原表位,例如用于开发疫苗;用于鉴定针对人病原体或癌抗原高亲和性的T细胞;用于评估疫苗候选物和其他疫苗策略;用于研究人自身免疫;用于研究人感染性疾病;以及设计基于人MHC表达的其他更好的治疗策略。

[0099] MHC II复合物结合来源于胞外蛋白的肽,例如胞外细菌、邻近细胞或通过B细胞受体结合并内化进入B细胞的多肽。一旦胞外蛋白进入内吞途径,其降解成肽,并且所述肽通过MHC II结合和提呈。一旦MHC II所提呈的肽被CD4+T细胞识别,T细胞活化、增殖、分化成多种T辅助亚型(例如 T_H1 , T_H2)并且导致多项事件,包括巨噬细胞介导的病原体杀伤活化、B细胞增殖和抗体产生。由于MHC II在免疫应答中的作用,使得对MHC II肽提呈的理解在研发对人类疾病的治疗方法中具有重要作用。然而,在小鼠MHC II背景下的抗原提呈仅与某些人类疾病相关,因为人和小鼠MHC复合物识别不同的抗原,例如小鼠MHC II可能与人MHC II不识别相同抗原或提呈不同表位。因此,针对人类疾病的大部分相关数据是通过对人MHC II提呈的抗原表位的研究中获得的。

[0100] 因此,在不同实施方式中,本发明的基因工程动物除了其他方面以外在评估抗原在人体内启动免疫应答的能力方面是有用的,并且用于产生多种多样的抗原以及鉴定可以用于人用疫苗研发中的特定抗原。

[0101] 在一个方面,本申请提供了一种在人的某种肽序列中确定抗原性的方法,所述方法包括将如本申请所述的基因修饰的非人动物与包含所述肽序列的分子接触,使所述非人动物产生免疫应答,并且检测非人动物中与由本申请所述的人源化MHC II复合物提呈的肽序列结合的细胞。

[0102] 在一个方面,本申请提供了一种确定是否某种肽将在人体内激发细胞免疫的方法,所述方法包括将如本申请所述的基因修饰的非人动物与所述肽接触,使所述非人动物产生免疫应答,并且检测非人动物中与由本申请所述的人源/非人源嵌合MHC II类分子提

呈的肽序列结合的细胞。在一个实施方式中,接触后的所述非人动物包含与所述肽结合MHC II类-受限制的CD4+T细胞。

[0103] 在一个方面,本申请提供了一种鉴定人CD4+T细胞表位的方法,所述方法包括将如本申请所述的非人动物与包含预测T细胞表位的抗原接触,使所述非人动物产生免疫应答,并且鉴定通过MHC II类-受限制的CD4+T细胞结合的表位。

[0104] 在一个方面,本申请提供了一种鉴定在人体内产生CD4+T细胞应答的抗原的方法,所述方法包括将预测抗原与如本申请所述的小鼠接触,使所述小鼠产生免疫应答,检测对人MHC II分子(例如HLA-DR分子)背景下的抗原具有特异性的CD4+T细胞应答,并且鉴定与人MHC II-受限制的分子(例如人HLA-DR受限制的分子)结合的抗原。

[0105] 在一个实施方式中,所述抗原包括细菌蛋白。在一个实施方式中,所述抗原包括人肿瘤细胞抗原。在一个实施方式中,所述抗原包括假定供人体内使用的疫苗或其他生物制品。在一个实施方式中,所述抗原包括在人体内产生抗体的人表位。在又一个实施方式中,所述抗原包括酵母或真菌细胞抗原。在又一个实施方式中,所述抗原来源于人寄生虫。

[0106] 在一个方面,本申请提供了一种确定假定抗原是否含有某一表位的方法,所述表位暴露于人免疫系统后产生HLA-DR-受限制的免疫应答(例如HLA-DR4-受限制的应答),所述方法包括将如本申请所述的小鼠与假定抗原接触并且测定小鼠中的抗原特异性HLA-DR-受限制的(例如HLA-DR4-受限制的)免疫应答。在另一个方面,本申请提供了一种用于确定假定抗原是否含有某一表位的方法,所述表位暴露于人免疫系统后产生HLA-DQ-受限制的应答。

[0107] 本申请还提供了一种针对在人MHC II复合物背景下提呈的抗原(例如来源于细菌寄生虫等的抗原)产生抗体的方法,所述方法包括将本申请所述的小鼠与抗原接触,使所述小鼠产生免疫应答,其中所述免疫应答包含产生抗体,并分离识别在人MHC II复合物背景下提呈的抗原的抗体。在一个实施方式中,为产生针对肽-MHC II的抗体,使用肽-MHC II免疫原免疫MHC II人源化的小鼠。

[0108] 在一个方面,本申请提供了一种鉴定T细胞受体可变结构域的方法,所述结构域识别在MHC II背景下提呈的抗原(例如人肿瘤抗原,疫苗等),所述方法包括将包含本申请所述的人源化MHC II复合物的小鼠与抗原接触,使所述小鼠产生免疫应答,并且从所述小鼠分离与MHC II-受限制的抗原结合的编码T细胞受体可变结构域的核酸序列。在一个实施方式中,所述抗原在人源化MHC II(例如人HLA II胞外结构域/小鼠MHC II跨膜和/或胞质结构域)背景下提呈。

[0109] 可以采用多种本领域公知的技术例如T细胞增殖检测,细胞因子释放检测等测定T细胞与在MHC II(例如人HLA II胞外结构域/小鼠MHC II跨膜和/或胞质结构域)背景下提呈肽的APC之间的相互作用结果。

[0110] 除了能够鉴定来自病原体或肿瘤的抗原及其T细胞表位以外,本发明的基因修饰动物还能够用于鉴定与人自身免疫性疾病相关的自身抗原,以及研究人自身免疫性疾病的进展。已知HLA基因座内的多态性在人自身免疫性疾病的易感性方面具有重要作用。事实上,已鉴定得到在HLA-DR和HLA-DQ基因座中的特定多态性与类风湿性关节炎、I型糖尿病、桥本氏甲状腺炎、多发性硬化症、重症肌无力、格雷夫斯氏病、系统性红斑狼疮、乳糜泻、克隆氏病、溃疡性结肠炎及其他自身免疫性疾病的进展相关。参见例如Wong和Wen(2004) What

can the HLA transgenic mouse tell us about autoimmune diabetes?, Diabetologia 47:1476-87; Taneja和David(1998) HLA Transgenic Mice as Humanized Mouse Models of Disease and Immunity, J.Clin.Invest.101:921-26; Bakker等, (2006), 如上所述; 以及International MHC and Autoimmunity Genetics Network(2009) Mapping of multiple susceptibility variants within the MHC region for 7 immune-mediated diseases, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 106:18680-85。

[0111] 因此,本申请所述的用于制备人源化MHC II复合物的动物的方法可以被用于引入认为与特定人自身免疫性疾病相关的MHC II分子,以及可以研究人自身免疫性疾病的进展。此外,本申请所述的非人动物可以用于开发人自身免疫性疾病的动物模型。根据本发明的携带本申请所述的人源化MHC II蛋白的小鼠可以用于鉴定潜在的自身抗原,以展示疾病进展涉及的表位,并且用于设计调节自身免疫性疾病的策略。

[0112] 此外,本申请所述的基因修饰动物可以用于研究人过敏反应。因为过敏反应似乎与MHC II等位基因相关,所以本申请所述的基因修饰动物可以用于确定抗原特异性T细胞应答的HLA限制并且研发对抗过敏反应的策略。

[0113] 在一些实施方式中,本申请提供了如下1-41项所述的实施方案:

[0114] 1.一种非人动物,所述动物在其内源性主要组织相容性复合物II (MHC II) α 基因座包含编码人源/非人源嵌合MHC II α 多肽的核苷酸序列,

[0115] 其中所述人源/非人源嵌合MHC II α 多肽的人源部分包含人MHC II α 胞外结构域,并且

[0116] 其中所述动物在动物细胞表面表达功能性MHC II复合物。

[0117] 2.根据第1项所述的动物,其中所述人源MHC II α 胞外结构域包含人 $\alpha 1$ 和 $\alpha 2$ 结构域。

[0118] 3.根据第1项所述的动物,其中所述核苷酸序列在内源性非人MHC II α 启动子和调控元件的调控下表达。

[0119] 4.根据第1项所述的动物,其中所述人源/非人源嵌合MHC II α 多肽的非人源部分包含内源性非人源MHC II α 多肽的跨膜和胞质结构域。

[0120] 5.根据第1项所述的动物,其中所述人源/非人源嵌合MHC II α 多肽的人源部分来源于人HLA II类蛋白,所述人源HLA II类蛋白选自以下组:HLA-DR、HLA-DQ和HLA-DP。

[0121] 6.根据第5项所述的动物,其中所述人源/非人源嵌合MHC II α 多肽的人源部分来源于人HLA-DR4蛋白。

[0122] 7.根据第1项所述的动物,其中所述动物是啮齿动物。

[0123] 8.根据第7项所述的啮齿动物,其中所述啮齿动物是小鼠。

[0124] 9.根据第1项所述的动物,其中所述动物在内源性MHC IIB基因座进一步包含编码人源/非人源嵌合MHC IIB多肽的核苷酸序列。

[0125] 10.一种非人动物,所述动物在内源性MHC IIB基因座包含编码人源/非人源嵌合MHC IIB多肽的核苷酸序列,

[0126] 其中所述人源/非人源嵌合MHC IIB多肽的人源部分包含人MHC IIB胞外结构域,并且

[0127] 其中所述动物在动物细胞表面表达功能性MHC II复合物。

- [0128] 11. 根据第10项所述的动物,其中所述人MHC II β 胞外结构域包含人 β 1和 β 2结构域。
- [0129] 12. 根据第10项所述的动物,其中所述核苷酸序列在内源性非人MHC II β 启动子和调控元件的调控下表达。
- [0130] 13. 根据第10项所述的动物,其中所述人源/非人源嵌合MHC II β 多肽的非人源部分包含内源性非人MHC II β 多肽的跨膜和胞质结构域。
- [0131] 14. 根据第10项所述的动物,其中所述人源/非人源嵌合MHC II β 多肽的人源部分来源于人HLA II类蛋白,所述人HLA II类蛋白选自以下组:HLA-DR、HLA-DQ和HLA-DP。
- [0132] 15. 根据第14项所述的动物,其中所述人源/非人源嵌合MHC II β 多肽的人源部分来源于人HLA-DR4蛋白。
- [0133] 16. 根据第10项所述的动物,其中所述动物是啮齿动物。
- [0134] 17. 根据第16项所述的啮齿动物,其中所述啮齿动物是小鼠。
- [0135] 18. 根据第10项所述的动物,其中所述动物在内源性MHC II α 基因座进一步包含编码人源/非人源嵌合MHC II α 多肽的核苷酸序列。
- [0136] 19. 一种啮齿动物,所述动物在其内源性MHC II基因的基因座包含编码人源/啮齿动物嵌合MHC II α 多肽的第一核苷酸序列和编码人源/啮齿动物嵌合MHC II β 多肽的第二核苷酸序列,
- [0137] 其中所述嵌合人源/啮齿动物嵌合MHC II α 多肽的人源部分包含人MHC II α 胞外结构域且所述嵌合人源/啮齿动物MHC II β 多肽的人源部分包含人MHC II β 胞外结构域,并且
- [0138] 其中所述嵌合人源/啮齿动物MHC II α 和MHC II β 多肽在啮齿动物细胞表面形成功能性MHC II复合物。
- [0139] 20. 根据第19项所述的啮齿动物,其中所述人MHC II α 胞外结构域包含人 α 1和 α 2结构域。
- [0140] 21. 根据第19项所述的啮齿动物,其中所述人MHC II β 胞外结构域包含人 β 1和 β 2结构域。
- [0141] 22. 根据第19项所述的啮齿动物,其中所述第一核苷酸序列在内源性啮齿动物MHC II α 启动子和调控元件的调控下表达且所述第二核苷酸序列在内源性啮齿动物MHC II β 启动子和调控元件的调控下表达。
- [0142] 23. 根据第19项所述的啮齿动物,其中所述嵌合人源/啮齿动物MHC II α 多肽的啮齿动物部分包含内源性啮齿动物MHC II α 多肽的跨膜和胞质结构域。
- [0143] 24. 根据第19项所述的啮齿动物,其中所述人源/啮齿动物嵌合MHC II β 多肽的啮齿动物部分包含内源性啮齿动物MHC II β 多肽的跨膜和胞质结构域。
- [0144] 25. 根据第19项所述的啮齿动物,其中所述人源/啮齿动物嵌合MHC II α 和 β 多肽的人源部分来源于人HLA II类蛋白,所述人HLA II类蛋白选自以下组:
- [0145] HLA-DR、HLA-DQ和HLA-DP。
- [0146] 26. 根据第25项所述的啮齿动物,其中所述人源/啮齿动物嵌合MHC II α 和 β 多肽的人源部分来源于人HLA-DR4蛋白。
- [0147] 27. 根据第19项所述的啮齿动物,其中所述啮齿动物是小鼠。
- [0148] 28. 根据第27项所述的小鼠,其中所述嵌合MHC II α 和 β 多肽的啮齿动物部分来源

于小鼠H-2E蛋白。

[0149] 29. 根据第19项所述的啮齿动物,其中所述啮齿动物不表达来自其内源性啮齿动物MHC II基因座的功能性内源性MHC II多肽。

[0150] 30. 一种小鼠,所述小鼠在其内源性小鼠MHC II基因座包含编码嵌合人源/小鼠MHC II α 多肽的第一核苷酸序列和编码嵌合人源/小鼠MHC II β 多肽的第二核苷酸序列,

[0151] 其中所述嵌合MHC II α 多肽的人源部分包含来源于人HLA-DR4蛋白 α 多肽的胞外结构域且所述嵌合MHC II β 多肽的人源部分包含来源于人HLA-DR4蛋白 β 多肽的胞外结构域,

[0152] 其中所述嵌合MHC II α 多肽的小鼠部分包含小鼠H-2E α 链的跨膜且胞质结构域和所述嵌合MHC II β 多肽的小鼠部分包含小鼠H-2E β 链的跨膜和胞质结构域,

[0153] 并且其中所述小鼠在小鼠细胞表面表达功能性HLA-DR4/H-2E嵌合MHC II复合物。

[0154] 31. 根据第30项所述的小鼠,其中所述 α 多肽的胞外结构域包含人 α 1和 α 2结构域。

[0155] 32. 根据第30项所述的小鼠,其中所述 β 多肽的胞外结构域包含人 β 1和 β 2结构域。

[0156] 33. 根据第30项所述的小鼠,其中所述第一核苷酸序列在内源性啮齿动物MHC II α 启动子和调控元件的调控下表达和所述第二核苷酸序列在内源性啮齿动物MHC II β 启动子和调控元件的调控下表达。

[0157] 34. 根据第30项所述的小鼠,其中所述小鼠不表达来自其内源性小鼠基因座的功能性内源性MHC II多肽。

[0158] 35. 一种改造小鼠的MHC II基因座以表达嵌合人/小鼠MHC II复合物的方法,所述方法包括在内源性小鼠MHC II基因座用编码人源/小鼠嵌合MHC II复合物的核苷酸序列取代编码小鼠MHC II复合物的核苷酸序列。

[0159] 36. 根据第35项所述的方法,其中所述编码人源/小鼠嵌合MHC II复合物的核苷酸序列包含编码人MHC II α 多肽的胞外结构域和小鼠MHC II α 多肽的胞外结构域的第一核苷酸序列和编码人MHC II β 多肽的胞外结构域和小鼠MHC II β 多肽的跨膜和胞质结构域的第二核苷酸序列。

[0160] 37. 根据第35项所述的方法,其中所述嵌合MHC II复合物的人源部分来源于人HLA II类蛋白,所述人HLA II类蛋白选自以下组:HLA-DR、HLA-DQ和HLA-DP。38. 根据第35项所述的方法,其中所述嵌合MHC II复合物的小鼠部分来源于小鼠H-2E蛋白且所述嵌合MHC II复合物的人源部分来源于人HLA-DR4蛋白。

[0161] 39. 根据第36项所述的方法,其中嵌合MHC II α 和 β 多肽的人源部分来源于人HLA II类蛋白,所述人HLA II类蛋白选自以下组:HLA-DR、HLA-DQ和HLA-DP。40. 根据第36项所述的方法,其中嵌合MHC II α and β 多肽的小鼠部分来源于小鼠H-2E蛋白且嵌合MHC II α and β 多肽的人源部分来源于HLA-DR4蛋白。

[0162] 41. 根据第36项所述的方法,其中所述取代在单个ES细胞中进行,并且将单个ES细胞引入小鼠胚胎中以制备小鼠。

实施例

[0163] 将通过下述的非限制性实施例对本发明进行进一步的说明。列出这些实施例以辅助阐述本发明,但并非旨在并且不应将其解释为以任何方式限制其范围。所述实施例不包括对本领域的普通技术人员公知的常规方法(分子克隆技术等)的具体描述。除非另有明

示,否则份为重量份,分子量是平均分子量,温度以摄氏度表示和压力为处于或接近大气压。

[0164] 实施例1:内源性MHC II类H-2A和H-2E基因座的删除

[0165] 使用 VELOCIGENE® 基因工程技术制备用于引入内源性MHC II类H-2Ab1、H-2Aa、H-2Eb1、H-2Eb2和H-2Ea基因删除的靶向载体(参见例如美国专利号6,586,251和Valenzuela等,如上所述)。对细菌人工染色体(BAC)RP23-458i22(Invitrogen)DNA进行修饰以删除内源性MHC II类基因H-2Ab1、H-2Aa、H-2Eb1、H-2Eb2和H-2Ea。

[0166] 简言之,分别通过对小鼠BAC DNA H-2Ab1基因的5'端和H-2Ea基因的3'端进行PCR获得上游和下游同源臂。如图5所示,这些同源臂通过细菌同源重组(BHR)用于制备删除~79kb的RP23-458i22的表达盒,该删除包括MHC II类基因座的基因H-2Ab1、H-2Aa、H-2Eb1、H-2Eb2和H-2Ea。该区域被由1ox66和1ox71位点翼侧包围的潮霉素表达盒取代。最终的靶向载体从5'至3'包括含有小鼠基因组序列5'至内源性MHC II类基因座的H-2Ab1基因的34kb同源臂、5' 1ox66位点、潮霉素表达盒、3' 1ox71位点和含有小鼠基因组序列3'至内源性MHC II类基因座的H-2Ea基因的63kb同源臂(MAID 5111,见图5)。

[0167] 使用BAC DNA靶向载体(如上文所述)电穿孔小鼠ES细胞以制备包含内源性MHC II类基因座删除的经修饰的ES细胞。通过使用TAQMAN™探针的定量PCR检测鉴定含有内源性MHC II类基因座删除的阳性ES细胞(Lie和Petropoulos (1998) Curr. Opin. Biotechnology 9:43-48)。通过PCR使用引物5111U F (CAGAACGCCAGGCTGTAAC; SEQ ID NO:1)和5111U R (GGAGAGCAGGGTCAGTCAAC; SEQ ID NO:2)以及探针5111U P (CACCGCCACTCACAGCTCCTTACA; SEQ ID NO:3)确证删除基因座的上游区,而使用引物5111D F (GTGGGCACCATCTTCATCATTC; SEQ ID NO:4)和5111D R (CTTCCTTTCCAGGGTGTGACTC; SEQ ID NO:5)以及探针5111D P (AGGCCTGCGATCAGGTGGCACCT; SEQ ID NO:6)确证删除基因座的下游区。使用引物HYGF (TGCGGCCGATCTTAGCC; SEQ ID NO:7)和HYGR (TTGACCGATTCCTTGCGG; SEQ ID NO:8)以及探针HYGP (ACGAGCGGGTTCGGCCCATTC; SEQ ID NO:9)确证靶向载体中存在的潮霉素表达盒。跨上游删除点的核苷酸序列(SEQ ID NO:10)包括下述,其为删除点上游的内源性小鼠序列(包括在下文中的括号内)连续连接到删除点处存在的表达盒序列:(TTTGTAACA AAGTCTACCC AGAGACAGAT GACAGACTTC AGCTCCAATGCTGATTGGTT CCTCACTTGG GACCAACCCT)CTCGAGTACCGTTTCGTATAATGTATGCTAT ACGAAGTTAT ATGCATCCGG GTAGGGGAGG。跨下游删除点的核苷酸序列(SEQ ID NO:11)包括下述,其为与删除点下游的内源性小鼠序列(包括在下文中的括号内)连续地连接的表达盒序列:CCTCGACCTG CAGCCCTAGGATAACTTCGT ATAATGTATGCTATACGAAC GGTAGAGCTC(CACAGGCATTTGGGTGGGCA GGGATGGACG GTGACTGGGA CAATCGGGATGGAAGAGCATAGAATGGGAG TTAGGGAAGA)。然后使用VELOCIMOUSE®法(如下文所述)将阳性ES细胞克隆植入雌性小鼠中以产生含有内源性MHC II类基因座删除的胎仔。

[0168] 使用上文所述的靶向ES细胞作为供体ES细胞并通过VELOCIMOUSE®法引入8-细胞阶段的小鼠胚胎中(参见例如美国专利号7,294,754和Poueymirou等,(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)。使用检测潮霉素表达盒的存在情况并且确证不存在内源性MHC II类序列的改良的等位基因检测(Valenzuela等,同上)对在内源性MHC II类基因座携带H-2Ab1、H-2Aa、

H-2Eb1、H-2Eb2和H-2Ea基因删除的小鼠进行基因型鉴定。

[0169] 可以将在内源性MHC II类基因座H-2Ab1、H-2Aa、H-2Eb1、H-2Eb2和H-2Ea基因删除的小鼠与Cre基因清除小鼠品系交配(参见例如国际专利申请公开号WO 2009/114400)以除去由靶向载体引入的在例如ES细胞阶段或在胚胎中未除去的所有被lox位点包围的潮霉素表达盒。任选地,在小鼠中保留潮霉素表达盒。

[0170] 实施例2:含有人源化H-2Eb1和H-2Ea基因的大型靶向载体(LTVEC)的产生

[0171] 如图4所示设计引入人源化MHC II序列的靶向载体。使用VELOCIGENE®基因工程技术,通过多个步骤修饰细菌人工染色体(BAC)RP23-458i22DNA:(1)制备包含来自BALB/c H-2Ea基因的功能性I-E α 外显子1的载体(图4A);(2)制备包含用人DR β 1*04的外显子2和3取代小鼠I-E β 基因的外显子2和3以及用人DR α 1*01的外显子2和3取代小鼠I-E α 的外显子2和3的载体(图4B);(3)制备载体,其携带人DR β 1*04的外显子2和3以及剩余的小鼠I-E β 外显子,并携带人DR α 1*01的外显子2和3以及剩余的小鼠I-E α 外显子,包括来自BALB/c小鼠的功能性I-E α 外显子1(步骤(1),图4C);以及(4)在步骤(3)得到的载体中除去隐蔽剪接位点(步骤4D)。

[0172] 特别地,因为在C57B1/6小鼠中,非功能性外显子1的存在使得I-E α 基因是假基因,所以首先制备包含来自BALB/c H-2Ea基因的功能性I-E α 外显子1的载体(图4A)。利用细菌同源重组(1.BHR)对RP23-458i22BAC进行修饰以便使用大观霉素取代氯霉素抗性基因。利用BHR对所得到的载体进行进一步修饰以便使用重组位点(2.BHR)翼侧包围的新霉素表达盒取代整个I-A和I-E编码区。使用含有编码BALB/c I-E α 先导序列的外显子(外显子1)及PI-SceI和I-CeuI重组位点翼侧包围的氯霉素基因的构建体中进行另一轮BHR(3.BHR)以便使载体包含功能性BALB/c H-2Ea外显子1。

[0173] 独立地,为了产生包含用人DR β 1*04的外显子2和3取代小鼠I-E β 基因的外显子2和3以及用人DR α 1*01的外显子2和3取代小鼠I-E α 的外显子2和3的载体,通过若干同源重组步骤对RP23-458i22BAC进行修饰,4.BHR-8.BHR(图4B)。将所得到的核酸序列置于PI-SceI/I-CeuI重组位点翼侧包围范围内以使得其连接至携带上文所述的BALB/c I-E α 外显子1的构建体中(图4C)。

[0174] 图4C中所述的最终构建体的序列在BALB/c内含子的3'末端含有隐蔽剪接位点。几个BHR步骤后进行了删除步骤(11.BHR-12.BHR)以获得用于电穿孔至ES细胞的最终靶向载体(MAID 1680)(图4D)。

[0175] 具体为,最终的靶向载体(MAID 1680),从5'至3'包含5'小鼠同源臂,由末端紧邻内源性MHC II类基因座的H-2Ab1基因上游的~26kb小鼠基因组序列组成;含有~59kb插入的人源化MHC II β 链基因(人源化H-2Eb1基因)和人源化MHC II α 链基因(人源化H-2Ea基因)以及被lox位点包围的新霉素表达盒;和3'小鼠同源臂,由起始端紧邻内源性MHC II类基因座的H-2Ea基因下游的~57kb小鼠基因组序列组成。跨5'臂和所述插入之间接头的核苷酸序列(SEQ ID NO:12)包括下述:(TGCTGATTGG TTCCTCACTT GGGACCAACC C)TAAGCTTTA TCTATGTCGG GTGCGGAGAA AGAGGTAATG AAATGGCACA AGGAGATCAC ACACCCAAAC CAAACTCGCC,其中以斜体表示的序列是独特的PI-SceI位点,括号中为5'同源臂中小鼠的基因组序列。跨所述插入和3'臂之间接头的核苷酸序列(SEQ ID NO:13)包括下述:CACATCAGTG AGGCTAGAAT AAATTTAAAT CGCTAATATG AAAATGGGG(ATTTGTACCT CTGAGTGTGA AGGCTGGGAA

GACTGCTTTC AAGGGAC),其中括号中为3'同源臂中小鼠的基因组序列。

[0176] 在所述~59kb插入中,对H-2Eb1基因进行了下述修饰:使H-2Eb1 5136bp的区域,包括内含子1的最后153bp、外显子2、内含子2、外显子3以及内含子3的起始122bp,被3111bp的人HLA-DRB1*04同源区取代,其包括内含子1的最后148bp、外显子2、内含子2、外显子3和内含子3的起始132bp。在内含子3人和小鼠序列的接头处,插入由5' 1ox2372位点、UbC启动子、新霉素抗性基因和3' 1ox2372位点组成的表达盒。所得到的编码嵌合HLA-DRB1*04/H-2Eb1蛋白的基因包括小鼠H-2Eb1先导序列、来自DRB1*04的人β1和β2结构域以及小鼠跨膜结构域和胞质尾。内含子1中的跨小鼠/人接头的核苷酸序列(SEQ ID NO:14)包括下述:(TCCATCACTT CACTGGGTAG CACAGCTGTA ACTGTCCAGC CTG)GGTACCGAGCTCGGATCCAC TAGTAACGGC CGCCAGTGTG CTGGAATTC GCCCTTGATC GAGCTCCCTG GGCTGCAGGT GGTGGGCGTT GCGGGTGGGG CCGGTAA,其中用斜体表示的序列是在克隆步骤中引入的多克隆位点,括号中为小鼠内含子1的序列。跨人内含子3和新霉素表达盒接头的核苷酸序列(SEQ ID NO:15)包括下述:(ATCTCCATCA GAAGGGCACC GGT)ATAACTT CGTATAAGGT ATCCTATACG AAGTTATATG CATGGCCTCC GCGCCGGGT,其中5' 1ox2372位点用斜体表示,括号中为人内含子3序列。跨新霉素表达盒和小鼠内含子3接头的核苷酸序列(SEQ ID NO:16)包括下述:ATAACTTCGT ATAAGGTATC CTATACGAAG TTATCTCGAG (TGGCTTACAG GTAGGTGCGT GAAGCTTCTA CAAGCACAGT TGCCCCCTGG),其中3' 1ox2372位点用斜体表示,括号中为小鼠内含子3序列。

[0177] 亦在所述~59kb插入中,对H-2Ea基因进行了下述修饰:使H-2Ea 1185bp的区域,包括内含子1的最后101bp、外显子2、内含子2、外显子3和内含子3的起始66bp被1189bp的人HLA-DRA1*01同源区取代,其包含内含子1的最后104bp、外显子2、内含子2、外显子3和内含子3的起始66bp。如上文所述,由于C57BL/6H-2Ea等位基因的外显子1含有使该基因不具有功能的缺失,因而用来自BALB/c具有功能的H-2Ea等位基因等量的2616bp区域取代H-2Ea外显子1和剩余的内含子1。所得到的编码嵌合H-2Ea/HLA-DRA1*01蛋白的基因含有来自BALB/c的小鼠H-2Ea先导序列、来自DRA1*01的人α1和α2结构域以及小鼠跨膜结构域和胞质尾。内含子1中的跨小鼠/人接头的核苷酸序列(SEQ ID NO:17)包括下述:(CTGTTTCTTC CCTAACTCCC ATTCTATGCT CTCCATCCC GA)CCGCGGCCCA ATCTCTCTCC ACTACTTCCT GCCTACATGT ATGTAGGT,其中用斜体表示的序列是在克隆步骤中引入的限制性酶位点,括号中为BALB/c内含子1的序列。内含子3中的跨人/小鼠接头的核苷酸序列(SEQ ID NO:18)包括下述:CAAGGTTTCC TCCTATGATG CTTGTGTGAA ACTCGGGGCC GGCC (AGCATTTAAC AGTACAGGA TGGGAGCACA GCTCAC),其中用斜体表示的序列是在克隆步骤中引入的限制性酶位点,括号中为小鼠内含子3序列。外显子1中的跨C57BL/6-BALB/c 5'接头的核苷酸序列(SEQ ID NO:19)包括下述:(GAAAGCAGTC TTCCCAGCCT TCACACTCAG AGGTACAAAT)CCCCATTTTC ATATTAGCGA TTTTAATTTA TTCTAGCCTC,其中括号中为C57BL/6-特异性序列。外显子1中的跨BALB/c-C57BL/6 3'接头的核苷酸序列(SEQ ID NO:20)包括下述:TCTTCCCTAA CTCCCATTCT ATGCTCTTCC ATCCCGA CCG CGG (CCAATC TCTCTCCACT ACTTCCTGCC TACATGTATG),其中SacII限制性位点用斜体表示,括号中为C57BL/6的序列。

[0178] 实施例3:人源化MHC II小鼠的产生

[0179] 使用实施例2所述的载体生产人源化MHC II小鼠的策略示意图见图5和图8。

[0180] 特别地,使用MAID1680 BAC DNA(如上文所述)电穿孔MAID5111ES细胞以制备经修

饰的ES细胞,所述细胞包含内源性小鼠I-A和I-E基因座被含有人源DR4/小鼠I-E嵌合基因座的基因组片段取代。通过使用TAQMAN™探针的定量PCR检测(Lie和Petropoulos,同上)鉴定阳性ES细胞,所述细胞含有删除的内源性I-A和I-E基因座被含有人DR4/小鼠I-E嵌合基因座的基因组片段取代。通过使用引物hDRA1F(CTGGCGGCTTGAAGAATTTGG;SEQ ID NO:21)、hDRA1R(CATGATTTCCAGGTTGGCTTTGTC;SEQ ID NO:22)和探针hDRA1P(CGATTTGCCAGCTTTGAGGCTCAAGG;SEQ ID NO:23)的PCR确证人DR α 序列的插入。通过使用引物hDRB1F(AGGCTTGGGTGCTCCACTTG;SEQ ID NO:24)、hDRB1R(GACCCTGGTGATGCTGGAAAC;SEQ ID NO:25)和探针hDRB1P(CAGGTGTAAACCTCTCCACTCCGAGGA;SEQ ID NO:26)的PCR确证人DR β 序列的插入。使用引物HYGF(TGCGGCCGATCTTAGCC;SEQ ID NO:7)和HYGR(TTGACCGATTCTTGCGG;SEQ ID NO:8)和探针HYGP(ACGAGCGGGTTCGGCCCATTC;SEQ ID NO:9)确证从靶向载体上除去了潮霉素表达盒。

[0181] 然后使用VELOCIMOUSE®法(同上)将阳性ES细胞克隆植入雌性小鼠以产生含有内源性I-A和I-E基因座被人DR4/小鼠I-E嵌合基因座取代的胎仔。使用上文所述的被靶向的ES细胞作为供体细胞并通过VELOCIMOUSE®法引入8细胞阶段的小鼠胚胎。使用检测人源DR4/小鼠I-E嵌合基因座的存在情况的改良的等位基因检测(Valenzuela等,同上)通过基因分型鉴定携带人源DR4/小鼠I-E嵌合基因座的小鼠。

[0182] 可以将携带人源DR4/小鼠I-E嵌合基因座的小鼠与Cre基因清除小鼠品系交配(参见例如国际专利申请公开号WO 2009/114400)以除去由靶向载体引入的在例如ES细胞阶段或在胚胎中未除去的所有被lox位点包围的潮霉素表达盒(参见图6)。

[0183] 实施例4:在基因修饰小鼠中嵌合HLA-DR4的表达

[0184] 使用胶原酶D(罗氏生物科技)对来自野生型或针对人源化HLA-DR4为杂合子的小鼠(“1681HET”)的脾脏进行灌流并使用ACK裂解缓冲液裂解红细胞。使用25微克/mL poly(I:C)培养脾细胞两天以刺激MHC-II基因的表达。使用荧光团偶联的抗CD3(17A2)、抗-CD19(1D3)、抗-CD11c(N418)、抗-F480(BM8)、抗-I-A/I-E(M15)和抗-HLADR(L243)通过FACS分析人HLA-DR4在细胞表面的表达情况。使用BD-LSRII进行流式细胞检测。在CD19+B细胞表面上能够明确检查到人HLA-DR4的表达并且在to11样受体激动剂poly(I:C)的刺激下其显著上调(参见图9)。

[0185] 等同物

[0186] 本领域技术人员将认识到,或者能够使用不超过常规的实验确定本申请所述的发明的特定实施方式的多种等同物。这种等同物旨在包含在下述权利要求中。

[0187] 本申请通篇引用的非专利文件、专利申请和专利的全部内容通过引用整体并入本申请。

序列表

- <110> 瑞泽恩制药公司
- <120> 主要组织相容性复合物基因修饰小鼠
- <130> 1210A-WO
- <140> 待分配
- <141> 同时提交
- <150> 61/552,584
- <151> 2011-10-28
- <160> 26
- <170> FastSEQ Windows 4.0版
- <210> 1
- <211> 19
- <212> DNA
- <213> 人工序列
- <220>
- <223> 合成的
- <400> 1
- cagaacgcca ggctgtaac 19
- <210> 2
- <211> 20
- <212> DNA
- <213> 人工序列
- <220>
- <223> 合成的
- <400> 2
- ggagagcagg gtcagtcaac 20
- <210> 3
- <211> 24
- <212> DNA
- <213> 人工序列
- <220>
- <223> 合成的
- <400> 3
- caccgccaact cacagtcct taca 24
- <210> 4
- <211> 22
- <212> DNA
- <213> 人工序列

<220>
<223> 合成的
<400> 4
gtgggcacca tcttcatcat tc 22
<210> 5
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 5
cttcctttcc aggggtgac tc 22
<210> 6
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 6
aggcctgcga tcaggtggca cct 23
<210> 7
<211> 17
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 7
tgcgccgat cttagcc 17
<210> 8
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 8
ttgaccgatt ccttgcgg 18
<210> 9
<211> 21
<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 9

acgagcgggt tcggcccatt c 21

<210> 10

<211> 140

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 10

tttgtaaaca aagtctacce agagacagat gacagacttc agctccaatg ctgattggtt 60

cctcaacttg gaccaaccct ctcgagtacc gttegtataa tgtatgctat acgaagttat 120

atgcatccgg gtaggggagg 140

<210> 11

<211> 140

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 11

cctcgacctg cagccctagg ataacttcgt ataatgtatg ctatacgaac ggtagagctc 60

cacaggcatt tgggtgggca gggatggacg gtgactggga caatcgggat ggaagagcat 120

agaatgggag ttagggaaga 140

<210> 12

<211> 110

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 12

tgctgattgg ttctcaactt gggaccaacc ctaagcttta tctatgtcgg gtgcggagaa 60

agaggtaatg aaatggcaca aggagatcac acacceaaac caaactcgcc 110

<210> 13

<211> 96

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 13

cacatcagtg aggctagaat aaattaaaat cgctaataatg aaaatgggga tttgtacctc 60
tgagtgtgaa ggctgggaag actgctttca agggac 96

<210> 14

<211> 150

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 14

tccatcaactt cactgggtag cacagetgta actgtccage ctgggtaccg agctcggatc 60
cactagtaac ggccgccagt gtgetggaat tcgcccttga tcgagctccc tgggctgcag 120
gtgggtgggcg ttgcgggtgg ggccggttaa 150

<210> 15

<211> 80

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 15

atctccatca gaagggcacc ggtataactt cgtataaggt atcctatacg aagttatatg 60
catggcctcc gcgccgggtt 80

<210> 16

<211> 90

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 16

ataacttcgt ataaggatc ctatacgaag ttatctcgag tggettacag gtaggtgcgt 60
gaagcttcta caagcacagt tgccccctgg 90

<210> 17

<211> 90

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 17

ctgtttcttc cctaactccc attctatget ctccateccc gaccgcgccc caatctctct 60
ccactacttc ctgcctacat gtatgtaggt 90

<210> 18

<211> 80

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 18

caaggtttcc tcctatgatg cttgtgtgaa actcggggccc ggccagcatt taacagtaca 60
gggatgggag cacagctcac 80

<210> 19

<211> 80

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 19

gaaagcagtc ttcccagcct tcacactcag aggtacaaat ccccatttcc atattagcga 60
ttttaattta ttctagcctc 80

<210> 20

<211> 80

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 20

tcttccctaa ctcccattct atgettctcc atcccagccg cggeccaatc tctctccact 60
acttcctgcc tacatgtatg 80

<210> 21

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 21

ctggcggcctt gaagaatttg g 21

<210> 22

<211> 24

<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 22
catgatttcc aggttggett tgtc 24
<210> 23
<211> 26
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 23
cgatttgcca gctttgagge tcaagg 26
<210> 24
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 24
aggcttgggt gctccacttg 20
<210> 25
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 25
gaccctgggtg atgctggaaa c 21
<210> 26
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 26
caggtgtaaa cctctccact ccgagga 27

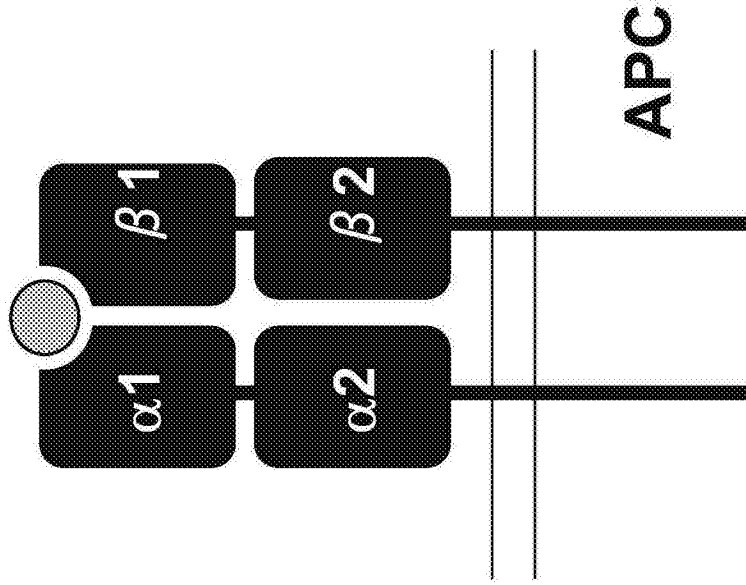


图1

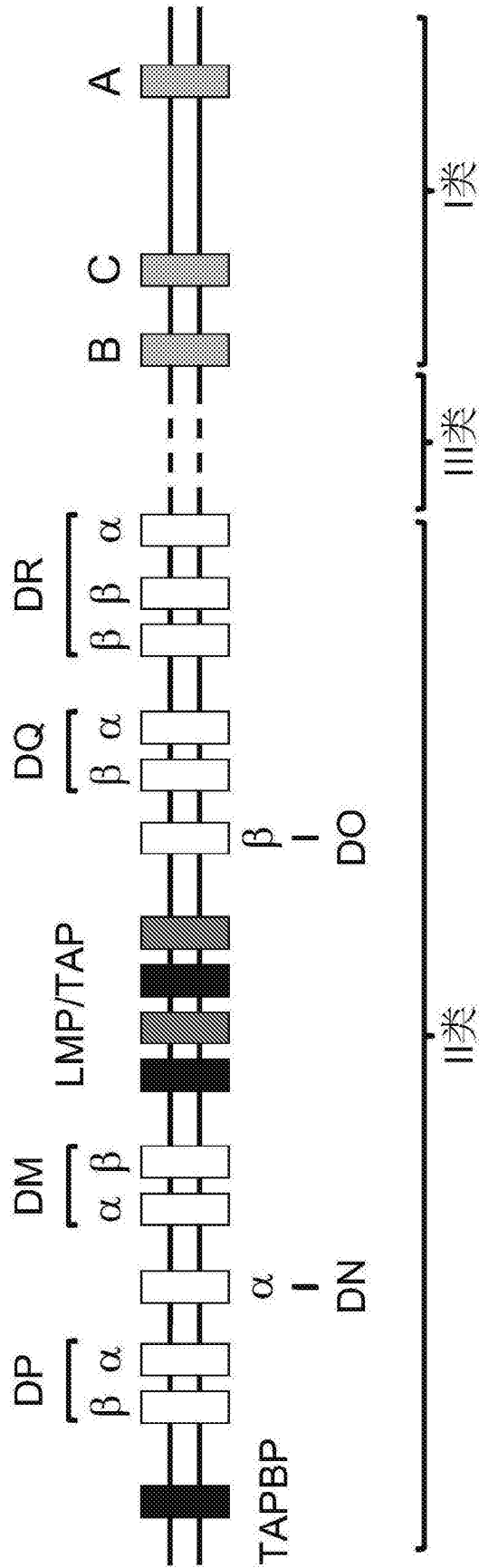


图2

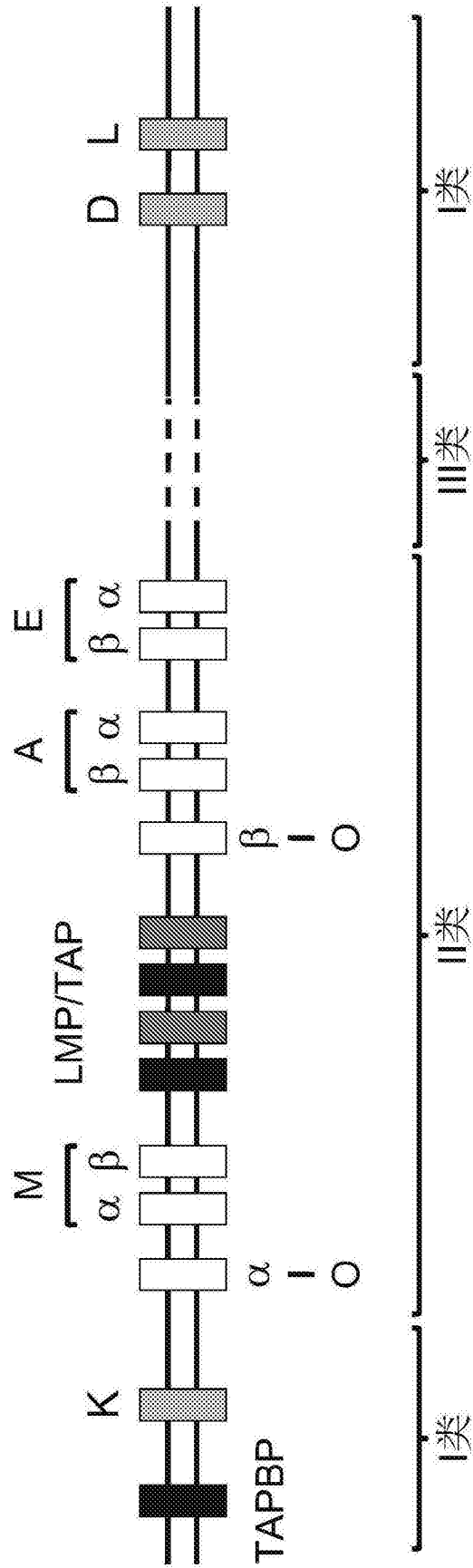


图3

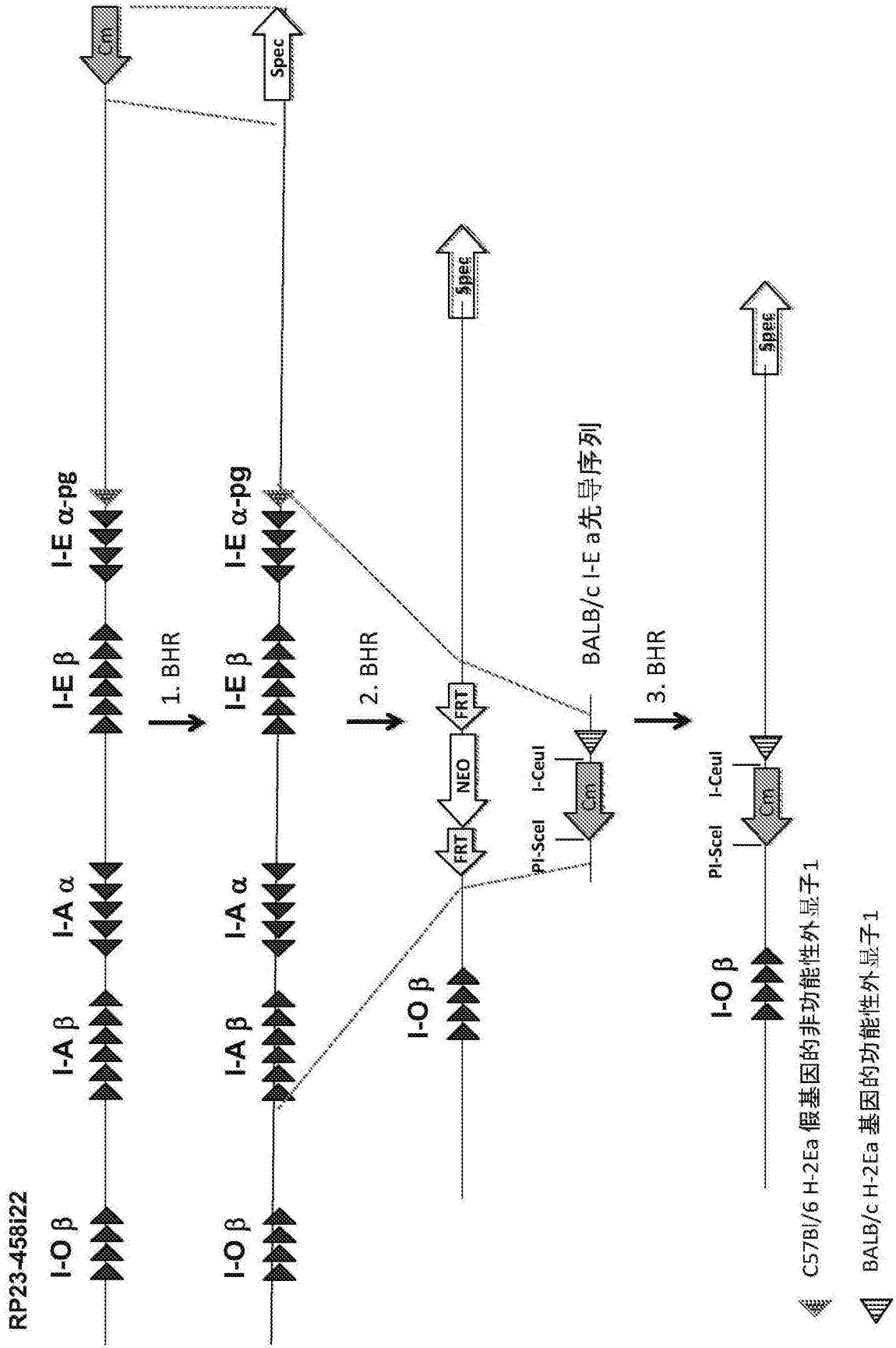


图4A

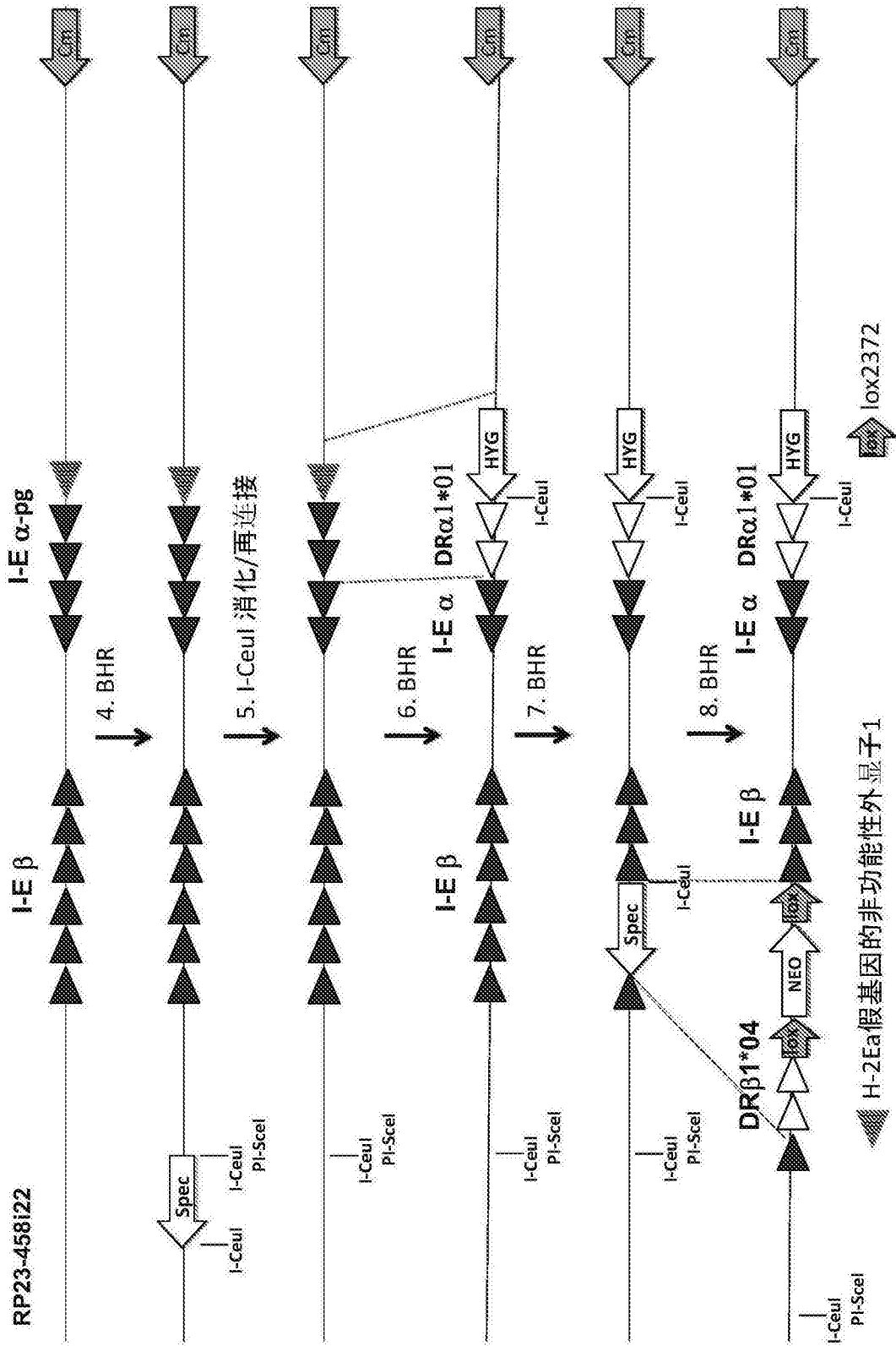


图4B

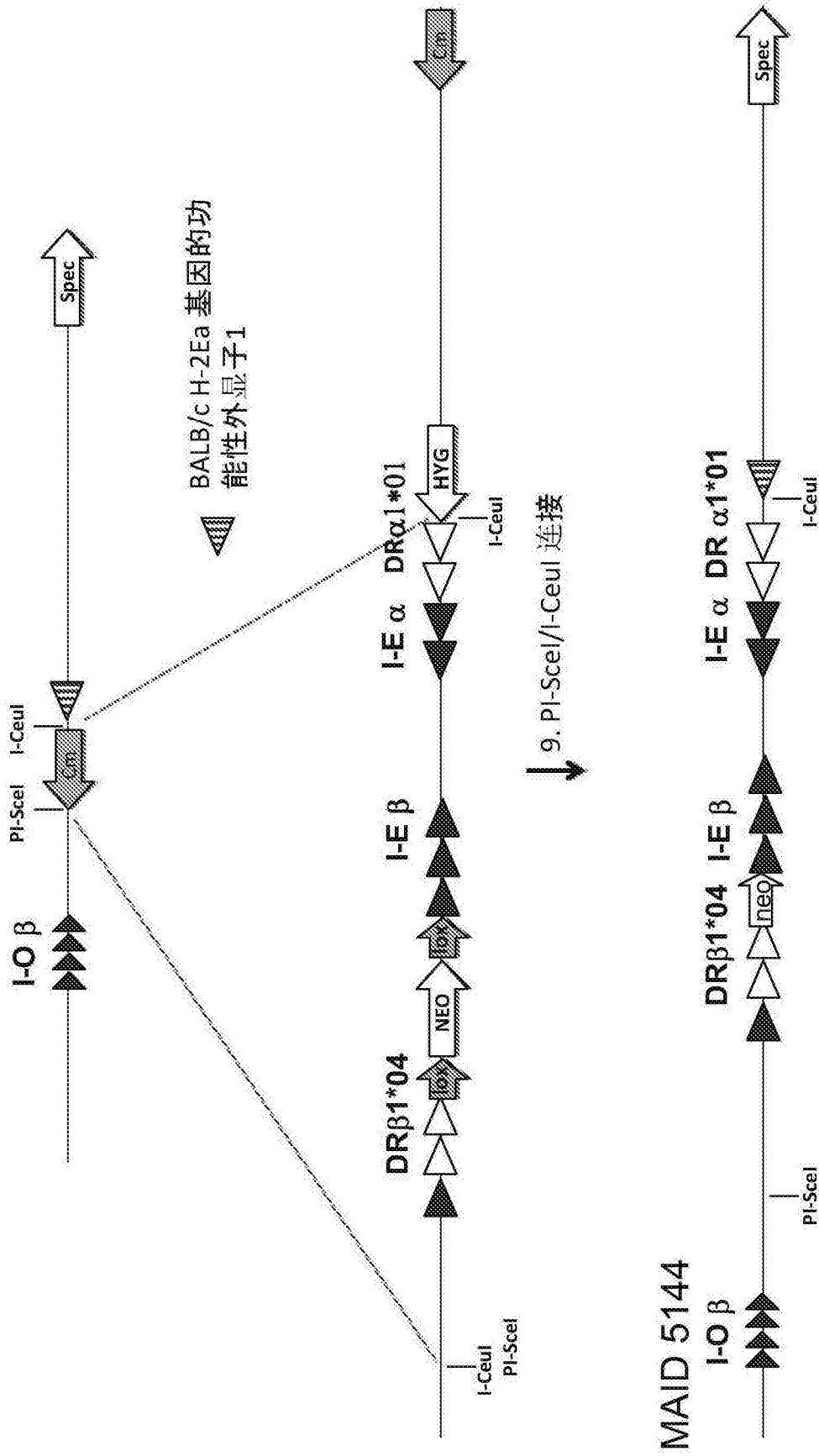


图4C

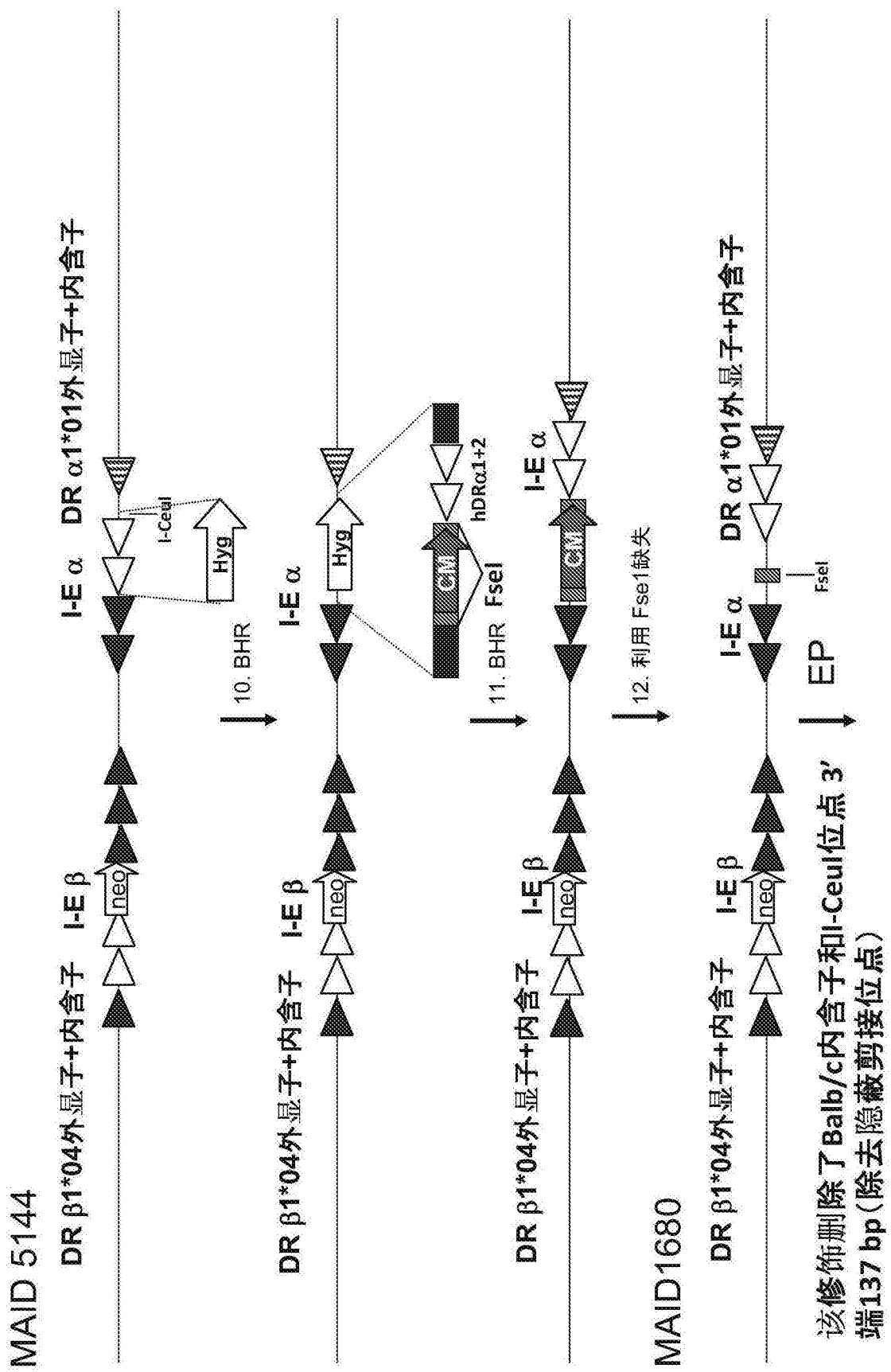


图4D

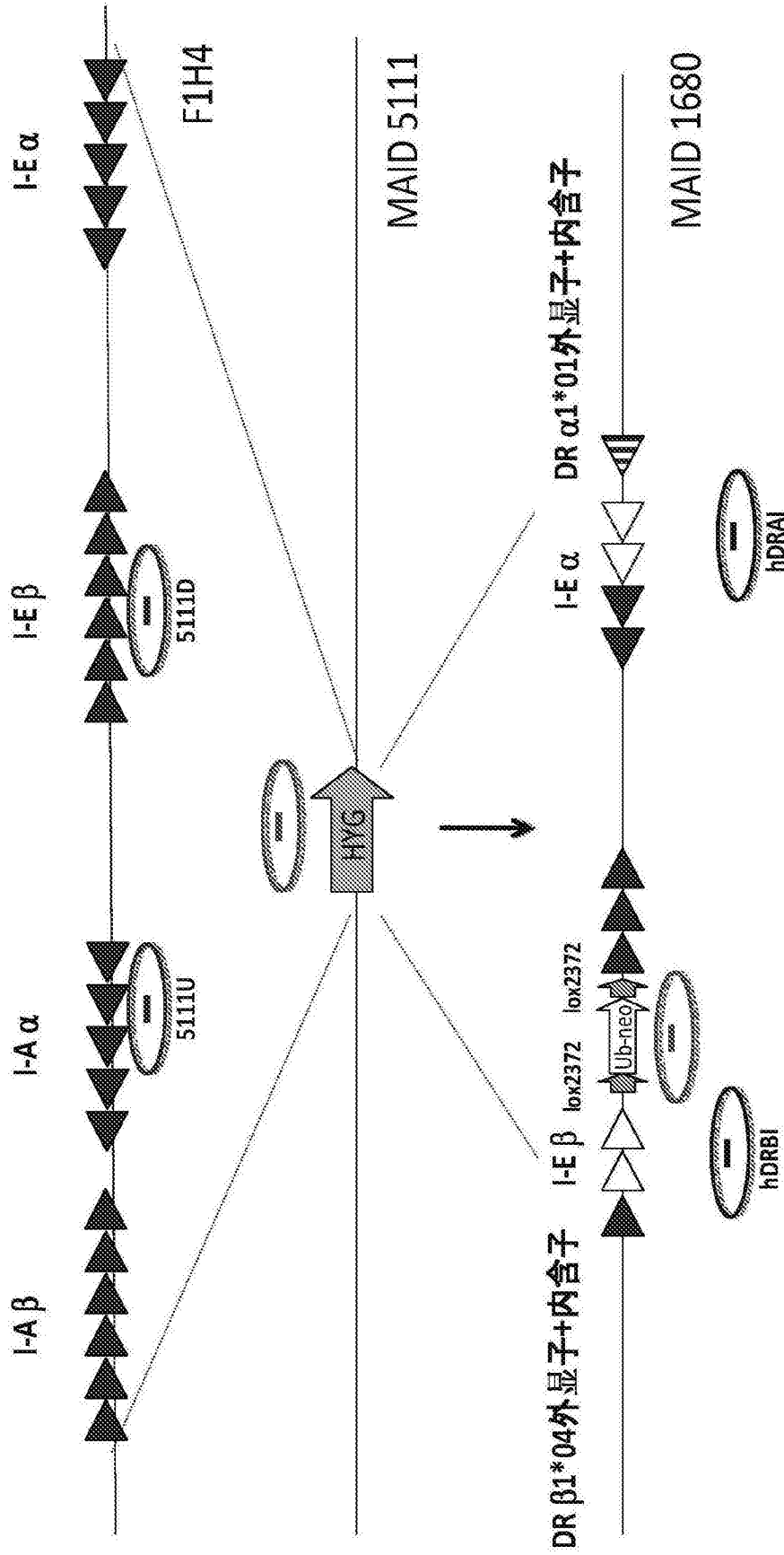


图5

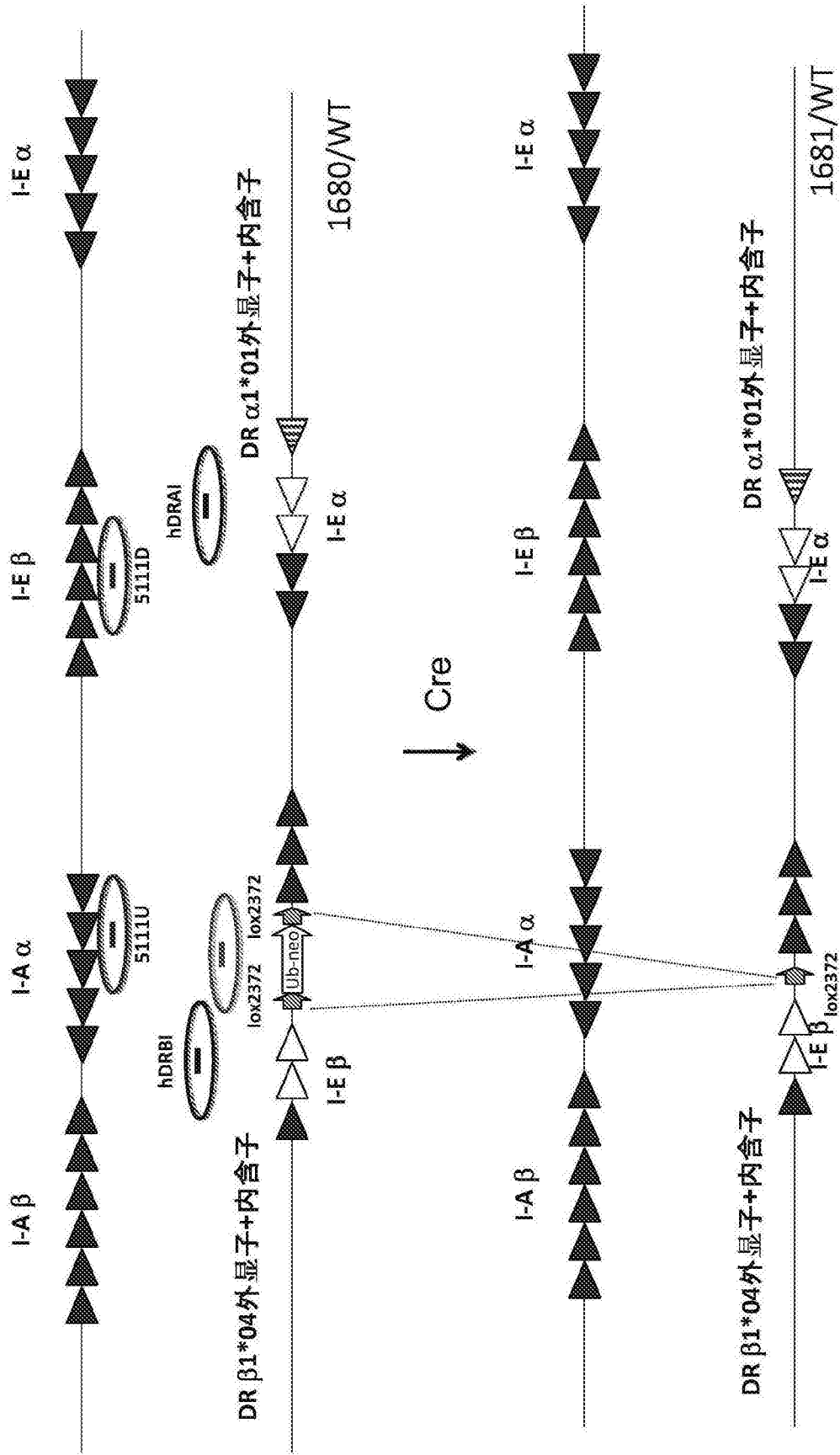


图6

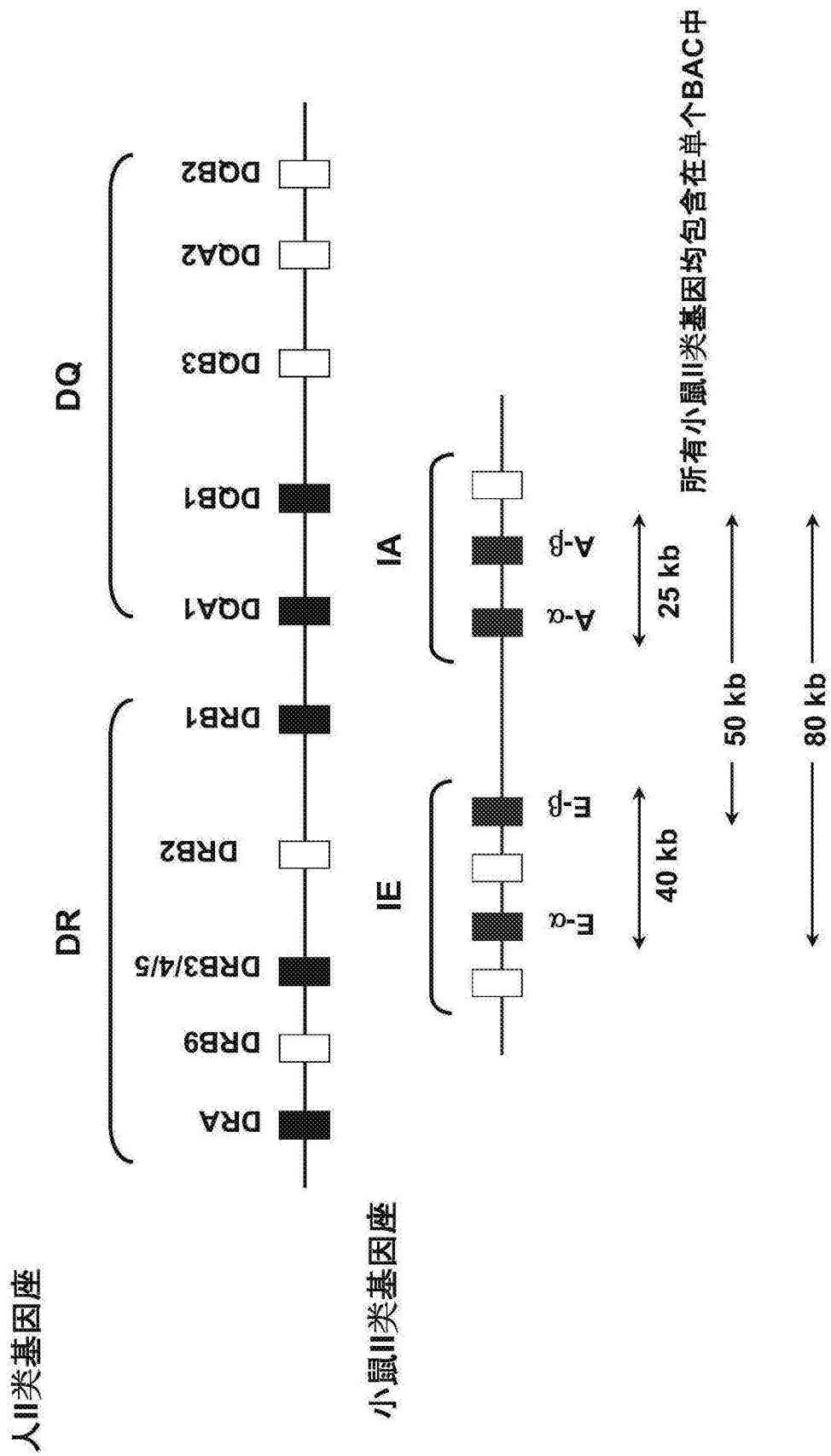


图7

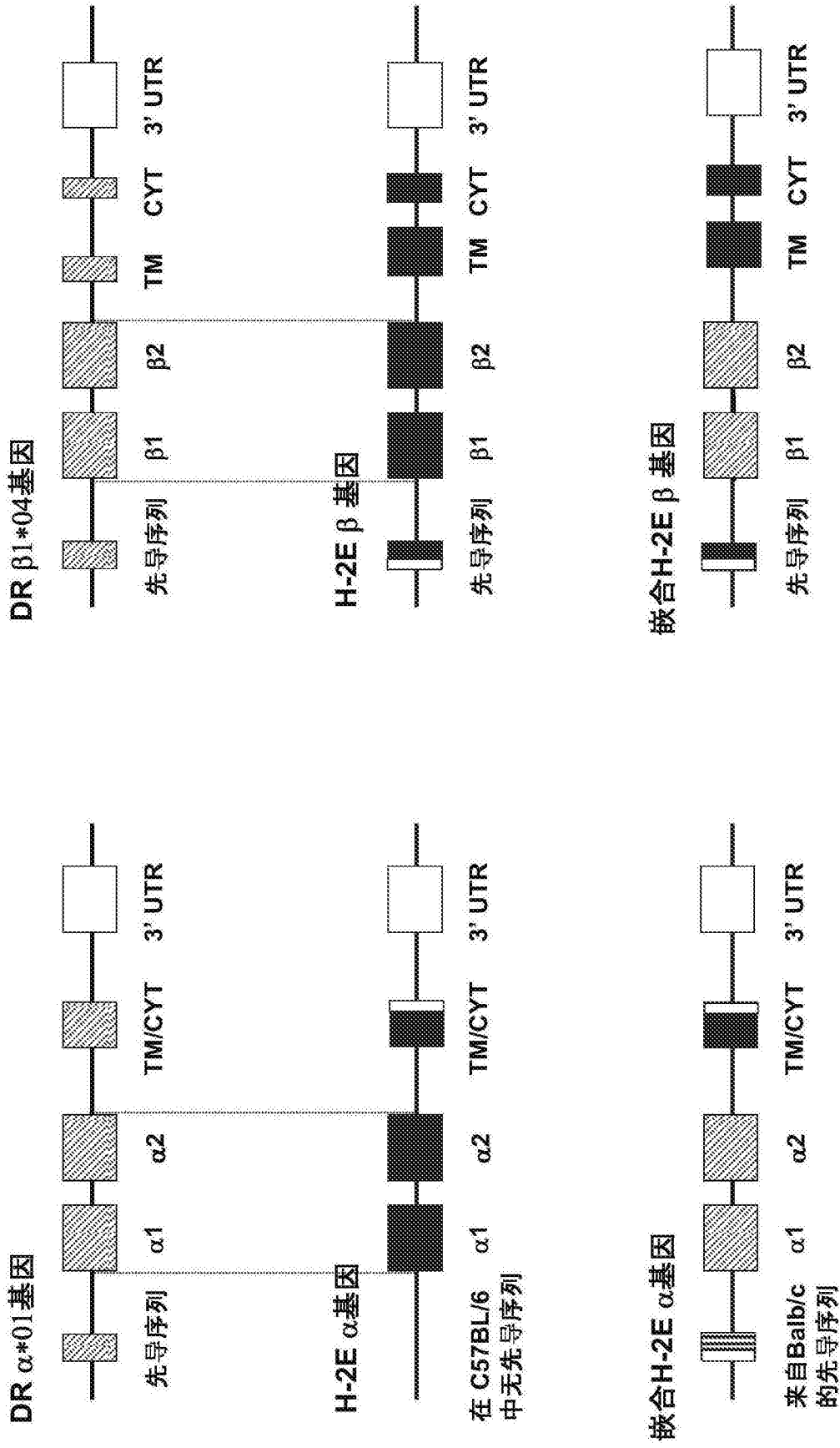


图8

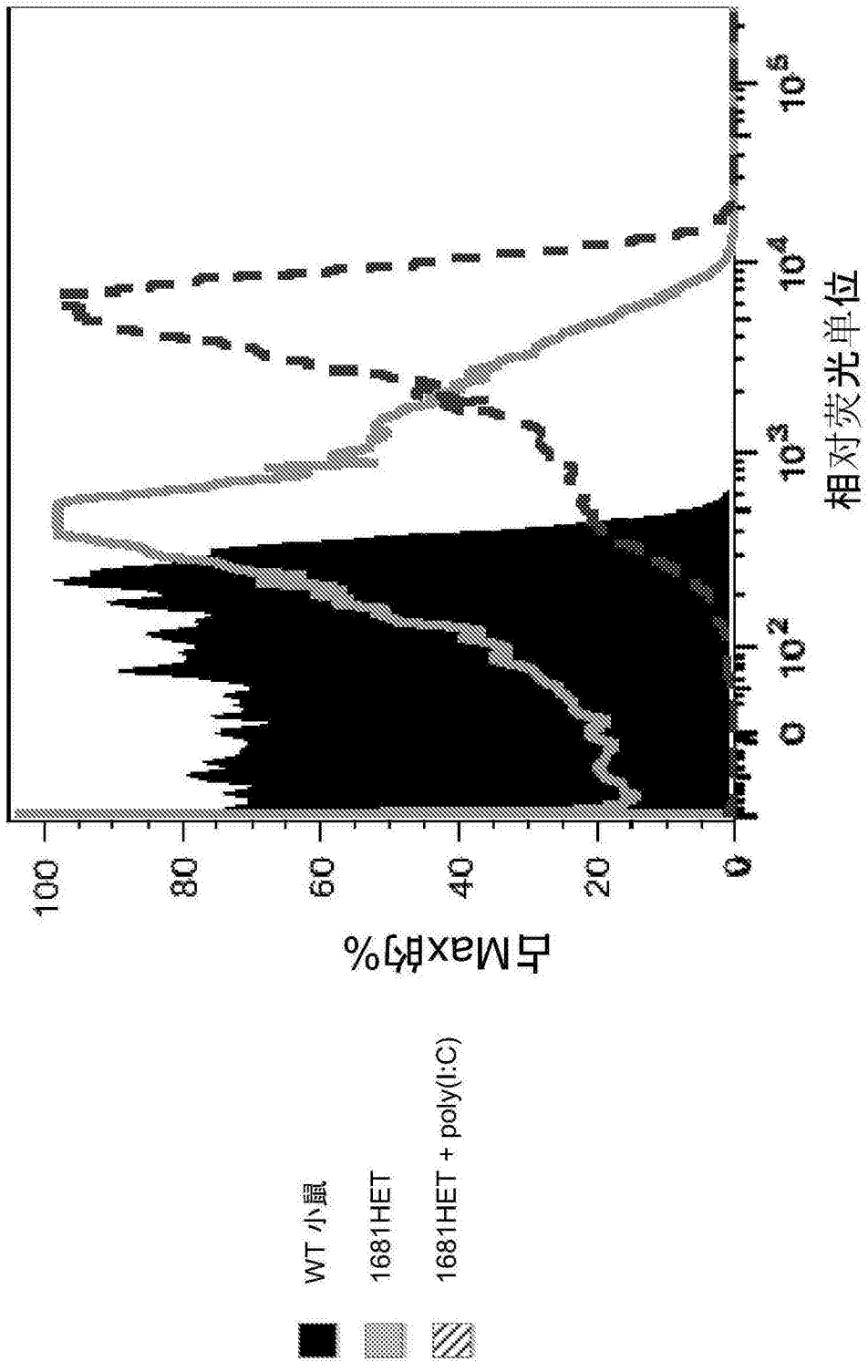


图9