



(51) МПК
A01K 67/027 (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)
C07K 14/725 (2006.01)
C12N 15/12 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)
C12N 15/85 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
C12N 5/16 (2006.01)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

A01K 67/0278 (2020.05); *C07K 14/7051* (2020.05); *C07K 14/70517* (2020.05); *C07K 14/70539* (2020.05)C 2
8
2 6 2
2 7 3 2
RUR U
2 7 3 2 6 2 8
C 2

(21)(22) Заявка: 2017137786, 06.04.2016

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
06.04.2016Дата регистрации:
21.09.2020

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
06.04.2015 US 62/143,687;
08.05.2015 US 62/158,804;
30.06.2015 US 62/186,935

(43) Дата публикации заявки: 08.05.2019 Бюл. № 13

(45) Опубликовано: 21.09.2020 Бюл. № 27

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 07.11.2017(86) Заявка РСТ:
US 2016/026260 (06.04.2016)(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2016/164492 (13.10.2016)Адрес для переписки:
119019, Москва, Гоголевский б-р, 11, этаж 3,
"Гоулинг ВЛГ (Интернэшнл) Инк.", Карпенко
Оксана Юрьевна

(72) Автор(ы):

МАКДОНАЛД Линн (US),
МЕРФИ Эндрю Джей. (US),
ГУРЕР Каган (US),
КИРАТСОУС Кристос (US)

(73) Патентообладатель(и):

РЕГЕНЕРОН ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ,
ИНК. (US)(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: *WO 02059263 A2*, 01.08.2002. *WO*
2013063361 A1, 02.05.2013. *WO 2014164640 A1*,
09.10.2014. *WO 2014130667 A1*, 28.08.2014. *RU*
2425880 C2, 10.08.2011.**(54) ОПОСРЕДОВАННЫЕ ГУМАНИЗИРОВАННЫМИ Т-КЛЕТКАМИ ИММУННЫЕ ОТВЕТЫ У
НЕ ОТНОСЯЩИХСЯ К ЧЕЛОВЕКУ ЖИВОТНЫХ**

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биохимии, в частности к генетически модифицированной мыши для формирования опосредованных Т-клетками иммунных ответов, а также к способу ее получения. Также раскрыты Т-клетка, гибридома и эмбриональная стволовая клетка, полученные из вышеуказанной мыши, а также способ получения белка TCR, который специфичен к антигену и содержит человеческий

вариабельный домен TCR, способ получения человеческого вариабельного домена TCR белка TCR, который специфичен к антигену, а также способ получения последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей человеческий вариабельный домен TCR белка TCR. Изобретение также относится к композиции для оценки гуманизированного Т-клеточного иммунного ответа среди мышиных клеток,

R U 2 7 3 2 6 2 8 C 2

R U 2 7 3 2 6 2 8 C 2

причем композиция содержит первую и вторую клетку вышеуказанной мыши. Изобретение возможно эффективно использовать для

разработки терапевтических средств для человека.
10 н. и 31 з.п. ф-лы, 15 ил., 9 табл., 7 пр.

R U
C 2
8
2 7 3 2 6 2 8
R U

R U
2 7 3 2 6 2 8
C 2

RUSSIAN FEDERATION



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19) RU (11) 2 732 628⁽¹³⁾ C2

(51) Int. Cl.
A01K 67/027 (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)
C07K 14/725 (2006.01)
C12N 15/12 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)
C12N 15/85 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
C12N 5/16 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(52) CPC

A01K 67/0278 (2020.05); *C07K 14/7051* (2020.05); *C07K 14/70517* (2020.05); *C07K 14/70539* (2020.05)

(21)(22) Application: 2017137786, 06.04.2016

(24) Effective date for property rights:
06.04.2016

Registration date:
21.09.2020

Priority:

(30) Convention priority:
06.04.2015 US 62/143,687;
08.05.2015 US 62/158,804;
30.06.2015 US 62/186,935

(43) Application published: 08.05.2019 Bull. № 13

(45) Date of publication: 21.09.2020 Bull. № 27

(85) Commencement of national phase: 07.11.2017

(86) PCT application:
US 2016/026260 (06.04.2016)

(87) PCT publication:
WO 2016/164492 (13.10.2016)

Mail address:

119019, Moskva, Gogolevskij b-r, 11, etazh 3,
"Gouling VLG (Interneshnl) Ink.", Karpenko
Oksana Yurevna

(72) Inventor(s):

MACDONALD, Lynn (US),
MURPHY, Andrew, J. (US),
GURER, Cagan (US),
KYRATSOUS, Christos (US)

(73) Proprietor(s):

REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.
(US)

(54) HUMANIZED T-CELL MEDIATED IMMUNE RESPONSES IN NON-HUMAN ANIMALS

(57) Abstract:

FIELD: biochemistry.

SUBSTANCE: invention relates to a genetically modified mouse to form T-cell mediated immune responses, as well as a method for production thereof. Also disclosed are a T-cell, a hybridoma and an embryonic stem cell derived from said mouse, as well as a method of producing a TCR protein which is antigen-specific and contains a human variable TCR domain, method of producing a human variable TCR domain of a TCR protein which is specific to an antigen,

as well as a method of producing a nucleic acid sequence encoding a human variable TCR domain of the TCR protein. Invention also relates to a composition for evaluating a humanised T-cell immune response among murine cells, wherein the composition comprises a first and a second cell of said mouse.

EFFECT: invention can be effectively used for developing therapeutic agents for humans.

41 cl, 15 dwg, 9 tbl, 7 ex

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА СМЕЖНЫЕ ЗАЯВКИ

Настоящая заявка испрашивает приоритет по предварительным заявкам на патент США №№62/143,687 (подана 6 апреля 2015 г.), 62/158,804 (подана 8 мая 2015 г.) и 62/186,935 (подана 30 июня 2015 г.), причем каждая из заявок полностью включена в

5 настоящий документ путем ссылки.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

Официальная копия перечня последовательностей представлена в электронном виде через EFS-Web в виде файла с перечнем последовательностей в формате ASCII с наименованием 2016-04-06-10145WO01-SEQ-LIST_ST25.txt, созданного 6 апреля 2016

10 г., имеющего размер 56,7 килобайт и поданного одновременно с данным описанием. Перечень последовательностей, содержащийся в данном документе в формате ASCII, является частью спецификации и полностью включен в настоящий документ путем ссылки.

ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

15 Настоящее изобретение относится к не относящимся к человеку животным (например, грызунам, например мышам или крысам), обладающим способностью формировать по существу опосредованные человеческими (гуманизированными) Т-клетками иммунные ответы и экспрессировать: (i) один или более человеческих

20 (гуманизированных) Т-клеточных корецепторов (например, CD4 и/или CD8 (например, CD8 α и/или CD8 β)); (ii) один или более человеческих (гуманизированных) главных комплексов гистосовместимости, которые ассоциируются с одним или более

человеческими (гуманизированными) Т-клеточными корецепторами (например, МНС II (например, МНС I и/или МНС II β), и/или МНС I (например, МНС I α и/или $\beta 2$ -микроглобулин)); и/или (iii) человеческий (гуманизированный) Т-клеточный рецептор

25 (TCR) (например, TCR α и/или TCR β); эмбрионам, тканям, клеткам и/или нуклеиновым кислотам, выделенным из не относящихся к человеку животных; способом получения не относящихся к человеку животных и способом использования не относящихся к человеку животных для разработки терапевтических средств для человека.

ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

30 При адаптивном иммунном ответе инородные антигены распознаются молекулами рецепторов на В-лимфоцитах (например, иммуноглобулинами) и Т-лимфоцитах (например, Т-клеточным рецептором, который также обозначают TCR). Эти инородные антигены представляются на поверхности клеток в виде пептидных фрагментов специализированными белками, которые в общем называют молекулами главного

35 комплекса гистосовместимости (МНС), а конкретно у человека называют человеческим лейкоцитарным антигеном (HLA). В ходе опосредованного Т-клетками ответа антигены, представляемые молекулами МНС, распознаются Т-клеточным рецептором. Однако для эффективного иммунного ответа, помимо распознавания Т-клеточным рецептором комплекса МНС-антigen, требуются дополнительные механизмы. Также необходимо

40 связывание молекулы Т-клеточного корецептора (например, CD4 или CD8) с инвариантным участком МНС.

Т-клетки имеют несколько разновидностей, включая Т-хелперные клетки и цитотоксические Т-клетки. Т-хелперные клетки экспрессируют корецептор CD4 и распознают антигены, связанные с молекулами МНС II. Т-клетки CD4+ активируют 45 другие эффекторные клетки в иммунной системе, например экспрессирующие МНС II В-клетки для продукции антител, экспрессирующие МНС II макрофаги для уничтожения патогенов и т.д. Связывание CD4 и Т-клеточного рецептора с одним и тем же чужеродным антигеном, представленным МНС II, делает Т-клетку гораздо более

восприимчивой к этому антигену.

В противоположность этому цитотоксические Т-клетки (CTL) экспрессируют корецептор CD8 и распознают чужеродные антигены, связанные с молекулами МНС I. CTL специализируются на уничтожении любой клетки, несущей связанный МНС I пептид, распознаваемый их собственным связанным с мембраной TCR. При представлении клеткой пептидов, полученных из отсутствующих в норме клеточных белков (например, имеющих вирусное, опухолевое или другое чужеродное происхождение), такие пептиды распознаются CTL, которые активируются и уничтожают клетку, представляющую пептид. Аналогично CD4 воздействие CD8 делает CTL более восприимчивыми к представленному МНС I антигену.

Не все антигены провоцируют Т-клеточную активацию вследствие механизмов толерантности. Однако при некоторых заболеваниях (например, раке, аутоиммунных заболеваниях) пептиды, полученные из собственных белков, становятся мишенью клеточного компонента иммунной системы, что приводит к разрушению клеток, представляющих такие пептиды. Имели место большие достижения в отношении распознавания клинически значимых антигенов (например, антигенов, ассоциированных с различными типами рака) и/или последовательностей TCR, которые связываются с клинически значимыми антигенами. Однако с целью улучшения идентификации и отбора клинически значимых пептидов, которые будут провоцировать приемлемый ответ в человеческой Т-клетке, и/или TCR, способных связываться с клинически значимыми антигенами (например, для адоптивной иммунотерапии рака, Т-клеточной вакцинации для лечения аутоиммунных заболеваний и т.д.), сохраняется потребность *in vivo* и *in vitro* системах, которые имитируют аспекты человеческой иммунной системы. Таким образом, существует потребность в биологических системах (например, генетически модифицированных не относящихся к человеку животных и клетках), которые способны представлять компоненты человеческой иммунной системы, в частности компоненты Т-клеточного иммунного ответа.

ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Как описано в настоящем документе, тимус генетически модифицированных не относящихся к человеку животных, содержащих по существу гуманизированную Т-клеточную иммунную систему, имеет аналогичные абсолютные количества тимоцитов и Т-клеток CD3+, как у контрольных животных. Кроме того, эти клетки демонстрируют сопоставимое с контрольными животными развитие в одинарные положительные Т-клетки и способны формировать устойчивый человеческий клеточный иммунный ответ на антиген, например вирусный антиген. Человеческий клеточный ответ не относящихся к человеку животных, как правило, включает активированные нечеловеческие Т-клетки, экспрессирующие человеческие или гуманизированные вариабельные домены Т-клеточного рецептора (TCR), которые распознают антиген, представленный в связывающем пептид кармане, образованном внеклеточными доменами человеческого лейкоцитарного антигена (HLA), которые могут быть экспрессированы на поверхности клеток, представляющих нечеловеческий антиген. В некоторых вариантах осуществления по существу гуманизированная Т-клеточная иммунная система содержит:

(А) нечеловеческую Т-клетку, которая экспрессирует:

(i) Т-клеточный корецепторный полипептид, содержащий часть внеклеточного участка или весь внеклеточный участок человеческого Т-клеточного корецептора, например Т-клеточный корецепторный полипептид, содержащий один или более внеклеточных доменов человеческого Т-клеточного корецептора, в результате чего Т-клеточный корецепторный полипептид способен ассоциироваться и/или ассоциируется

с:

(а) одним или более внеклеточными доменами молекулы человеческого или гуманизированного HLA (например, первым внеклеточным доменом человеческого HLA, который представляет собой сайт связывания для Т-клеточного корецепторного полипептида, и/или вторым внеклеточным доменом человеческого HLA, который образует связывающий пептид карман, например с третьим внеклеточным доменом человеческого HLA);

(б) внеклеточным доменом вариабельного домена человеческого или гуманизированного TCR (например, вариабельным доменом человеческого или гуманизированного TCR α и/или вариабельным доменом человеческого или гуманизированного TCR β , который соответственно кодируется по меньшей мере одним сегментом гена вариабельного участка человеческого TCR α и/или TCR β); и/или

(с) внеклеточным доменом константного домена человеческого TCR; и

(ii) Т-клеточный рецептор (TCR), содержащий по меньшей мере вариабельный домен человеческого TCR; и необязательно

(В) представляющую нечеловеческий антиген клетку, которая представляет антиген в связи с человеческим HLA, например представляющую нечеловеческий антиген клетку, которая экспрессирует на своей клеточной поверхности по меньшей мере одну молекулу МНС, которая содержит связывающий пептид карман, образованный двумя

внеклеточными доменами человеческого HLA, и способна активировать и/или активирует нечеловеческую Т-клетку.

В одном аспекте нечеловеческая Т-клетка и представляющая нечеловеческий антиген клетка находятся в одном и том же не относящемся к человеку животном или выделены из него.

Соответственно, в настоящем документе предложены не относящиеся к человеку животные (например, грызуны, например мыши или крысы), созданные методами генной инженерии и экспрессирующие:

(А) человеческий или гуманизированный Т-клеточный корецептор (например, человеческий или гуманизированный CD4 и/или человеческий или гуманизированный CD8 (например, человеческий или гуманизированный CD8 α и/или человеческий или гуманизированный CD8 β));

(Б) человеческий или гуманизированный главный комплекс гистосовместимости, который ассоциируется с человеческим или гуманизированным Т-клеточным корецептором (например, человеческим или гуманизированным МНС II (например, человеческим или гуманизированным МНС II α и/или человеческим или гуманизированным МНС II β), который связывается с человеческим или гуманизированным CD4 и/или человеческим или гуманизированным МНС I (например, человеческим или гуманизированным МНС I α и необязательно человеческим или гуманизированным β 2-микроглобулином), который связывается с человеческим или гуманизированным CD8); и/или

(С) человеческий или гуманизированный Т-клеточный рецептор (TCR);
а также эмбрионы, ткани и клетки, экспрессирующие их, и нуклеиновые кислоты, кодирующие вышеуперечисленное. Также предложены способы получения и использования описанных не относящихся к человеку животных.

В одном аспекте предложено генетически модифицированное не относящееся к человеку животное, содержащее:

(А) гуманизированный корецептор CD4 и/или гуманизированный корецептор CD8, содержащий гуманизированный полипептид CD8 α и гуманизированный полипептид

CD8 β (например, не относящееся к человеку животное содержит, например, в своем геноме зародышевой линии, первую нуклеотидную последовательность, кодирующую химерный человеческий/нечеловеческий полипептид CD4, и/или вторую нуклеотидную последовательность, кодирующую химерный человеческий/нечеловеческий полипептид CD8 α , и третью нуклеотидную последовательность, кодирующую химерный человеческий/нечеловеческий полипептид CD8 β),

причем каждый гуманизированный Т-клеточный корецепторный полипептид содержит по меньшей мере трансмембранный и цитоплазматический домены нечеловеческого Т-клеточного корецептора, например, в котором гуманизированный корецептор CD4 содержит по меньшей мере трансмембранный и цитоплазматический домены нечеловеческого корецептора CD4 и/или гуманизированный корецептор CD8 содержит по меньшей мере трансмембранный и цитоплазматический домены полипептидов нечеловеческого CD8 α и нечеловеческого CD8 β ,

при этом каждый химерный Т-клеточный корецепторный полипептид содержит

часть внеклеточного участка или весь внеклеточный участок человеческого Т-клеточного корецептора, например один или более внеклеточных доменов человеческого Т-клеточного корецептора, например по меньшей мере внеклеточный домен человеческого Т-клеточного корецептора, который ассоциируется с молекулой HLA, например, в котором гуманизированный корецептор CD4 содержит внеклеточный участок (или его части, например внеклеточный (-ые) домен (-ы)) человеческого CD4, который ответственен за взаимодействие с МНС II, вариабельные домены Т-клеточного рецептора, константные домены Т-клеточного рецептора или их комбинацию, и/или, например, в котором гуманизированный корецептор CD8 содержит внеклеточные участки (или их части, например внеклеточные домены) человеческого CD8 α и человеческого CD8 β , которые ответственны за взаимодействие с МНС I, вариабельные домены Т-клеточного рецептора, константные домены Т-клеточного рецептора или их комбинацию;

(В) человеческий (гуманизированный) TCR (например, не относящееся к человеку животное содержит, например, в своем геноме зародышевой линии, неперестроенный вариабельный локус гена Т-клеточного рецептора (TCR) α , содержащий по меньшей мере один человеческий сегмент V α и по меньшей мере один человеческий сегмент J α , функционально связанный с нечеловеческой константной последовательностью гена TCR α , и/или неперестроенный вариабельный локус гена TCR β , содержащий по меньшей мере один человеческий сегмент V β , по меньшей мере один человеческий сегмент D β и по меньшей мере один человеческий сегмент J β , функционально связанный с нечеловеческой константной последовательностью гена TCR β); и необязательно

(С) человеческий (гуманизированный) комплекс МНС II, который ассоциируется с гуманизированным корецептором CD4, и/или человеческий (гуманизированный) комплекс МНС I, который ассоциируется с гуманизированным корецептором CD8 (например, не относящееся к человеку животное содержит, например, в своем геноме зародышевой линии, первую последовательность нуклеиновых кислот, кодирующую химерный человеческий/нечеловеческий полипептид МНС II α , и вторую последовательность нуклеиновых кислот, кодирующую химерный человеческий/нечеловеческий полипептид МНС II β , и/или третью последовательность нуклеиновых кислот, кодирующую химерный человеческий/нечеловеческий полипептид МНС I),

при этом каждый химерный полипептид МНС содержит по меньшей мере внеклеточный участок (или его часть) человеческого полипептида МНС (например, полипептида HLA), который либо сам по себе (например, МНС I), либо в комплексе с

другим химерным полипептидом МНС (например, МНС II α и МНС II β) соответственно способен ассоциироваться с человеческим (гуманизированным) корецептором CD8 или человеческим (гуманизированным) корецептором CD4 и представлять пептид в связи с HLA, например, в котором гуманизированный комплекс МНС II содержит: (i)

- 5 химерный человеческий/нечеловеческий полипептид МНС II α , содержащий α_1 и α_2 домены человеческого полипептида HLA класса II α и трансмембранный и цитоплазматический домены нечеловеческого полипептида HLA класса II α ; и (ii) химерный человеческий/нечеловеческий полипептид МНС II β , содержащий β_1 и β_2 домены человеческого полипептида HLA класса II β и трансмембранный и
- 10 цитоплазматический домены нечеловеческого полипептида HLA класса II β , и/или в котором гуманизированный комплекс МНС I содержит α_1 , α_2 и α_3 домены человеческого полипептида МНС I, и необязательно человеческий (гуманизированный) β_2 микроглобулин.

В некоторых вариантах осуществления не относящееся к человеку животное содержит:

- 15 (A) гуманизированный корецептор CD4 и гуманизированный корецептор CD8, содержащие гуманизированный полипептид CD8 α или гуманизированный полипептид CD8 β (например, не относящееся к человеку животное содержит, например, в своем геноме зародышевой линии, первую нуклеотидную последовательность, кодирующую химерный человеческий/нечеловеческий полипептид CD4, вторую нуклеотидную
- 20 последовательность, кодирующую химерный человеческий/нечеловеческий полипептид CD8 α , и третью нуклеотидную последовательность, кодирующую химерный человеческий/нечеловеческий полипептид CD8 β),
причем каждый гуманизированный Т-клеточный корецепторный полипептид содержит по меньшей мере трансмембранный и цитоплазматический домены
- 25 нечеловеческого Т-клеточного корецептора, например, в котором гуманизированный корецептор CD4 содержит по меньшей мере трансмембранный и цитоплазматический домены нечеловеческого корецептора CD4, а гуманизированный корецептор CD8 содержит по меньшей мере трансмембранный и цитоплазматический домены полипептидов нечеловеческого CD8 α и нечеловеческого CD8 β ,
- 30 при этом каждый химерный Т-клеточный корецепторный полипептид содержит часть внеклеточного участка или весь внеклеточный участок человеческого Т-клеточного корецептора, например один или более внеклеточных доменов человеческого Т-клеточного корецептора, например по меньшей мере внеклеточный домен человеческого Т-клеточного корецептора, который ассоциируется с молекулой HLA,
- 35 например, в котором гуманизированный корецептор CD4 содержит внеклеточный участок (или его части, например внеклеточный (-ые) домен (-ы)) человеческого CD4, который ответственен за взаимодействие с МНС II, вариабельные домены Т-клеточного рецептора, константные домены Т-клеточного рецептора или их комбинацию, и/или, например, в котором гуманизированный корецептор CD8 содержит внеклеточные
- 40 участки (или их части, например внеклеточные домены) человеческого CD8 α и человеческого CD8 β , которые ответственны за взаимодействие с МНС I, вариабельные домены Т-клеточного рецептора, константные домены Т-клеточного рецептора или их комбинацию;
- (B) гуманизированный TCR (например, не относящееся к человеку животное содержит, 45 например, в своем геноме зародышевой линии, неперестроенный вариабельный локус гена Т-клеточного рецептора (TCR) α , содержащий по меньшей мере один человеческий сегмент V α и по меньшей мере один человеческий сегмент J α , функционально связанный с нечеловеческой константной последовательностью гена TCR α , и/или неперестроенный

вариабельный локус гена TCR β , содержащий по меньшей мере один человеческий сегмент V β , по меньшей мере один человеческий сегмент D β и по меньшей мере один человеческий сегмент J β , функционально связанный с нечеловеческой константной последовательностью гена TCR β); и

- 5 (С) гуманизированный комплекс МНС II, который ассоциируется с гуманизированным корецептором CD4, и гуманизированный комплекс МНС I, который ассоциируется с гуманизированным корецептором CD8 (например, не относящееся к человеку животное содержит, например, в своем геноме зародышевой линии, первую последовательность нуклеиновых кислот, кодирующую химерный человеческий/нечеловеческий полипептид
- 10 МНС II α , вторую последовательность нуклеиновых кислот, кодирующую химерный человеческий/нечеловеческий полипептид МНС II β , и третью последовательность нуклеиновых кислот, кодирующую химерный человеческий/нечеловеческий полипептид МНС I),
- 15 при этом каждый химерный полипептид МНС содержит по меньшей мере внеклеточный участок (или его часть) человеческого полипептида МНС (например, полипептида HLA), который либо сам по себе (например, МНС I), либо в комплексе с другим химерным полипептидом МНС (например, МНС II α и МНС II β) соответственно способен ассоциироваться с гуманизированным корецептором CD8 или
- 20 гуманизированным корецептором CD4 и представлять пептид в случае HLA, например, в котором гуманизированный комплекс МНС II содержит: (i) химерный человеческий/нечеловеческий полипептид МНС II α , содержащий α 1 и α 2 домены человеческого полипептида HLA класса II α и трансмембранный и цитоплазматический домены нечеловеческого полипептида HLA класса II α ; и (ii) химерный человеческий/нечеловеческий полипептид МНС II β , содержащий β 1 и β 2 домены человеческого
- 25 полипептида HLA класса II β и трансмембранный и цитоплазматический домены нечеловеческого полипептида HLA класса II β ; и (iii) гуманизированный комплекс МНС I содержит α 1, α 2 и α 3 домены человеческого полипептида МНС I и необязательно человеческий (гуманизированный) β 2 микроглобулин (например, не относящееся к человеку животное дополнительно содержит локус β 2 микроглобулина, кодирующий
- 30 полипептид, содержащий аминокислотную последовательность человеческого β 2 микроглобулина или ее часть).

В некоторых вариантах осуществления первая нуклеотидная последовательность, кодирующая химерный полипептид Т-клеточного корецептора CD4, находится в эндогенном локусе Т-клеточного корецептора CD4 и/или вторая нуклеотидная последовательность, кодирующая химерный полипептид Т-клеточного корецептора CD8 α , находится в эндогенном локусе Т-клеточного корецептора CD8 α , а третья нуклеотидная последовательность, кодирующая химерный полипептид Т-клеточного корецептора CD8 β , находится в эндогенном локусе Т-клеточного корецептора CD8 β . Дополнительные варианты осуществления включают химерный человеческий/нечеловеческий полипептид CD4, кодируемый геном, изображенным на ФИГ. 5А (например, в котором человеческий участок полученного химерного человеческого/нечеловеческого полипептида Т-клеточного корецептора CD4 содержит по меньшей мере домены человеческого Ig1, человеческого Ig2 и человеческого Ig3, также соответственно называемые доменами D1, D2 и D3), и/или химерный корецептор CD8, 40 кодируемый генами, изображенными на ФИГ. 5В (например, в котором человеческий участок химерного корецептора CD8 содержит весь или по существу весь внеклеточный участок человеческого полипептида CD8 (например, CD8 α и/или CD8 β), включая подобные человеческому иммуноглобулину V (IgV) домены α и β . В некоторых

вариантах осуществления человеческий участок химерного полипептида Т-клеточного корецептора CD4 содержит один или более внеклеточных доменов человеческого полипептида CD4 (например, D1, D2, D3, D4 или любую их комбинацию), а нечеловеческий участок химерного полипептида Т-клеточного корецептора CD4

- 5 содержит трансмембранный и цитоплазматический домены нечеловеческого Т-клеточного корецептора CD4, человеческий участок химерного полипептида CD8 α содержит внеклеточный домен (например, IgV-подобный домен) человеческого полипептида CD8 α , а нечеловеческий участок химерного полипептида CD8 α содержит трансмембранный и цитоплазматический домены нечеловеческого полипептида CD8 α ,
- 10 и/или человеческий участок химерного полипептида CD8 β содержит внеклеточный домен (например, IgV-подобный домен) человеческого полипептида CD8 β , а нечеловеческий участок химерного полипептида Т-клеточного корецептора CD8 β содержит трансмембранный и цитоплазматический домены нечеловеческого полипептида CD8 β .

- 15 В некоторых вариантах осуществления первая последовательность нуклеиновых кислот, кодирующая человеческий (гуманизированный) МНС II α , находится в эндогенном нечеловеческом локусе МНС II α , вторая последовательность нуклеиновых кислот, кодирующая человеческий (гуманизированный) МНС II β , находится в эндогенном нечеловеческом локусе МНС II β и/или третья последовательность
- 20 нуклеиновых кислот, кодирующая человеческий (гуманизированный) МНС I, находится в эндогенном нечеловеческом локусе МНС I. В одном аспекте человеческий (гуманизированный) полипептид МНС II α содержит внеклеточный участок (или его часть) человеческого полипептида МНС II α (например, полипептида HLA класса II α), человеческий (гуманизированный) полипептид МНС II β содержит внеклеточный участок
- 25 (или его часть) человеческого полипептида МНС II β (например, полипептида HLA класса II β) и/или человеческий (гуманизированный) полипептид МНС I содержит внеклеточный участок (или его часть) человеческого полипептида МНС I (например, полипептида HLA класса I). В некоторых вариантах осуществления гуманизированный полипептид МНС II α содержит человеческие домены МНС II $\alpha 1$ и $\alpha 2$, гуманизированный полипептид МНС II β содержит человеческие домены МНС II $\beta 1$ и $\beta 2$ и/или
- 30 гуманизированный полипептид МНС I содержит человеческие домены МНС I $\alpha 1$, $\alpha 2$ и $\alpha 3$. В некоторых вариантах осуществления первая последовательность нуклеиновых кислот, кодирующая химерный человеческий/нечеловеческий полипептид МНС II α , экспрессируется под регуляторным контролем эндогенных нечеловеческих промоторных
- 35 и регуляторных элементов МНС II α , вторая последовательность нуклеиновых кислот, кодирующая химерный человеческий/нечеловеческий полипептид МНС II β , экспрессируется под регуляторным контролем эндогенных нечеловеческих промоторных и регуляторных элементов МНС II β и/или третья последовательность нуклеиновых кислот, кодирующая химерный человеческий/нечеловеческий полипептид МНС I,
- 40 экспрессируется под регуляторным контролем эндогенных нечеловеческих промоторных и регуляторных элементов МНС I. В дополнительных вариантах осуществления нечеловеческий участок химерного человеческого/нечеловеческого полипептида МНС II α содержит трансмембранный и цитоплазматический домены эндогенного нечеловеческого полипептида МНС II α , нечеловеческий участок химерного
- 45 человеческого/нечеловеческого полипептида МНС II β содержит трансмембранный и цитоплазматический домены эндогенного нечеловеческого полипептида МНС II β и/или нечеловеческий участок химерного человеческого/нечеловеческого полипептида МНС I содержит трансмембранный и цитоплазматический домены эндогенного

нечеловеческого полипептида МНС I. Варианты осуществления включают не относящихся к человеку животных, у которых человеческий участок белков химерного человеческого/нечеловеческого комплекса МНС II получен из соответствующих человеческих белков HLA класса II, выбранных из группы, состоящей из HLA-DR, HLA-DQ и HLA-DP, и/или у которых человеческий участок третьего химерного человеческого/нечеловеческого полипептида МНС I получен из человеческого HLA-A, человеческого HLA-B или человеческого HLA-C. В качестве не имеющих ограничительного характера примеров в некоторых вариантах осуществления химерный полипептид МНС II α содержит внеклеточный участок (или его часть) белка HLA-DR α , белка HLA-DQ α или белка HLA-DP α, химерный полипептид МНС II β содержит внеклеточный участок (или его часть) белка HLA-DR β , белка HLA-DQ β или белка HLA-DP β, и/или химерный полипептид МНС I содержит внеклеточный участок (или его часть) человеческого белка HLA-A, человеческого белка HLA-B или человеческого белка HLA-C. Также предложены не относящиеся к человеку животные, у которых человеческий участок белков химерного человеческого/нечеловеческого комплекса МНС II, полученный из соответствующих человеческих белков HLA-DR, например человеческий участок человеческого/нечеловеческого полипептида МНС II α, содержит домены α1 и α2 цепи α HLA-DR2, а человеческий участок человеческого/нечеловеческого полипептида МНС II β содержит домены β1 и β2 цепи β HLA-DR2, и/или у которых человеческий участок полипептида МНС I получен из человеческого полипептида HLA-A, например, человеческий участок человеческого/нечеловеческого полипептида МНС I содержит домены α1, α2 и α3 человеческого полипептида HLA-A2, например домены α1, α2 и α3 человеческого полипептида HLA-A2.1. Также предложены не относящиеся к человеку животные, у которых нечеловеческие участки комплекса МНС II получены из мышиной кодирующей последовательности H-2E и/или у которых нечеловеческие участки полипептида МНС I получены из мышной кодирующей последовательности H-2K. Например, химерный полипептид МНС II α содержит трансмембранный и цитоплазматический домены мышного полипептида H-2E α, химерный полипептид МНС II β содержит трансмембранный и цитоплазматический домены мышного полипептида H-2E β, а химерный полипептид МНС I содержит трансмембранный и цитоплазматический домены мышного полипептида H-2K.

В некоторых вариантах осуществления неперестроенный вариабельный локус гена TCR α находится в эндогенном вариабельном локусе гена TCR α , а неперестроенный вариабельный локус гена TCR β находится в эндогенном вариабельном локусе гена TCR β . В некоторых аспектах неперестроенный вариабельный локус гена TCR α содержит полный набор человеческих неперестроенных сегментов гена V α и полный набор человеческих неперестроенных сегментов гена J α и/или неперестроенный вариабельный локус гена TCR β содержит полный набор человеческих неперестроенных сегментов гена V β , полный набор человеческих неперестроенных сегментов гена D β и полный набор человеческих неперестроенных сегментов гена J β . В некоторых вариантах осуществления человеческие неперестроенные сегменты гена V α и J α перестраиваются с образованием перестроенной человеческой последовательности V α /J α и/или человеческие неперестроенные сегменты гена V β , D β и J β перестраиваются с образованием перестроенной человеческой последовательности V β /D β /J β . В некоторых вариантах осуществления не относящееся к человеку животное, описанное в настоящем документе, экспрессирует Т-клеточный рецептор, содержащий человеческий вариабельный участок TCR α и/или человеческий вариабельный участок TCR β на поверхности Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления эндогенные

нечеловеческие сегменты $V\alpha$ и $J\alpha$ неспособны перестраиваться с образованием перестроенной последовательности $V\alpha/J\alpha$ и/или эндогенные нечеловеческие сегменты $V\beta$, $D\beta$ и $J\beta$ неспособны перестраиваться с образованием перестроенной последовательности $V\beta/D\beta/J\beta$, например, у животного может отсутствовать

- 5 функциональный эндогенный нечеловеческий вариабельный локус $TCR\alpha$ и/или у животного может отсутствовать функциональный эндогенный нечеловеческий вариабельный локус $TCR\beta$, например, животное содержит: (а) делецию всех или по существу всех функциональных эндогенных сегментов гена $V\alpha$, (б) делецию всех или по существу всех функциональных эндогенных сегментов гена $J\alpha$, (с) делецию всех или
- 10 по существу всех функциональных эндогенных сегментов гена $V\beta$, (д) делецию всех или по существу всех функциональных эндогенных сегментов гена $D\beta$, (е) делецию всех или по существу всех функциональных эндогенных сегментов гена $J\beta$, и/или (ф) их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления в эндогенном нечеловеческом вариабельном локусе $TCR\alpha$ отсутствуют все или по существу все функциональные
- 15 эндогенные сегменты гена $V\alpha$ и/или отсутствуют все или по существу все функциональные эндогенные сегменты гена $J\alpha$, и/или в эндогенном нечеловеческом вариабельном локусе $TCR\beta$: (а) отсутствуют все или по существу все функциональные эндогенные сегменты гена $V\beta$, (б) отсутствуют все или по существу все функциональные эндогенные сегменты гена $D\beta$, (с) отсутствуют все или по существу все функциональные
- 20 эндогенные сегменты гена $J\beta$, или (д) любая комбинация (а), (б) и (с).

В некоторых вариантах осуществления первая, вторая и/или третья нуклеотидная (-ые) последовательность (-и), соответственно кодирующая (-ие) полипептид (-ы) химерного Т-клеточного корецептора $CD4$, $CD8\alpha$ и/или $CD8\beta$, находится в эндогенных локусах Т-клеточного корецептора, например в эндогенных локусах корецептора $CD4$,

- 25 $CD8\alpha$ и/или $CD8\beta$ соответственно; неперестроенный вариабельный локус гена $TCR\alpha$ находится в эндогенном вариабельном локусе гена $TCR\alpha$; неперестроенный вариабельный локус гена $TCR\beta$ находится в эндогенном вариабельном локусе гена $TCR\beta$; и/или первая, вторая и/или третья последовательность (-и) нуклеиновых кислот, соответственно кодирующая (-ие) химерный (-ые) полипептид (-ы) МНС II α , МНС II β и/или МНС I, находится (находится) в эндогенных локусах МНС; например в локусах МНС II α , МНС II β и/или МНС I соответственно. В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная (-ые) последовательность (-и), кодирующая (-ие) химерный (-ые) Т-клеточный (-ые) корецептор (-ы), неперестроенный вариабельный локус гена $TCR\alpha$, неперестроенный вариабельный локус гена $TCR\beta$ и/или последовательность (-и)
- 35 нуклеиновых кислот, кодирующая (-ие) химерную (-ые) молекулу (-ы) МНС, может (могут) быть функционально связана (-ы) с нечеловеческими промоторными и регуляторными последовательностями. Например, первая нуклеотидная последовательность может быть экспрессирована под регуляторным контролем эндогенных нечеловеческих промоторных и регуляторных элементов $CD4$, вторая
- 40 нуклеотидная последовательность может быть экспрессирована под регуляторным контролем эндогенных нечеловеческих промоторных и регуляторных элементов $CD8\alpha$ и/или третья нуклеотидная последовательность может быть экспрессирована под регуляторным контролем эндогенных нечеловеческих промоторных и регуляторных элементов $CD8\beta$; неперестроенный вариабельный локус гена $TCR\alpha$ может быть
- 45 экспрессирован под регуляторным контролем эндогенных регуляторных и промоторных элементов $TCR\alpha$ (вариабельный участок), а неперестроенный вариабельный локус гена $TCR\beta$ может быть экспрессирован под регуляторным контролем эндогенных регуляторных и промоторных элементов $TCR\beta$ (вариабельный участок); первая

последовательность нуклеиновых кислот может быть экспрессирована под регуляторным контролем эндогенных нечеловеческих промоторных и регуляторных элементов МНС II α , вторая последовательность нуклеиновых кислот может быть экспрессирована под регуляторным контролем эндогенных нечеловеческих

- 5 промоторных и регуляторных элементов МНС II β , а третья последовательность нуклеиновых кислот может быть экспрессирована под регуляторным контролем эндогенных нечеловеческих промоторных и регуляторных элементов МНС I.

В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая внеклеточный участок (или его части, например D1, D2, D3 и/или D4)

- 10 человеческого полипептида CD4, замещает последовательность, кодирующую внеклеточный участок (или его части, например D1, D2, D3 и/или D4) эндогенного нечеловеческого (мышиного) полипептида корецептора CD4, и может быть функционально связана с последовательностями, кодирующими трансмембранный и цитоплазматический домены эндогенного нечеловеческого (мышиного) CD4, в

- 15 эндогенном нечеловеческом (мышином) локусе корецептора CD4; нуклеотидная последовательность, кодирующая весь внеклеточный участок или часть внеклеточного участка человеческого полипептида CD8 α , замещает последовательность, кодирующую весь внеклеточный участок или часть внеклеточного участка эндогенного нечеловеческого (мышиного) полипептида Т-клеточного CD8 α , и может быть

- 20 функционально связана с последовательностями, кодирующими трансмембранный и цитоплазматический домены эндогенного нечеловеческого (мышиного) CD8 α , в эндогенном нечеловеческом (мышином) локусе CD8 α ; нуклеотидная последовательность, кодирующая весь внеклеточный домен или часть внеклеточного домена человеческого полипептида CD8 β , замещает последовательность, кодирующую весь внеклеточный

- 25 домен или часть внеклеточного домена эндогенного нечеловеческого (мышиного) полипептида Т-клеточного CD8 β , и может быть функционально связана с последовательностями, кодирующими трансмембранный и цитоплазматический домены эндогенного нечеловеческого CD8 β , в эндогенном локусе CD8 β ; неперестроенный

- 30 вариабельный локус гена TCR α замещает один или более эндогенных сегментов гена V α и/или J α в эндогенном нечеловеческом (мышином) вариабельном локусе гена TCR α ; неперестроенный вариабельный локус гена TCR β замещает один или более эндогенных сегментов гена V β , D β и/или J α в эндогенном нечеловеческом (мышином) вариабельном локусе гена TCR β ; последовательность нуклеиновых кислот, кодирующая внеклеточный участок (или его части, например домены α 1 и α 2) человеческого полипептида МНС

- 35 II α , замещает последовательность, кодирующую внеклеточный участок (или его части, например домены, α 1 и α 2) эндогенного нечеловеческого (мышиного) полипептида МНС II α , и может быть функционально связана с последовательностями, кодирующими трансмембранный и цитоплазматический домены эндогенного нечеловеческого (мышиного) МНС II α , в эндогенном нечеловеческом (мышином) локусе МНС II α ;

- 40 последовательность нуклеиновых кислот, кодирующая внеклеточный участок (или его части, например домены β 1 и β 2) человеческого полипептида МНС II β , замещает последовательность, кодирующую внеклеточный участок (или его части, например домены β 1 и β 2) эндогенного нечеловеческого (мышиного) полипептида МНС II β , и может быть функционально связана с последовательностями, кодирующими

- 45 трансмембранный и цитоплазматический домены эндогенного нечеловеческого (мышиного) МНС II β , в эндогенном нечеловеческом (мышином) локусе МНС II β ; и/или последовательность нуклеиновых кислот, кодирующая внеклеточный участок (или его части, например домены α 1, α 2 и/или α 3) человеческого полипептида МНС I,

замещает последовательность, кодирующую внеклеточный участок (или его части, например домены, α1, α2 и/или α3) эндогенного нечеловеческого (мышиного) полипептида МНС I, и может быть функционально связана с последовательностями, кодирующими трансмембранный и цитоплазматический домены эндогенного нечеловеческого (мышиного) МНС I, в эндогенном нечеловеческом (мышином) локусе МНС I.

В некоторых вариантах осуществления у генетически модифицированного не относящегося к человеку животного, описанного в настоящем документе, не экспрессируется функциональный эндогенный нечеловеческий Т-клеточный корецептор CD4 из его эндогенного локуса, не экспрессируется функциональный эндогенный нечеловеческий Т-клеточный корецептор CD8 из эндогенного локуса CD8, не экспрессируется функциональный вариабельный домен TCRα из эндогенного вариабельного локуса TCRα, не экспрессируется функциональный вариабельный домен TCRβ из эндогенного вариабельного локуса TCRβ, не экспрессируется внеклеточный домен эндогенного комплекса МНС II из эндогенного локуса МНС II (например, на клеточной поверхности) и/или не экспрессируется внеклеточный домен эндогенного полипептида МНС I из эндогенного локуса МНС I (например, на клеточной поверхности).

Любое не относящееся к человеку животное, описанное в настоящем документе,

может дополнительно содержать локус β2-микроглобулина, кодирующий полипептид, содержащий человеческую или гуманизированную аминокислотную последовательность β2-микроглобулина, причем у не относящегося к человеку животного экспрессируется человеческий или гуманизированный полипептид β2-микроглобулин. В некоторых вариантах осуществления не относящееся к человеку животное не экспрессирует функциональный эндогенный полипептид β2-микроглобулин не относящегося к человеку животного из эндогенного нечеловеческого локуса β2-микроглобулина. В некоторых вариантах осуществления локус β2-микроглобулина функционально связан с эндогенными нечеловеческими регуляторными элементами β2-микроглобулина. В одном варианте осуществления локус β2-микроглобулина содержит нуклеотидную последовательность, представленную в экзоне 2, экзоне 3 и экзоне 4 (например, экзонах 2-4) человеческого гена β2-микроглобулина, и необязательно локус β2-микроглобулина дополнительно содержит нуклеотидную последовательность, представленную в экзоне 1 нечеловеческого (например, грызуна) гена β2-микроглобулина.

Не относящиеся к человеку животные, описанные в настоящем документе, могут

представлять собой грызуна, например мышь или крысу.

Также в настоящем документе предложена мышь, которая экспрессирует химерные человеческие/мышиные полипептиды Т-клеточных корецепторов CD4, CD8α и CD8β, каждый из которых соответственно содержит трансмембранный и цитоплазматический домены мышиного CD4, CD8α и CD8β; Т-клеточный рецептор, содержащий человеческий вариабельный участок TCRα и человеческий вариабельный участок TCRβ на поверхности Т-клетки; химерные человеческие/мышиные полипептиды МНС IIα, МНС IIβ и МНС I, каждый из которых соответственно содержит внеклеточные домены человеческого полипептида МНС IIα (например, домены α1 и α2 человеческого HLA класса II), МНС IIβ (домены β1 и β2 человеческого HLA класса II) и МНС I (например, домены α1, α2 и α3 человеческого HLA класса I); и необязательно человеческий или гуманизированный полипептид β2-микроглобулин. В одном варианте осуществления в настоящем документе предложены не относящиеся к человеку животные, например мыши, у которых первая последовательность нуклеиновых кислот кодирует цепь α химерного человеческого/

мышиного полипептида HLA-DR/H-2E, вторая последовательность нуклеиновых кислот кодирует цепь β химерного полипептида HLA-DR/H-2E, а третья последовательность нуклеиновых кислот кодирует химерный человеческий/мышиный полипептид HLA-A/H-2K, и причем у мыши экспрессируются белки HLA-A/H-2K и HLA-DR/H-2E.

- 5 также в настоящем документе предложено не относящееся к человеку животное, содержащее по существу гуманизированную Т-клеточную иммунную систему, например, у которого по существу гуманизированная Т-клеточная иммунная система формирует по существу гуманизированный Т-клеточный иммунный ответ на антиген. В некоторых вариантах осуществления по существу гуманизированный Т-клеточный иммунный
- 10 ответ включает активированные Т-клетки, экспрессирующие человеческие вариабельные домены Т-клеточного рецептора (TCR), которые распознают антиген, представленный в связи с внеклеточными доменами человеческого лейкоцитарного антигена (HLA), и/или антигенпредставляющие клетки, которые представляют антиген в связи с внеклеточными доменами HLA. В некоторых вариантах осуществления по существу
- 15 гуманизированная Т-клеточная иммунная система содержит: (а) нечеловеческую Т-клетку, которая экспрессирует полипептид Т-клеточного корецептора, содержащий человеческий домен Т-клеточного корецептора, который связывается с человеческой молекулой HLA, и/или Т-клеточный рецептор (TCR), содержащий вариабельный домен TCR, который кодируется по меньшей мере одним человеческим сегментом гена
- 20 вариабельного участка TCR; и (б) нечеловеческую антигенпредставляющую клетку, которая представляет антиген в связи с человеческим HLA и активирует нечеловеческую Т-клетку.

Также предложены способы получения и использования не относящегося к человеку животного, описанного в настоящем документе. Как правило, способы получения генетически модифицированного не относящегося к человеку животного, описанного в настоящем документе, включают: (а) внедрение в геном не относящегося к человеку животного первой нуклеотидной последовательности, кодирующей химерный человеческий/нечеловеческий полипептид Т-клеточного корецептора (например, химерный полипептид CD4), и/или второй нуклеотидной последовательности, кодирующей второй химерный человеческий/нечеловеческий полипептид Т-клеточного корецептора (например, химерный полипептид CD8 α), и третьей нуклеотидной последовательности, кодирующей третий химерный человеческий/нечеловеческий полипептид Т-клеточного корецептора (например, химерный полипептид CD8 β), причем нечеловеческий участок каждого химерного полипептида Т-клеточного корецептора содержит по меньшей мере трансмембранный и цитоплазматический домены нечеловеческого Т-клеточного корецептора, и при этом человеческий участок каждого химерного полипептида содержит внеклеточный участок (или его часть, например один или более доменов) человеческого Т-клеточного рецептора; (б) вставку в геном не относящегося к человеку животного неперестроенного вариабельного локуса гена Т-клеточного рецептора (TCR) α , содержащего по меньшей мере один человеческий сегмент V α и по меньшей мере один человеческий сегмент J α , функционально связанный с нечеловеческой константной последовательностью гена TCR α , и/или неперестроенный вариабельный локус гена TCR β , содержащий по меньшей мере один человеческий сегмент V β , по меньшей мере один человеческий сегмент D β и по меньшей мере один человеческий сегмент J β , функционально связанный с нечеловеческой константной последовательностью гена TCR β ; и необязательно (с) включение в геном первой последовательности нуклеиновых кислот, кодирующей первый химерный человеческий/нечеловеческий полипептид МНС (например, химерный полипептид МНС II α), второй

последовательности нуклеиновых кислот, кодирующей второй химерный человеческий/нечеловеческий полипептид МНС (например, химерный полипептид МНС II β), и/или третьей последовательности нуклеиновых кислот, кодирующей третий химерный человеческий/нечеловеческий полипептид МНС (например, химерный полипептид МНС I); и/или (d) добавление в геном не относящегося к человеку животного локуса β 2-микроглобулина, кодирующего человеческий или гуманизированный полипептид β 2-микроглобулин. В некоторых вариантах осуществления первая нуклеотидная последовательность кодирует внеклеточный участок (или его часть) человеческого CD4, функционально связанный с по меньшей мере трансмембранным и цитоплазматическим доменами человеческого корецептора CD4, вторая нуклеотидная последовательность кодирует внеклеточный участок (или его часть) человеческого CD8 α и по меньшей мере трансмембранный и цитоплазматический домены человеческого CD8 α , третья нуклеотидная последовательность кодирует внеклеточный участок (или его часть) человеческого CD8 β и по меньшей мере трансмембранный и цитоплазматический домены человеческого CD8 β , первая последовательность нуклеиновых кислот кодирует внеклеточный участок (или его часть) человеческого полипептида HLA класса II α и по меньшей мере трансмембранный и цитоплазматический домены человеческого полипептида МНС II α , вторая последовательность нуклеиновых кислот кодирует внеклеточный участок (или его часть) человеческого полипептида HLA класса II β и по меньшей мере трансмембранный и цитоплазматический домены человеческого полипептида МНС II β , третья последовательность нуклеиновых кислот кодирует внеклеточный участок (или его часть) человеческого полипептида HLA класса I и трансмембранный и цитоплазматический домены человеческого полипептида МНС I, и локус β 2-микроглобулина содержит нуклеотидную последовательность, представленную в экзонах 2-4 человеческого гена β 2-микроглобулина, например нуклеотидную последовательность, представленную в экзонах 2, 3 и 4 человеческого гена β 2-микроглобулина.

Способы получения не относящихся к человеку животных включают варианты осуществления, в которых: (а) внедрение первой, второй и/или третьей нуклеотидной (-ых) последовательности (-ей), кодирующими (-их) химерный (-ые) полипептид (-ы) Т-клеточного корецептора в геном не относящегося к человеку животного, включает замещение в эндогенном локусе CD4 нуклеотидной последовательности, кодирующей эндогенный человеческий полипептид CD4, нуклеотидной последовательностью, кодирующей химерный человеческий/нечеловеческий полипептид CD4, и/или замещение в эндогенном локусе CD8 α нуклеотидной последовательности, кодирующей эндогенный человеческий полипептид CD8 α , нуклеотидной последовательностью, кодирующей химерный человеческий/нечеловеческий полипептид CD8 α , и замещение в эндогенном локусе CD8 β нуклеотидной последовательности, кодирующей эндогенный человеческий полипептид CD8 β , нуклеотидной последовательностью, кодирующей химерный человеческий/нечеловеческий полипептид CD8 β ; (б) вставка неперестроенного локуса TCR α и/или неперестроенного локуса TCR β в геном животного включает замещение эндогенного человеческого вариабельного локуса гена TCR α неперестроенным гуманизированным вариабельным локусом гена TCR α , содержащим по меньшей мере один человеческий сегмент Va и по меньшей мере один человеческий сегмент Ja, для создания гуманизированного вариабельного локуса гена TCR α , причем гуманизированный вариабельный локус гена TCR α функционально связан с эндогенным человеческим константным участком TCR α , и/или замещение эндогенного

нечеловеческого вариабельного локуса гена TCR β неперестроенным гуманизированным вариабельным локусом гена TCR β , содержащим по меньшей мере один человеческий сегмент V β , по меньшей мере один человеческий сегмент D β и по меньшей мере один человеческий сегмент J β , для создания гуманизированного вариабельного локуса гена TCR β , при этом гуманизированный вариабельный локус гена TCR β функционально связан с эндогенным нечеловеческим константным участком TCR β ; (c) включение первой, второй и/или третьей последовательности (-ей) нуклеиновых кислот, кодирующей (-их) химерный (-ые) полипептид (-ы) МНС в геном не относящегося к человеку животного, включает замещение в эндогенном нечеловеческом локусе МНС II нуклеотидной последовательности, кодирующей нечеловеческий комплекс МНС II, нуклеотидной последовательностью, кодирующей химерный человеческий/ нечеловеческий комплекс МНС II, и замещение в эндогенном нечеловеческом локусе МНС I нуклеотидной последовательности, кодирующей нечеловеческий полипептид МНС I, нуклеотидной последовательностью, кодирующей химерный человеческий/ нечеловеческий полипептид МНС I; и/или (d) добавление локуса β 2-микроглобулина, кодирующего человеческий или гуманизированный полипептид β 2-микроглобулин, в геном не относящегося к человеку животного включает замещение в эндогенном нечеловеческом локусе β 2-микроглобулина нуклеотидной последовательности, кодирующей нечеловеческий полипептид β 2-микроглобулин, нуклеотидной последовательностью, кодирующей человеческий или гуманизированный полипептид β 2-микроглобулин.

В некоторых вариантах осуществления: (a) внедрение первой, второй и/или третьей нуклеотидной последовательности в геном не относящегося к человеку животного соответственно включает: (i) замещение в эндогенном локусе CD4 нуклеотидной последовательности, кодирующей внеклеточный участок (или его часть) эндогенного нечеловеческого полипептида CD4, нуклеотидной последовательностью, кодирующей внеклеточный участок (или его часть) человеческого полипептида CD4, в функциональной взаимосвязи с последовательностями, кодирующими трансмембранный и цитоплазматический домены эндогенного нечеловеческого CD4; (ii) замещение в эндогенном локусе CD8 α нуклеотидной последовательности, кодирующей внеклеточный участок (или его часть) эндогенного нечеловеческого полипептида CD8 α , нуклеотидной последовательностью, кодирующей внеклеточный участок (или его часть) человеческого полипептида CD8 α , в функциональной взаимосвязи с последовательностями, кодирующими трансмембранный и цитоплазматический домены эндогенного нечеловеческого CD8 α ; и/или (iii) замещение в эндогенном локусе CD8 β нуклеотидной последовательности, кодирующей внеклеточный участок (или его часть) эндогенного нечеловеческого полипептида CD8 β , нуклеотидной последовательностью, кодирующей внеклеточный участок (или его часть) человеческого полипептида CD8 β , в функциональной взаимосвязи с последовательностями, кодирующими трансмембранный и цитоплазматический домены эндогенного нечеловеческого CD8 β ; (b) вставка неперестроенного локуса TCR α и/или неперестроенного локуса TCR β в геном животного соответственно включает: (i) замещение эндогенного нечеловеческого вариабельного локуса гена TCR α неперестроенным гуманизированным вариабельным локусом гена TCR α , содержащим по меньшей мере один человеческий сегмент V α и по меньшей мере один человеческий сегмент J α , для создания гуманизированного вариабельного локуса гена TCR α , причем гуманизированный вариабельный локус гена TCR α функционально связан с эндогенным нечеловеческим константным участком TCR α ; и/или (ii) замещение эндогенного нечеловеческого вариабельного локуса гена TCR β неперестроенным

гуманизированным вариабельным локусом гена TCR β , содержащим по меньшей мере один человеческий сегмент V β , по меньшей мере один человеческий сегмент D β и по меньшей мере один человеческий сегмент J β , для создания гуманизированного вариабельного локуса гена TCR β , при этом гуманизированный вариабельный локус гена TCR β функционально связан с эндогенным нечеловеческим константным участком TCR β ; (с) включение первой, второй и/или третьей последовательности нуклеиновых кислот в геном не относящегося к человеку животного соответственно включает: (i) замещение в эндогенном нечеловеческом локусе МНС II α нуклеотидной последовательности, кодирующей внеклеточный участок (или его часть) нечеловеческого полипептида МНС II α , нуклеотидной последовательностью, кодирующей внеклеточный участок (или его часть) человеческого полипептида HLA класса II α , в функциональной взаимосвязи с последовательностями, кодирующими трансмембранный и цитоплазматический домены эндогенного нечеловеческого МНС II α ; (ii) замещение в эндогенном нечеловеческом локусе МНС II β нуклеотидной последовательности, кодирующей внеклеточный участок (или его часть) нечеловеческого полипептида МНС II β , нуклеотидной последовательностью, кодирующей внеклеточный участок (или его часть) человеческого полипептида HLA класса II β , в функциональной взаимосвязи с последовательностями, кодирующими трансмембранный и цитоплазматический домены эндогенного нечеловеческого МНС II β ; и/или (iii) замещение в эндогенном нечеловеческом локусе МНС I нуклеотидной последовательности, кодирующей внеклеточный участок (или его часть) нечеловеческого полипептида МНС I, нуклеотидной последовательностью, кодирующей внеклеточный участок (или его часть) человеческого полипептида HLA класса I, в функциональной взаимосвязи с последовательностями, кодирующими трансмембранный и цитоплазматический домены эндогенного нечеловеческого МНС I; и/или замещение в эндогенном локусе β 2-микроглобулина нуклеотидной последовательности, представленной в экзонах 2-4, нуклеотидной последовательностью, содержащей экзоны 2, 3 и 4 человеческого гена β 2-микроглобулина.

В одном варианте осуществления этап внедрения включает замещение у первого не относящегося к человеку животного в эндогенном локусе CD4 нуклеотидной последовательности, кодирующей эндогенный нечеловеческий полипептид CD4, нуклеотидной последовательностью, кодирующей химерный человеческий/нечеловеческий полипептид CD4, замещение у второго не относящегося к человеку животного в эндогенном локусе CD8 α нуклеотидной последовательности, кодирующей эндогенный нечеловеческий полипептид CD8 α , нуклеотидной последовательностью, кодирующей эндогенный нечеловеческий полипептид CD8 β , нуклеотидной последовательностью, кодирующей химерный человеческий/нечеловеческий полипептид CD8 β . В некоторых вариантах осуществления этапа внедрения включает замещение у первого не относящегося к человеку животного в эндогенном локусе CD4 нуклеотидной последовательности, кодирующей внеклеточный участок (или его часть) эндогенного нечеловеческого полипептида CD4, нуклеотидной последовательностью, кодирующей внеклеточный участок (или его часть) человеческого полипептида CD4, в функциональной взаимосвязи с последовательностями, кодирующими трансмембранный и цитоплазматический домены эндогенного нечеловеческого CD4, замещение у второго не относящегося к человеку животного в эндогенном локусе CD8 α нуклеотидной последовательности, кодирующей внеклеточный участок (или его часть) эндогенного нечеловеческого

полипептида CD8 α , нуклеотидной последовательностью, кодирующей внеклеточный участок (или его часть) человеческого полипептида CD8 α , в функциональной взаимосвязи с последовательностями, кодирующими трансмембранный и цитоплазматический домены эндогенного нечеловеческого CD8 α , и замещение в 5 эндогенном локусе CD8 β нуклеотидной последовательности, кодирующей внеклеточный участок (или его часть) эндогенного нечеловеческого полипептида CD8 β , нуклеотидной последовательностью, кодирующей внеклеточный участок (или его часть) человеческого полипептида CD8 β , в функциональной взаимосвязи с последовательностями, кодирующими трансмембранный и цитоплазматический домены эндогенного 10 нечеловеческого CD8 β . В некоторых вариантах осуществления этапы замещения выполняют одновременно или в любом порядке.

В некоторых вариантах осуществления этап вставки включает замещение у третьего не относящегося к человеку животного эндогенного нечеловеческого вариабельного локуса гена TCR α неперестроенным гуманизированным вариабельным локусом гена 15 TCR α , содержащим по меньшей мере один человеческий сегмент V α и по меньшей мере один человеческий сегмент J α , для создания гуманизированного вариабельного локуса гена TCR α , причем гуманизированный вариабельный локус гена TCR α функционально связан с эндогенным нечеловеческим константным участком TCR α ; замещение у четвертого не относящегося к человеку животного эндогенного нечеловеческого 20 вариабельного локуса гена TCR β неперестроенным гуманизированным вариабельным локусом гена TCR β , содержащим по меньшей мере один человеческий сегмент V β , по меньшей мере один человеческий сегмент D β и по меньшей мере один человеческий сегмент J β , для создания гуманизированного вариабельного локуса гена TCR β , при этом гуманизированный вариабельный локус гена TCR β функционально связан с 25 эндогенным нечеловеческим константным участком TCR β . В некоторых вариантах осуществления этапы замещения выполняют одновременно или в любом порядке.

В некоторых вариантах осуществления этап размещения включает, в любом порядке, замещение у пятого не относящегося к человеку животного в эндогенном нечеловеческом локусе МНС II одной или более нуклеотидных последовательностей, 30 кодирующих нечеловеческий комплекс МНС II, одной или более нуклеотидными последовательностями, кодирующими химерный человеческий/нечеловеческий комплекс МНС II; и замещение у пятого не относящегося к человеку животного в эндогенном нечеловеческом локусе МНС I нуклеотидной последовательности, кодирующей нечеловеческий полипептид МНС I, нуклеотидной последовательностью, кодирующей 35 химерный человеческий/нечеловеческий полипептид МНС I. В некоторых вариантах осуществления этап включения включает замещение у пятого не относящегося к человеку животного в эндогенном нечеловеческом локусе МНС II а нуклеотидной последовательности, кодирующей внеклеточный участок (или его часть) нечеловеческого полипептида МНС II а, нуклеотидной последовательностью, кодирующей внеклеточный 40 участок (или его часть) человеческого полипептида МНС II а в функциональной взаимосвязи с последовательностями, кодирующими трансмембранный и цитоплазматический домены эндогенного нечеловеческого МНС II а, и замещение в эндогенном нечеловеческом локусе МНС II б нуклеотидной последовательности, кодирующей внеклеточный участок (или его часть) нечеловеческого полипептида МНС 45 II б, нуклеотидной последовательностью, кодирующей внеклеточный участок (или его часть) человеческого полипептида МНС II б, в функциональной взаимосвязи с последовательностями, кодирующими трансмембранный и цитоплазматический домены эндогенного нечеловеческого МНС II б; и замещение в эндогенном нечеловеческом

локусе МНС I нуклеотидной последовательности, кодирующей внеклеточный участок (или его часть) нечеловеческого полипептида МНС I, нуклеотидной последовательностью, кодирующей внеклеточный участок (или его часть) человеческого полипептида МНС I, в функциональной взаимосвязи с последовательностями,

- 5 кодирующими трансмембранный и цитоплазматический домены эндогенного нечеловеческого МНС I у пятого не относящегося к человеку животного. В некоторых вариантах осуществления этапы замещения выполняют одновременно или в любом порядке.

В некоторых вариантах осуществления этап добавления включает замещение у

- 10 шестого не относящегося к человеку животного в эндогенном нечеловеческом локусе β2-микроглобулина нуклеотидной последовательности, кодирующей нечеловеческий полипептид β2-микроглобулин, нуклеотидной последовательностью, кодирующей человеческий или гуманизированный полипептид β2-микроглобулин. В некоторых вариантах осуществления человеческий или гуманизированный полипептид β2-
- 15 микроглобулин кодируется нуклеотидной последовательностью, представленной в экзоне 2, экзоне 3 и экзоне 4 человеческого гена β2-микроглобулина.

Способы, описанные в настоящем документе, включают варианты осуществления, в которых: внедряют первую, вторую и/или третью нуклеотидную (-ые)

- 20 последовательность (-и), кодирующую (-ие) химерный (-е) полипептид (-ы) Т-клеточного корецептора; вставляют локус TCR α и/или неперестроенный локус TCR β ; размещают первую, вторую и/или третью последовательность (-и) нуклеиновых кислот, кодирующую (-ие) химерный (-е) полипептид (-ы) МНС; и/или добавляют локус β2-микроглобулина посредством скрещивания не относящегося к человеку животного, содержащего одну или более генетических модификаций, описанных в настоящем документе, с другим
- 25 (или несколькими) не относящимся к человеку животным того же вида, содержащим оставшиеся генетические модификации. Не имеющий ограничительного характера вариант осуществления включает скрещивание в любом порядке первого, второго, третьего, четвертого, пятого и шестого не относящихся к человеку животных, описанных выше.

- 30 Способы, описанные в настоящем документе, могут включать гомологичную рекомбинацию в нечеловеческих эмбриональных стволовых (ЭС) клетках. Способы, описанные в настоящем документе, можно использовать для создания мышей, описанных в настоящем документе. Не относящиеся к человеку животные, экспрессирующие химерные человеческие/нечеловеческие полипептиды Т-клеточных
- 35 рецепторов CD4, CD8 α и/или CD8 β , человеческие (гуманизированные) белки TCR α/β и химерный комплекс МНС II и МНС I (с человеческим или гуманизированным β2-микроглобулином) могут быть созданы посредством: (а) сначала внедрения соответствующим образом каждого отдельного человеческого (гуманизированного) гена путем гомологичной рекомбинации в отдельные ЭС-клетки и создания каждого
- 40 отдельного не относящегося к человеку животного из таких ЭС-клеток, и последующего скрещивания каждого полученного не относящегося к человеку животного в любом порядке; (б) внедрения всех человеческих (гуманизированных) генов путем последовательной гомологичной рекомбинации в одиночную ЭС-клетку, а затем создания не относящегося к человеку животного из такой ЭС-клетки; или (с)
- 45 комбинирования последовательной гомологичной рекомбинации в некоторых локусах в ЭС-клетках и скрещивания. Животные, описанные в настоящем документе, могут также при необходимости быть созданы путем скрещивания потомства от начального скрещивания с другими животными. Скрещивание и/или гомологичная рекомбинация

могут быть выполнены в любом предпочтительном порядке.

Также предложены способы выделения человеческих вариабельных доменов TCR, специфичных к антигену, из не относящегося к человеку животного, включающие выделение из не относящегося к человеку животного, предложенного в настоящем

- 5 документе или полученного по способу, описанному в настоящем документе, Т-клетки или белка TCR, который связывается с антигеном. В некоторых вариантах осуществления способы могут дополнительно включать идентификацию первой и/или второй нуклеиновой кислоты, кодирующей вариабельные домены TCR α и/или TCR β , которые связываются с антигеном, и/или культивирование клетки, содержащей один или более
- 10 векторов в условиях, достаточных для экспрессии вектора (-ов), причем вектор (-ы) содержит (-ат) третью и/или четвертую нуклеиновую кислоту, соответственно идентичную или по существу идентичную первой и/или второй нуклеиновым кислотам, и при этом третью и/или четвертую нуклеиновую кислоту克лонируют в пределах рамки считывания, например, с человеческим геном константного участка TCR, например
- 15 геном константного участка TCR α и/или геном константного участка TCR β соответственно. Также предложены ткани и клетки, содержащие генетические модификации, описанные в настоящем документе (которые могут включать перестроенные человеческие гены вариабельного участка TCR α и/или TCR β), и нуклеиновые кислоты, кодирующие такие человеческие вариабельные домены TCR,
- 20 экспрессируемые такими тканями или клетками, выделенными из не относящегося к человеку животного, модифицированного так, как описано в настоящем документе. Также включены: (1) рекомбинантные нуклеиновые кислоты, например экспрессионные векторы, содержащие последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие человеческий вариабельный домен TCR, описанный в настоящем документе, например
- 25 человеческий перестроенный ген вариабельного участка TCR α или TCR β , клонированный в пределах рамки считывания с соответствующим человеческим геном константного участка TCR, например геном константного участка TCR α или геном константного участка TCR β соответственно; (2) клетки-хозяева, содержащие такие нуклеиновые кислоты (например, экспрессионные векторы); и (3) TCR,
- 30 экспрессированные клетками-хозяевами. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантные нуклеиновые кислоты, предложенные в настоящем документе, содержат человеческий перестроенный ген вариабельного участка TCR δ или ген вариабельного участка TCR γ , например, полученный из не относящегося к человеку животного, генетически модифицированного так, как описано в настоящем документе,
- 35 или ткани, выделенной из него, клонированный в пределах рамки считывания с человеческим геном константного участка TCR δ или геном константного участка TCR γ соответственно.

Также предложен способ создания гуманизированного Т-клеточного ответа у не относящегося к человеку животного, по существу включающий иммунизацию не

- 40 относящегося к человеку животного, не относящегося к человеку животного, генетически модифицированного или имеющего по существу гуманизированную Т-клеточную иммунную систему, как описано в настоящем документе, антигеном, например человеческим антигеном, например человеческим опухолевым антигеном, человеческим бактериальным патогеном, человеческим вирусным патогеном и т.д. В некоторых
- 45 вариантах осуществления иммунизированное не относящееся к человеку животное экспрессирует по меньшей мере 50% всех функциональных человеческих сегментов гена TCRV α и/или по меньшей мере 50% всех функциональных человеческих сегментов гена TCRV β и/или содержит все или по существу все функциональные человеческие

сегменты гена TCRVa и/или все или по существу все функциональные человеческие сегменты гена TCRV β .

Также предложены способы *in vitro* выделения человеческого TCR, специфичного к антигену, которые, как правило, включают обнаружение активации первой клетки не относящегося к человеку животного после: (а) контакта со второй клеткой не относящегося к человеку животного; и (б) инкубации с антигеном; причем первая клетка экспрессирует химерный человеческий/нечеловеческий Т-клеточный корецептор и одно или оба из: (i) химерной человеческой/нечеловеческой цепи α TCR; и (ii) химерной человеческой/нечеловеческой цепи β TCR, и при этом вторая клетка экспрессирует химерный человеческий/нечеловеческий полипептид МНС. Способы могут дополнительно включать выделение TCR из первой клетки или кодирующих его нуклеиновых кислот.

В способах *in vitro*, описанных в настоящем документе, антиген может представлять собой опухолевый антиген, вирусный антиген, аутоантиген или бактериальный антиген.

В некоторых вариантах осуществления не относящееся к человеку животное представляет собой грызуна, например крысу или мышь. Кроме того, в настоящем документе предложена ткань, Т-клетка, TCR (например, растворимый TCR) или нуклеиновая кислота, кодирующая весь TCR или его часть, которая выделена из не относящегося к человеку животного, генетически модифицированного или имеющего по существу гуманизированную Т-клеточную иммунную систему, как описано в настоящем документе, гибридома или квадрома, полученная из такой Т-клетки.

Также предложены композиции, например, содержащие первую и вторую клетки не относящегося к человеку животного; причем первая клетка экспрессирует химерный человеческий/нечеловеческий Т-клеточный корецептор и необязательно одну или обе из (i) химерной человеческой/нечеловеческой цепи α TCR и (ii) химерной человеческой/нечеловеческой цепи β TCR, и при этом вторая клетка экспрессирует химерный человеческий/нечеловеческий полипептид МНС, который ассоциируется с химерным человеческим/нечеловеческим Т-клеточным корецептором. В некоторых вариантах осуществления первая клетка представляет собой не относящуюся к человеку Т-клетку.

В других вариантах осуществления вторая клетка представляет собой антигенпредставляющую клетку.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

На ФИГ. 1 схематически изображен (без соблюдения масштаба) гуманизированный Т-клеточный рецепторный комплекс, содержащий гуманизированные белки TCR альфа и бета, гуманизированный МНС класса I в комплексе с гуманизированным $\beta 2$ -микроглобулином и гуманизированный гетеродимер CD8 (левая таблица); а также Т-клеточный рецепторный комплекс, содержащий гуманизированные белки TCR альфа и бета, гуманизированный гетеродимер МНС класса II и гуманизированный CD4 (правая таблица). Антиген, представляемый гуманизированным МНС, показан в виде окружности. Мышиные участки показаны в виде закрашенных фигур, а человеческие участки показаны в виде заштрихованных фигур.

На ФИГ. 2А-С схематически представлены (без соблюдения масштаба) примеры химерных локусов МНС I и МНС II, например химерный локус HLA-A2/H-2K (ФИГ. 2А), химерный локус HLA-DR2/H-2E (ФИГ. 2В) и гуманизированный локус $\beta 2M$ (ФИГ. 2С). При отсутствии иных указаний человеческие последовательности показаны в виде полых фигур, а мышиные последовательности показаны в виде закрашенных фигур. Заштрихованная фигура представляет собой экзон 1 H-2E, полученный из другой линии мышей по сравнению с эндогенным локусом (см. пример 1.3 и ФИГ. 3В).

Фланкированная (-ые) loxP неомицинфосфотрансферазная (-ые) кассета (-ы) показана (-ы) со стрелками, отмеченными соответствующим образом.

На ФИГ. 3А-С показана стратегия создания гуманизированного локуса МНС, содержащего гуманизированные гены МНС I и МНС II. В конкретном варианте осуществления, показанном на ФИГ. 3А, локус МНС созданной мыши содержит химерные последовательности HLA-A2/H-2K и HLA-DR2/H-2E ($H2-K^{+/1666}$ МНС-II $^{+/6112}$), но в нем отсутствуют последовательность H-2D ($H2-D^{+/delete}$) и последовательность H-2A (метод генной инженерии также приводит к делеции H-2A, см. пример 1.2). Большие нацеливающие векторы (LTVEC) или конструкт с рекомбиназой Cre, внедренные в ЭС-клетки на каждой стадии гуманизации, показаны справа от стрелок. MAID или 4-значные номера обозначают идентификационный номер модифицированной аллели. На ФИГ. 3В представлена принципиальная схема (без соблюдения масштаба) примера большого нацеливающего вектора HLA-DR2/H-2E. При отсутствии иных указаний человеческие последовательности показаны в виде полых фигур, а мышиные последовательности показаны в виде закрашенных фигур. Заштрихованная фигура представляет собой экзон 1 H-2E, полученный из другой линии мышей по сравнению с эндогенным локусом (см. пример 1.3). Фланкированная loxP гигромициновая кассета показана в виде стрелки, отмеченной соответствующим образом. На ФИГ. 3С схематически представлены (без соблюдения масштаба) примеры генотипов химерных человеческих/мышиных локусов МНС (** обозначает ген H-2L, который не присутствует во всех линиях мышей, например не присутствует в линиях мышей C57B L/6 или 129), где эндогенные мышиные локусы H-2K и H-2E соответственно замещены химерными человеческими/мышиными локусами HLA-A2/H-2K и HLA-DR2/H-2E (заштрихованные фигуры), локусы H-2A и H-2D были удалены (полые фигуры, обведенные пунктирными линиями), а остальные локусы представляют собой эндогенные мышиные гены (сплошные фигуры, обведенные сплошными линиями).

На ФИГ. 4А показана (без соблюдения масштаба) последовательная стратегия гуманизации мышиного локуса TCR α , в которой сегменты гена вариабельного участка TCR α последовательно добавляют ближе к 5'-концу от начальной гуманизации удаленного мышиного локуса (MAID 1540). Мышиная последовательность указана в виде закрашенных фигур, человеческая последовательность указана в виде полых фигур. MAID обозначает идентификационный номер модифицированной аллели. TRAV = сегмент V α TCR, TRAJ = сегмент J α TCR (hTRAJ = человеческий TRAJ), TRAC = домен С α TCR, TCRD = TCR δ . На ФИГ. 4В показана (без соблюдения масштаба) последовательная стратегия гуманизации мышного локуса TCR β , в которой сегменты гена вариабельного участка TCR β последовательно добавляют ближе к удаленному мышному локусу TCR β . Мышиная последовательность указана в виде закрашенных фигур, человеческая последовательность указана в виде полых фигур. MAID обозначает идентификационный номер модифицированной аллели. TRBV или TCRBV = сегмент V TCR β .

На ФИГ. 5А представлено схематическое изображение (без соблюдения масштаба) химерного локуса CD4. Человеческие кодирующие экзоны представлены в виде заштрихованных фигур, мышиные кодирующие экзоны представлены в виде закрашенных фигур, а некодирующие экзоны представлены в виде полых фигур. Указаны экзоны, кодирующие иммуноглобулиноподобные домены (Ig), трансмембранный домен (TM), цитоплазматический домен (CYT) и сигнальный пептид (Signal), а также нетранслируемые области со стороны 3'-конца (UTR). Фланкированная loxP неомицинфосфотрансферазная (Pgk-neo) кассета показана со стрелками,

отмеченными соответствующим образом. На ФИГ. 5В показано схематическое изображение (без соблюдения масштаба) химерных локусов CD8α и CD8β. Человеческие кодирующие экзоны представлены в виде заштрихованных фигур, мышиные кодирующие экзоны представлены в виде закрашенных фигур, а некодирующие экзоны 5 представлены в виде полых фигур. Указаны экзоны, кодирующие иммуноглобулиноподобные домены (IgV), трансмембранный домен (TM), цитоплазматический домен (CYT) и сигнальный пептид (Signal), а также нетранслируемые области со стороны 3'-конца (UTR). Фланкированные loxP гигромициновая (Hyg) и неомицинфосфотрансферазная (Pgk-neo) кассеты изображены со стрелками, 10 показанными соответствующим образом.

На ФИГ. 6А-С представлены контурные графики FACS клеток тимуса, выделенных из контрольной мыши или мыши, содержащей гуманизированные локусы МНС I, МНС II α и β, TCRα и β, CD4, CD8α и β, а также β2M (TM I/II В C4/8), сортированных по 15 синглетам и меченых (ФИГ. 6А) антителами против мышиного CD19 и против мышиного CD3, (ФИГ. 6В) антителами против мышиного CD19 и против мышиного F4/80, или (ФИГ. 6С) антителами против мышиного CD8α и против мышиного CD4 (левая таблица), или антителами против человеческого CD8α и против человеческого CD4 (правая таблица).

На ФИГ. 7А-Г представлены контурные графики FACS клеток тимуса, выделенных из 20 контрольной мыши или мыши, содержащей гуманизированные локусы МНС I, МНС II α и β, TCRα и β, CD4, CD8α и β, а также β2M (TM I/II В C4/8), сортированных по клеткам CD19+, клеткам F4/80+ или клеткам CD3+ и меченых (ФИГ. 7А, 7В) антителами 25 против человеческого B2M и против мышиного Н-2D; (ФИГ. 7С, 7Д) антителами против HLA-A2 или против HLA-DR; (ФИГ. 7Е, 7F) антителами против Н-2D и против I^AI^E; или (ФИГ. 7Г) антителами против мышиного CD4 и против человеческого CD4 (сверху), антителами против мышиного CD8α и против человеческого CD8α (посредине) и антителами против мышиного CD8β и против человеческого CD8β (снизу).

На ФИГ. 8 изображены контурные графики FACS клеток тимуса, выделенных из 30 контрольной мыши или мыши, содержащей гуманизированные локусы МНС I, МНС II α и β, TCRα и β, CD4, CD8α и β, а также β2M (TM I/II В C4/8), сортированных по клеткам CD3⁺CD4⁺ и меченых антителами против мышиного FoxP3 и против мышиного CD25.

На ФИГ. 9А-Е изображены контурные графики FACS клеток селезенки, выделенных из 35 контрольной мыши или мыши, содержащей гуманизированные локусы МНС I, МНС II α и β, TCRα и β, CD4, CD8α и β, а также β2M (TM I/II В C4/8), сортированных по синглетам, клеткам CD3+, Т-клеткам CD4+ или Т-клеткам CD8+ и меченых (ФИГ. 9А) антителами против мышиного CD19 и против мышиного CD3, (ФИГ. 9В) антителами против мышиного CD19 и против мышиного F4/80, или (ФИГ. 9С) антителами против мышиного CD4 и против мышиного CD8α (слева), или антителами против человеческого 40 CD4 и против человеческого CD8α (справа), или (ФИГ. 9Д, 9Е) антителами против мышиного CD44 и против мышиного CD62L.

На ФИГ. 10А-Г изображены контурные графики FACS клеток селезенки, выделенных из 45 контрольной мыши или мыши, содержащей гуманизированные локусы МНС I, МНС II α и β, TCRα и β, CD4, CD8α и β, а также β2M (TM I/II В C4/8), сортированных по клеткам CD19+, клеткам F4/80+ или клеткам CD3 и окрашенных (ФИГ. 10А, 10В) антителами против человеческого B2M или против мышиного Н-2D, (ФИГ. 10С, 10Д) антителами против HLA-A2 или против HLA-DR, (ФИГ. 10Е, 10F) антителами против Н-2D и против I^AI^E или (ФИГ. 10Г) антителами против мышиного CD4 и против

человеческого CD4 (сверху), антителами против мышиного CD8 α и против человеческого CD8 α (в середине) и антителами против мышиного CD8 β и против человеческого CD8 β (снизу).

На ФИГ. 11 изображены контурные графики FACS клеток селезенки, выделенных из контрольной мыши или мыши, содержащей гуманизированные локусы MHC I, MHC II α и β , TCR α и β , CD4, CD8 α и β , а также β 2M (TM I/II В C4/8), сортированных по клеткам CD3 $^{+}$ CD4 $^{+}$ и меченых антителами против мышиного FoxP3 и против мышного CD25.

На ФИГ. 12 показано число клеток селезенки (пятен на лунку (среднее + CO); ось у), которые продуцируют ИФН- γ в анализе иммуноферментных пятен после выделения из контрольной мыши или мыши, содержащей гуманизированные локусы MHC I, MHC II α и β , TCR α и β , CD4, CD8 α и β , а также β 2M (TM I/II В C4/8), и инкубации при отсутствии пептида (только 200 тыс. клеток; ось x) или в присутствии 10 мкг/мл или 1 мкг/мл пептида MAGE-A3 (ось x).

На ФИГ. 13А показано развитие острой вирусной инфекции, вызванной штаммом Армстронга, либо у контрольной мыши, либо у мыши, содержащей гуманизированные локусы MHC I, MHC II α и β , TCR α и β , CD4, CD8 α и β , а также β 2M (TM I/II В C4/8); временная шкала эксперимента изображена в верхней части фигуры, а результаты измерения вирусных титров в разные дни после инфицирования для обоих штаммов мышей изображены на графике внизу. На ФИГ. 13В показано развитие хронической вирусной инфекции, вызванной штаммом Clone 13, либо у контрольных мышей, либо у мышей, содержащих гуманизированные локусы MHC I, MHC II α и β , TCR α и β , CD4, CD8 α и β , а также β 2M (TM I/II В C4/8); временная шкала эксперимента изображена в верхней части фигуры, а результаты измерения вирусных титров на 21-й день после инфицирования для обоих штаммов мышей изображены на графике внизу. Т-клетки из неинфицированных или хронически инфицированных мышей TM I/II В C4/8 или контрольных мышей В6 метили антителами против PD1, против Lag3 и против Tim3 (ФИГ. 13С; ось X); на фигуре показаны результаты количественного анализа меченых клеток (% положительных клеток; ось у).

На ФИГ. 14 показано развитие хронической вирусной инфекции, вызванной штаммом Clone 13, либо у контрольных мышей, либо у мышей TM I/II В C4/8 после предшествующей острой инфекции, вызванной штаммом Армстронга; временная шкала эксперимента изображена в верхней части фигуры, а результаты измерения вирусных титров на 31-й день после инфицирования изображены на графике внизу.

Ложноинфицированных мышей включали в эксперимент в качестве дополнительного контроля.

На ФИГ. 15А-В изображено количество клеток CD8+ (ось у; ИФН- γ -положительные клетки), которые продуцировали ИФН- γ в ответ на введение пептидов LCMV, рестрикованных по HLA-A2 (GPC10-18; N69-77; Z49-58), рестрикованных по H2D^b (GP33-41), овальбумина или только инкубацию, и были выделены либо из контрольных животных (ФИГ. 15А), либо из мышей, содержащих гуманизированные локусы MHC I, MHC II α и β , TCR α и β , CD4, CD8 α и β , а также β 2M (TM I/II В C4/8) (ФИГ. 15В), каждая из которых была ложноинфицирована (ложная инфекция; n=1 в каждой группе) или инфицирована острой инфекцией штамма Армстронга (Арм.; n=3 в каждой группе). % лимфоцитов CD8+ ИФН- γ + (ось у) после стимуляции указанными пептидами (OVA, GP33, NP69, GPC10, GPC447 или Z49) в процессе развития инфекции (дни после инфицирования; ось x) у мышей, содержащих гуманизированные локусы MHC I, MHC II α и β , TCR α и β , CD4, CD8 α и β , а также β 2M (TM I/II В C4/8), или у

контрольных животных В6 показан на ФИГ. 15С и 15D соответственно.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

В настоящем документе описаны не относящиеся к человеку животные (например, грызуны, например мыши или крысы), созданные методами генной инженерии и

- 5 экспрессирующие гуманизированный Т-клеточный корецептор (например, гуманизированный CD4 и/или CD8 (например, CD8 α и/или CD8 β)), человеческий или гуманизированный главный комплекс гистосовместимости (МНС), который связывается с гуманизированным Т-клеточным корецептором (например, человеческий или гуманизированный МНС II (например, цепи МНС II α и/или МНС II β) и/или МНС I (например, МНС I α), и необязательно человеческий или гуманизированный β 2-микроглобулин), и/или человеческий или гуманизированный Т-клеточный receptor (TCR), а также эмбрионы, ткани и клетки, экспрессирующие вышеупомянутое.
- 10 Развитие клеточного звена иммунной системы не относящихся к человеку животных, описанных в настоящем документе, и контрольных животных сопоставимо, например, тимус и селезенка содержат аналогичные абсолютные количества тимоцитов и клеток CD3+. Это существенно отличается от других не относящихся к человеку животных, модифицированных таким образом, чтобы они содержали человеческий TCR (α и β) и химерную человеческую/мышиную молекулу МНС I, см., например, Li (2010) Nature Medicine 16:1029-1035 и вспомогательные материалы. Такие животные демонстрировали
- 15 снижение популяций Т-клеток по сравнению не только с контрольными животными дикого типа, но и с животными, модифицированными только человеческим TCR, и животными, модифицированными только химерной человеческой/мышиной молекулой МНС I, там же. Соответственно, в настоящем документе предложены не относящиеся к человеку животные, созданные таким образом, чтобы совместно экспрессировать
- 20 гуманизированный корецептор CD4 и гуманизированный МНС II и/или гуманизированный корецептор CD8 и гуманизированный МНС I и необязательно гуманизированный TCR. Также предложены способы получения созданного методами генной инженерии животного, у которого экспрессируется по меньшей мере один гуманизированный Т-клеточный корецептор (например, гуманизированный CD4 и/или
- 25 CD8), по меньшей мере один гуманизированный МНС, который ассоциируется с гуманизированным Т-клеточным корецептором (например, гуманизированный МНС II и/или МНС I, который ассоциируется с гуманизированным CD4 и/или CD8 соответственно), и/или гуманизированный TCR. Также предложены способы использования созданных методами генной инженерии животных, у которых
- 30 формируется по существу гуманизированный Т-клеточный иммунный ответ, для разработки терапевтических средств для человека.

По существу гуманизированные Т-клеточные иммунные ответы

В настоящем документе описаны не относящиеся к человеку животные, которые были генетически модифицированы с возможностью формирования по существу

- 40 гуманизированных Т-клеточных иммунных ответов. Мыши, описанные в настоящем документе, экспрессируют по меньшей мере один человеческий или гуманизированный Т-клеточный корецептор, по меньшей мере один человеческий или гуманизированный главный комплекс гистосовместимости (МНС), способный ассоциироваться с по меньшей мере одним человеческим или гуманизированным Т-клеточным корецептором,
- 45 и/или человеческий или гуманизированный Т-клеточный receptor (TCR), который предпочтительно способен распознавать антиген, представленный в связи с человеческим или гуманизированным МНС в комплексе с человеческим или гуманизированным Т-клеточным корецептором, и передавать сигналы активации на

нечеловеческую клетку, например нечеловеческую Т-клетку, экспрессирующую человеческий или гуманизированный TCR. Человеческий или гуманизированный Т-клеточный корецептор, человеческий или гуманизированный TCR и/или человеческий или гуманизированный МНС может кодироваться геном не относящегося к человеку

5 животного. В предпочтительных вариантах осуществления при иммунизации антигеном не относящимся к человеку животные представляют рестриктированные по HLA эпитопы антигена TCR, полученные из человеческих сегментов гена TCR, например человеческого сегмента V TCR α , человеческого сегмента J TCR α , человеческого сегмента V TCR β , человеческого сегмента D TCR β и/или человеческого сегмента J TCR β .

10 Соответственно, в объем изобретения входит генетически модифицированное не относящееся к человеку животное, геном которого содержит (например, в эндогенном локусе) нуклеотидную последовательность, кодирующую гуманизированный полипептид Т-клеточного рецептора (например, полипептид CD4 или CD8), причем химерный полипептид Т-клеточного корецептора содержит консервативные аминокислотные 15 замены в аминокислотной (-ых) последовательности (-ях), описанной (-ых) в настоящем документе, и/или последовательность нукleinовых кислот, кодирующую гуманизированный полипептид МНС, который ассоциируется с гуманизированным полипептидом Т-клеточного корецептора, при этом гуманизированный полипептид МНС содержит консервативные аминокислотные замены в аминокислотой (-ых) 20 последовательности (-ях), описанной (-ых) в настоящем документе.

Консервативная аминокислотная замена включает замену аминокислотного остатка другим аминокислотным остатком, имеющим R-группу боковой цепи с аналогичными химическими свойствами (например, зарядом или гидрофобностью). Консервативные аминокислотные замены могут быть выполнены посредством модификации 25 нуклеотидной последовательности, направленной на внедрение изменения нуклеотидов, которые будут кодировать консервативную замену. В целом консервативная аминокислотная замена по существу не изменит интересующие функциональные свойства белка, например способность CD4 или CD8 ассоциироваться, например связываться с МНС II или МНС I соответственно, и может, например, повышать восприимчивость 30 TCR к представленному МНС антигену. Примеры групп аминокислот, имеющих боковые цепи с аналогичными химическими свойствами, включают алифатические боковые цепи, такие как глицин, аланин, валин, лейцин и изолейцин; алифатические гидроксильные боковые цепи, такие как серин и треонин; амидосодержащие боковые 35 цепи, такие как аспарагин и глутамин; ароматические боковые цепи, такие как фенилаланин, тирозин и триптофан; основные боковые цепи, такие как лизин, аргинин и гистидин; кислые боковые цепи, такие как аспарагиновая кислота и глутаминовая кислота; и серосодержащие боковые цепи, такие как цистein и метионин. Группы 40 консервативной аминокислотной замены включают, например, валин/лейцин/изолейцин, фенилаланин/тирозин, лизин/аргинин, аланин/валин, глутамат/аспартат и аспарагин/глутамин. В некоторых вариантах осуществления консервативная аминокислотная замена может быть заменой любого нативного остатка в белке аланином, как, например, используется при аланин-сканирующем мутагенезе. В некоторых вариантах осуществления выполняется консервативная замена, которая имеет положительную величину в логарифмической матрице правдоподобия PAM250, описанной в публикации 45 Gonnet et al. ((1992) Exhaustive Matching of the Entire Protein Sequence Database, Science 256: 1443-45), включенной в настоящий документ путем ссылки. В некоторых вариантах осуществления замена является умеренно консервативной и имеет неотрицательную величину в логарифмической матрице правдоподобия PAM250.

Специалисту в данной области будет понятно, что в связи с вырождением генетического кода в дополнение к описанным в настоящем документе нуклеотидным остаткам, кодирующими гуманизированные полипептиды Т-клеточного корецептора, гуманизированные полипептиды МНС и/или вариабельные участки ТСР, другие 5 нукleinовые кислоты могут кодировать полипептиды изобретения. Таким образом, в дополнение к генетически модифицированному не относящемуся к человеку животному, которое содержит в своем геноме нуклеотидную последовательность, кодирующую гуманизированный полипептид Т-клеточного корецептора (например, полипептид CD4 или CD8), неперестроенный вариабельный локус гена Т-клеточного рецептора 10 (например, ТСР α и/или ТСР β), содержащий человеческие неперестроенные сегменты гена, и/или последовательность нукleinовых кислот, кодирующую гуманизированный полипептид МНС, способный ассоциироваться с гуманизированным полипептидом Т-клеточного рецептора с консервативными аминокислотными заменами, также предложено не относящееся к человеку животное, в геноме которого содержится 15 нуклеотидная последовательность, кодирующая гуманизированный полипептид Т-клеточного рецептора (например, полипептид CD4 или CD8), неперестроенный вариабельный локус гена Т-клеточного рецептора (например, ТСР α и/или ТСР β), содержащий человеческие неперестроенные сегменты гена, и/или последовательность нукleinовых кислот, кодирующая гуманизированный полипептид МНС, способный 20 ассоциироваться с гуманизированным полипептидом Т-клеточного рецептора, которая отличается от описанной в настоящем документе в связи с вырождением генетического кода.

Идентичность последовательности можно определять по ряду различных алгоритмов, известных в данной области, которые можно использовать для определения 25 идентичности нуклеотидной и/или аминокислотной последовательности. В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, идентичности определяются с помощью программы выравнивания ClustalW, вер. 1.83 (медленное выравнивание) со штрафом за открытие гэпа 10,0 и штрафом за продолжение гэпа 0,1 и с помощью матрицы правдоподобия Гоннета (MacVector™ 10.0.2, MacVector Inc., 30 2008). Длина последовательностей, сравниваемых на идентичность последовательностей, будет зависеть от конкретных последовательностей. В различных вариантах осуществления идентичность определяется посредством сравнения последовательности зрелого белка от ее N-конца к ее С-концу. В различных вариантах осуществления при сравнении химерной человеческой/нечеловеческой последовательности с человеческой 35 последовательностью человеческий участок химерной человеческой/нечеловеческой последовательности (но не нечеловеческий участок) используется для выполнения сравнения с целью подтверждения степени идентичности между человеческой последовательностью и человеческим участком химерной человеческой/нечеловеческой последовательности (например, сравнения человеческого эктодомена химерного 40 человеческого/мышиного белка с человеческим эктодоменом человеческого белка).

Термины «гомология» или «гомологичный» по отношению к последовательностям, например нуклеотидным или аминокислотным последовательностям, означают две последовательности, у которых, например, по меньшей мере приблизительно 75% нуклеотидов или аминокислот, например по меньшей мере приблизительно 80% 45 нуклеотидов или аминокислот, например по меньшей мере приблизительно 90-95% нуклеотидов или аминокислот, например более 97% нуклеотидов или аминокислот идентичны при оптимальном выравнивании и сравнении. Специалисту в данной области будет понятно, что для оптимального нацеливания на ген нацеливающий конструкт

должен содержать плечи, гомологичные эндогенным последовательностям ДНК (т.е. «гомологичные плечи»). Следовательно, между нацеливающим конструктом и нацеленной эндогенной последовательностью может происходить гомологичная рекомбинация.

- 5 Термин «функционально связанный» относится к смежному положению, в котором описанные компоненты находятся во взаимосвязи, позволяющей им функционировать надлежащим образом. Так, последовательность нуклеиновых кислот, кодирующая белок, может быть функционально связана с регуляторными последовательностями (например, последовательностью промотора, энхансера, сайленсера и т.д), чтобы
- 10 сохранить соответствующее регулирование транскрипции. Кроме того, различные участки химерного или гуманизированного белка изобретения могут быть функционально связаны между собой для сохранения приемлемых фолдинга, процессинга, нацеливания, экспрессии и других функциональных свойств белка в клетке. Если не указано иное, различные домены химерных или гуманизированных белков
- 15 изобретения функционально связаны друг с другом.

Термин «замещение» в отношении замещения гена обозначает размещение экзогенного генетического материала в эндогенном генетическом локусе, что приводит к замещению всего или части эндогенного гена ортологичной или гомологичной последовательностью нуклеиновых кислот. Как продемонстрировано в примерах ниже,

- 20 в одном варианте осуществления последовательности нуклеиновых кислот эндогенных локусов, кодирующие участки мышиных полипептидов CD4 или CD8 (CD8 α и/или CD8 β), были замещены нуклеотидными последовательностями, кодирующими участки человеческих полипептидов CD4 или CD8 (CD8 α и/или CD8 β) соответственно.

Термин «функциональный» в контексте настоящего документа, например по

- 25 отношению к функциональному полипептиду, относится к полипептиду, который сохраняет по меньшей мере один вид биологического действия, в норме ассоциированный с нативным белком. Например, в некоторых вариантах осуществления изобретения замещение в эндогенном локусе (например, замещение в эндогенном нечеловеческом локусе CD4 или CD8) приводит к потере локусом способности
- 30 экспрессировать функциональный эндогенный полипептид.

Гуманизированный (-ые) Т-клеточный (-ые) корецептор (-ы)

В настоящем документе описаны не относящиеся к человеку животные, которые экспрессируют по меньшей мере один человеческий или гуманизированный Т-клеточный корецептор, например, CD4, CD8 α и/или CD8 β . Соответственно, не относящееся к

- 35 человеку животное, описанное в настоящем документе, содержит по меньшей мере одну из первой, второй и/или третьей нуклеотидной последовательности, каждая из которых кодирует разный человеческий или химерный человеческий/нечеловеческий полипептид Т-клеточного корецептора, выбранный из человеческого или гуманизированного полипептида CD4, человеческого или гуманизированного
- 40 полипептида CD8 α и человеческого или гуманизированного полипептида CD8 β .

Использование обозначений «первая», «вторая», «третья» в настоящем документе не следует толковать как ограничивающее требование по наличию у не относящихся к человеку животных, описанных в настоящем документе, всех трех нуклеотидных последовательностей или наличию какой-либо из корецепторных нуклеотидных

- 45 последовательностей в каком-либо порядке. Соответственно, не относящееся к человеку животное, описанное в настоящем документе, может содержать последовательность нуклеиновых кислот или последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие полипептид (-ы) человеческого или гуманизированного CD4 и/или человеческого или

гуманизированного CD8 (например, человеческого или гуманизированного CD8 α и/или CD8 β).

В одном варианте осуществления не относящееся к человеку животное, описанное в настоящем документе, содержит первую нуклеотидную последовательность, кодирующую человеческий или гуманизированный полипептид CD4. В другом варианте осуществления не относящееся к человеку животное, описанное в настоящем документе, содержит первую нуклеотидную последовательность, кодирующую человеческий или гуманизированный полипептид CD8 α , и вторую нуклеотидную последовательность, кодирующую человеческий или гуманизированный полипептид CD8 β . В другом варианте осуществления не относящееся к человеку животное, описанное в настоящем документе, содержит первую и вторую нуклеотидные последовательности, кодирующие человеческие или гуманизированные полипептиды CD8 α и CD8 β , и дополнительно содержит третью нуклеотидную последовательность, кодирующую человеческий или гуманизированный полипептид CD4.

Человеческий или гуманизированный CD4

В различных вариантах осуществления в изобретении по существу предложены генетически модифицированные не относящиеся к человеку животные, которые содержат в своем геноме, например в эндогенном локусе CD4, нуклеотидную последовательность, кодирующую человеческий или гуманизированный полипептид CD4; следовательно, животные экспрессируют человеческий или гуманизированный полипептид CD4.

Человеческий ген CD4 находится в хромосоме 12, и считается, что он содержит 10 экзонов. Ген CD4 кодирует белок с аминоконцевой гидрофобной сигнальной последовательностью, кодируемой экзонами 2 и 3 гена. Белок содержит четыре внеклеточных иммуноглобулиноподобных домена Ig1-Ig4, также часто и соответственно обозначаемых доменами D1-D4. Maddon et al. (1987) Structure and expression of the human and mouse T4 genes, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:9155-59. Считается, что домен D1 кодируется экзоном 3 (последовательность ближе к 3'-концу от сигнального пептида) и экзоном 4, а каждый из D2, D3 и D4 кодируется отдельным экзоном: экзонами 5, 6 и 7 соответственно (см. ФИГ. 5А: домены D1, D2, D3 и D4 кодируются последовательностями, обозначенными Ig1, Ig2, Ig3 и Ig4 соответственно). 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., выше. В областях с высокой концентрацией белка, таких как область контакта Т-клетки с антигенпредставляющей клеткой, молекула стремится к гомодимеризации посредством взаимодействий между противоположными доменами D4. 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.

Домен D1 CD4 схож с вариабельным (V) доменом иммуноглобулина, и считается, что он вместе с частью домена D2 связывается (ассоциируется) с МНС II, например, в сайге связывания корецептора МНС II. Huang et al. (1997) Analysis of the contact sites on the CD4 Molecule with Class II MHC Molecule, J. Immunol. 158:216-25. В свою очередь, МНС II взаимодействует с Т-клеточным корецептором CD4 в гидрофобном кармане в месте соединения доменов МНС II α 2 и β 2. Wang and Reinherz (2002) Structural Basis of T Cell Recognition of Peptides Bound to MHC Molecules, Molecular Immunology, 38:1039-49.

Предполагается, что домены D3 и D4 корецептора CD4 взаимодействуют с комплексом TCR-CD3, так как замена этих двух доменов лишала CD4 способности связываться с TCR. Vignali et al. (1996) The Two Membrane Proximal Domains of CD4 Interact with the T Cell Receptor, *J. Exp. Med.* 183:2097-2107. Молекула CD4 существует в виде

5 димера, и считается, что остатки домена D4 молекулы ответственны за димеризацию CD4. Moldovan et al. (2002) CD4 Dimers Constitute the Functional Components Required for T Cell Activation, *J. Immunol.* 169:6261-68.

Экзон 8 гена CD4 кодирует трансмембранный домен, а остальная часть гена кодирует цитоплазматический домен. Цитоплазматический домен CD4 выполняет множество 10 разных функций. Например, цитоплазматический домен CD4 мобилизует тирозинкиназу Lck. Lck представляет собой киназу семейства Src, которая ассоциируется с цитоплазматическими доменами CD4 и CD8, и одновременное связывание корецепторов и TCR с тем же МНС приводит к увеличению фосфорилирования тирозина CD3 и цепи 15 ζ комплекса TCR, что, в свою очередь, приводит к мобилизации других факторов, которые играют роль в Т-клеточной активации. Itano и коллеги после создания и тестирования экспрессии гибридного белка, содержащего внеклеточный домен CD8 и цитоплазматический хвост CD4 у трансгенных мышей, предположили, что 20 цитоплазматический хвост CD4 также способствует дифференцировке Т-клеток CD4+ CD8+ по линии CD4+. Itano et al. (1996) The Cytoplasmic Domain of CD4 Promotes the Development of CD4 Lineage T Cells, *J. Exp. Med.* 183:731-41. Экспрессия гибридного белка приводила к развитию специфичных к МНС I Т-клеток линии CD4. Там же.

Корецептор CD4 является основным рецептором для вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), а истощение численности Т-клеток CD4+ является индикатором прогрессирования заболевания. Цитоплазматический хвост CD4 является необходимым 25 для передачи апоптотического сигнала на Т-клетки CD4+ при ВИЧ-индуцированном апоптозе. В частности, показано, что взаимодействие CD4 и Lck усиливает ВИЧ-индуцированный апоптоз в этих клетках. 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.

30 Т-клетки развиваются в тимусе, превращаясь из незрелых тимоцитов CD4-/CD8- (двойные отрицательные, или DN) в тимоциты CD4+/CD8+ (двойные положительные, или DP), которые в итоге подвергаются положительной селекции и становятся Т-клетками CD4+ или CD8+ (одинарные положительные, или SP). Тимоциты DP, которые принимают сигналы через рестрикованный по МНС I TCR, дифференцируются в 35 Т-клетки CD8+, а тимоциты DP, которые принимают сигналы через рестрикованный по МНС II TCR, дифференцируются в Т-клетки CD4+. Стимулы, получаемые DP-клеткой, которые приводят к ее дифференцировке в Т-клетку CD4+ или CD8+, изучались в большом количестве исследований. Предложены различные модели выбора линии CD4/CD8, которые рассматриваются в публикации Singer et al. (2008) Lineage fate and intense 40 debate: myths, models and mechanisms of CD4- versus CD8- lineage choice, *Nat. Rev. Immunol.* 8:788-801.

Инактивация специфического Т-клеточного рецептора в результате положительной селекции является следствием транскрипционной регуляции. В отношении CD4 было показано, что энхансер, расположенный на 13 т.п.н. ближе к 5'-концу от экзона 1 CD4, 45 повышает экспрессию CD4 в Т-клетках CD4+ и CD8+. 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. Действующий в цис-положении транскрипционный сайленсер, расположенный в пределах первого интрона мышного гена CD4, вызывает

отключение экспрессии CD4 в клетках, отличных от Т-клеток CD4+. Siu et al. (1994) A transcriptional silencer control the developmental expression of the CD4 gene, EMBO J. 13:3570-3579.

В связи с отсутствием в нескольких линиях ранее созданных трансгенных мышей,

- 5 экспрессирующих человеческий CD4, важных транскрипционных регуляторов (например, промоторов, энхансеров, сайленсеров и т.д.), которые управляют выбором линии дифференцировки CD4, эти мыши были неспособны воспроизвести нормальное развитие по Т-клеточной линии дифференцировки и продуцировали иммунные клетки, отличные от Т-клеток CD4+, которые экспрессируют CD4. См., например, публикации Law et al.
- 10 (1994) Human CD4 Restores Normal T Cell Development and Function in Mice Deficient in CD4, J. Exp. Med. 179:1233-42 (экспрессия CD4 в Т-клетках CD8+ и В-клетках); Fugger et al. (1994) Expression of HLA-DR4 and human CD4 transgenes in mice determines the variable region p-chain T-cell repertoire and mediates an HLA-D-restricted immune response, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91:6151-55 (CD4 экспрессировались на всех тимоцитах CD3+ и В-клетках).
- 15 Таким образом, в одном варианте осуществления может иметь преимущество создание генетически модифицированного животного, которое сохраняет эндогенный мышиный промотор и другие регуляторные элементы, чтобы животное продуцировало Т-клетки, способные развиваться в Т-клетки и выбирать линию дифференцировки.

Таким образом, в различных вариантах осуществления в изобретении предложено

- 20 генетически модифицированное не относящееся к человеку животное, содержащее, например, в своем эндогенном локусе Т-клеточного корецептора (например, локусе CD4) нуклеотидную последовательность, кодирующую химерный человеческий/нечеловеческий полипептид Т-клеточного корецептора. В одном варианте осуществления человеческий участок химерного полипептида содержит весь или по существу весь
- 25 внеклеточный участок (или его часть, например один или более внеклеточных доменов, например по меньшей мере два последовательных внеклеточных домена) человеческого Т-клеточного корецептора. В одном варианте осуществления нечеловеческий участок химерного полипептида содержит трансмембранный и цитоплазматический домены нечеловеческого Т-клеточного корецептора. В одном варианте осуществления у не
- 30 относящегося к человеку животного экспрессируется функциональный химерный полипептид Т-клеточного корецептора. Таким образом, в одном аспекте в изобретении предложено генетически модифицированное не относящееся к человеку животное, содержащее в своем эндогенном локусе CD4 нуклеотидную последовательность, кодирующую химерный человеческий/нечеловеческий полипептид CD4, причем
- 35 человеческий участок химерного полипептида содержит весь или по существу весь внеклеточный участок человеческого CD4, при этом нечеловеческий участок содержит по меньшей мере трансмембранный и цитоплазматический домены нечеловеческого CD4 и при этом животное экспрессирует функциональный полипептид CD4. В одном аспекте у не относящегося к человеку животного экспрессируется только
- 40 гуманизированный полипептид CD4, т.е. химерный человеческий/нечеловеческий полипептид CD4, и не экспрессируется функциональный эндогенный нечеловеческий белок CD4 из его эндогенного локуса CD4.

В одном варианте осуществления человеческий участок химерного человеческого/нечеловеческого полипептида CD4 содержит весь или по существу весь внеклеточный

- 45 участок человеческого полипептида CD4. В другом варианте осуществления человеческий участок химерного человеческого/нечеловеческого полипептида CD4 содержит по меньшей мере весь или по существу весь домен связывания с МНС II человеческого полипептида CD4 (например, значительный участок человеческих доменов

D1 и D2); в одном варианте осуществления человеческий участок химерного человеческого/нечеловеческого полипептида CD4 содержит все или по существу все из доменов D1, D2 и D3 человеческого полипептида CD4; в еще одном варианте осуществления человеческий участок химерного человеческого/нечеловеческого полипептида CD4 содержит все или по существу все из иммуноглобулиноподобных доменов CD4, например доменов, обозначаемых D1, D2, D3 и D4. В еще одном варианте осуществления человеческий участок химерного человеческого/нечеловеческого полипептида CD4 содержит в своем человеческом участке всю или по существу всю человеческую последовательность CD4, которая несет ответственность за

5 взаимодействие с МНС II и/или внеклеточным участком Т-клеточного рецептора. В еще одном варианте осуществления человеческий участок химерного человеческого/нечеловеческого полипептида CD4 содержит весь или по существу весь внеклеточный участок человеческого CD4, который несет ответственность за взаимодействие с МНС II и/или вариабельным доменом Т-клеточного рецептора. Таким образом, в одном

10 варианте осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая человеческий участок химерного полипептида CD4, содержит всю или по существу всю кодирующую последовательность доменов D1-D2 человеческого CD4 (например, участок экзона 3 и экзоны 4-5 человеческого гена CD4); в другом варианте осуществления она содержит всю или по существу всю кодирующую последовательность D1-D3 человеческого CD4

15 (например, участок экзона 3 и экзоны 4-6 человеческого CD4). Таким образом, в одном варианте осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая химерный человеческий/нечеловеческий CD4, содержит нуклеотидные последовательности, кодирующие все или по существу все из доменов D1-D3 человеческого CD4. В другом варианте осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая человеческий

20 участок химерного полипептида CD4, содержит кодирующую последовательность доменов D1-D4 человеческого гена CD4. В другом варианте осуществления нуклеотидная последовательность может содержать нуклеотидную последовательность, кодирующую мышиный сигнальный пептид CD4, например область, кодируемую участками экзонов 2-3 мышного гена. В другом варианте осуществления нуклеотидная последовательность

25 может содержать нуклеотидную последовательность, кодирующую человеческий сигнальный пептид CD4. В одном варианте осуществления химерный человеческий/нечеловеческий полипептид CD4 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 78, а человеческий участок химерного полипептида охватывает приблизительно аминокислоты 27-319 SEQ ID NO: 78 (представленные

30 отдельно в SEQ ID NO: 79).

В одном варианте осуществления у не относящегося к человеку животного экспрессируется химерная человеческая/нечеловеческая последовательность полипептида CD4. В одном варианте осуществления человеческий участок химерной последовательности CD4 содержит одну или более консервативных или

35 неконсервативных модификаций.

В одном аспекте предложено не относящееся к человеку животное, которое экспрессирует человеческую последовательность CD4, причем человеческая последовательность CD4 по меньшей мере приблизительно на 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична человеческой последовательности CD4. В конкретном варианте осуществления человеческая последовательность CD4 по меньшей мере приблизительно на 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична человеческой последовательности CD4, описанной в примерах. В одном варианте осуществления человеческая последовательность CD4 содержит одну или более консервативных замен.

В одном варианте осуществления человеческая последовательность CD4 содержит одну или более неконсервативных замен.

В некоторых вариантах осуществления участок, например человеческий участок химерного CD4, может содержать по существу всю последовательность, указанную в

- 5 настоящем документе (например, по существу весь белковый домен, указанный в настоящем документе). По существу вся последовательность включает 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% аминокислот, которые предположительно составляют конкретный участок белка (например, конкретный функциональный домен и т.д.). Специалисту в данной области будет понятно, что границы функционального домена
- 10 могут немного варьировать в зависимости от используемых способов выравнивания и прогнозирования домена.

В одном аспекте нечеловеческий участок химерного человеческого/нечеловеческого полипептида CD4 содержит по меньшей мере трансмембранный и цитоплазматический домены нечеловеческого полипептида CD4. В связи с важными функциями,

- 15 выполняемыми цитоплазматическим доменом CD4, сохранение эндогенной нечеловеческой (например, мышевой) последовательности у созданных методами генной инженерии животных обеспечивает сохранение правильной внутриклеточной сигнализации и других функций корецептора. В одном варианте осуществления не относящееся к человеку животное представляет собой мышь, а нечеловеческий
- 20 полипептид CD4 представляет собой мышевый полипептид CD4. Хотя в примерах описана конкретная мышевая последовательность CD4, в область настоящего изобретения входит любая приемлемая последовательность, полученная из нее, например последовательность, содержащая консервативные/неконсервативные аминокислотные замены. В одном варианте осуществления нечеловеческий участок химерного
- 25 корецептора CD4 содержит любую последовательность эндогенного CD4, которая не была гуманизирована.

Не относящееся к человеку животное, описанное в настоящем документе, может содержать в своем эндогенном локусе нуклеотидную последовательность, кодирующую химерный человеческий/нечеловеческий полипептид CD4. В одном аспекте это приводит

- 30 к замещению участка эндогенного гена CD4 нуклеотидной последовательностью, кодирующей участок человеческого полипептида CD4. В одном варианте осуществления такое замещение представляет собой замещение эндогенной нуклеотидной последовательности, кодирующей, например, весь или по существу весь внеклеточный домен нечеловеческого CD4, например последовательности, кодирующей по меньшей
- 35 мере весь или по существу весь первый иммуноглобулиноподобный домен (т.е. D1) нечеловеческого CD4 (например, последовательности, кодирующей все или по существу все из доменов D1-D2 нечеловеческого CD4, например последовательности, кодирующей все или по существу все из доменов D1-D3 нечеловеческого CD4, например последовательности, кодирующей все или по существу все из доменов D1-D4

- 40 нечеловеческого CD4), человеческой нуклеотидной последовательностью, кодирующей вышеупомянутое. В одном варианте осуществления замещение приводит к образованию химерного белка, содержащего человеческую последовательность CD4, которая отвечает за взаимодействие с МНС II и/или внеклеточным участком Т-клеточного рецептора. В еще одном варианте осуществления замещение приводит к
- 45 образованию химерного белка, содержащего человеческую последовательность CD4, которая отвечает за взаимодействие с МНС II и/или вариабельным доменом Т-клеточного рецептора. В одном варианте осуществления замещение не содержит замещения последовательности CD4, кодирующей по меньшей мере трансмембранный

и цитоплазматический домены нечеловеческого полипептида CD4. Таким образом, в одном аспекте у не относящегося к человеку животного экспрессируется химерный человеческий/нечеловеческий полипептид CD4 из эндогенного нечеловеческого локуса CD4. В еще одном варианте осуществления замещение приводит к образованию белка, 5 содержащего последовательность полипептида, представленную в SEQ ID NO: 78.

В одном варианте осуществления предложена нуклеотидная последовательность химерного человеческого/нечеловеческого локуса CD4 (например, химерного локуса CD4 человека/грызуна, например химерного человеческого/мышиного локуса CD4), описанного в настоящем документе. В одном аспекте в связи с тем, что химерная

10 человеческая/нечеловеческая (например, человека/грызуна, например человеческая/ мышина) последовательность CD4 размещена в эндогенном нечеловеческом (например, грызуна, например мышном) локусе CD4, она сохраняет энхансерный элемент CD4, расположенный ближе к 5'-концу от первого экзона CD4. В одном варианте осуществления замещение в эндогенном нечеловеческом (например, грызуна, например

15 мышном) локусе CD4 содержит замещение, например, участка экзона 3, кодирующего D1, и экзонов 4-6, кодирующих остальную часть D1 и D2-D3 полипептида CD4; таким образом, в одном аспекте химерный локус CD4 сохраняет действующий в цис-положении сайленсер, расположенный в инtronе 1 нечеловеческого (например, мышного) гена CD4. Таким образом, в одном варианте осуществления химерный локус сохраняет

20 эндогенные нечеловеческие (например, грызуна, например мышные) промоторные и регуляторные элементы CD4. В другом варианте осуществления химерный локус может содержать человеческие промоторные и регуляторные элементы в количестве, достаточном для надлежащей экспрессии CD4, развития Т-клеток CD4+, выбора линии дифференцировки CD4 и функционирования корецептора. Таким образом, в некоторых

25 аспектах животные изобретения содержат генетическую модификацию, которая не нарушает правильный выбор линии дифференцировки и развитие Т-клеток. В одном аспекте животные (например, грызуны, например мыши) изобретения не экспрессируют химерный полипептид CD4 на иммунных клетках, отличных от клеток, которые в норме экспрессируют CD4. В одном аспекте животные не экспрессируют CD4 на В-клетках

30 или зрелых Т-клетках CD8+. В одном варианте осуществления замещение приводит к сохранению элементов, которые позволяют выполнять надлежащую пространственно-временную регуляцию экспрессии CD4.

В различных вариантах осуществления не относящееся к человеку животное (например, грызун, например мышь или крыса), которое экспрессирует функциональный 35 химерный белок CD4 из химерного локуса CD4, как описано в настоящем документе, представляет химерный белок на клеточной поверхности, например Т-клеточной поверхности. В одном варианте осуществления у не относящееся к человеку животного экспрессируется химерный белок CD4 на клеточной поверхности с таким же клеточным распределением, которое наблюдается у человека. В одном аспекте белок CD4 40 изобретения способен взаимодействовать с белком МНС II, экспрессированным на поверхности второй клетки, например антигенпредставляющей клетки (АПК).

Человеческий или гуманизированный CD8

В различных вариантах осуществления в изобретении по существу предложены 45 генетически модифицированные не относящиеся к человеку животные, которые содержат в своем геноме, например в эндогенном локусе CD8, нуклеотидную последовательность, кодирующую человеческий или гуманизированный полипептид CD8; следовательно, животные экспрессируют человеческий или гуманизированный полипептид CD8. В различных вариантах осуществления в изобретении предложены не относящиеся к

человеку животные, которые содержат в своем геноме, например в эндогенном локусе CD8, нуклеотидную последовательность, кодирующую человеческий или гуманизированный полипептид CD8 α , и/или нуклеотидную последовательность, кодирующую человеческий или гуманизированный полипептид CD8 β . Таким образом, 5 генетически модифицированное не относящееся к человеку животное изобретения экспрессирует человеческий или гуманизированный полипептид CD8 α и/или человеческий или гуманизированный полипептид CD8 β .

Человеческий белок CD8, как правило, экспрессируется на клеточной поверхности в виде гетеродимера, состоящего из двух полипептидов (CD8 α и CD8 β), хотя также 10 были обнаружены связанные дисульфидными мостиками гомодимеры и гомомультимеры (например, в NK-клетках и кишечных $\gamma\delta$ Т-клетках, которые экспрессируют CD8aa). Гены, кодирующие человеческий CD8 α и CD8 β , расположены в непосредственной 15 близости друг от друга на хромосоме 2. Nakayama et al. (1992) Recent Duplication of the Two Human CD8 β -chain genes, J. Immunol. 148:1919-27. Белок CD8 α содержит лидерный 20 пептид, область, подобную иммуноглобулину V, шарнирную область, трансмембранный домен и цитоплазматический хвост. 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. Экзоны/интроны гена CD8 α схематически показаны на ФИГ. 5В.

Человеческий ген CD8 β находится ближе к 5'-концу от гена CD8 α на хромосоме 2.

20 Описано множество изоформ, полученных путем альтернативного спlicing гена CD8 β , причем предположительно одна изоформа не содержит трансмембранный домен и продуцирует секреируемый белок. Norment et al. (1988) A second subunit of CD8 is expressed in human T cells, EMBO J. 7:3433-39. Экзоны/интроны гена CD8 β также 25 схематически показаны на ФИГ. 5В.

25 Мембранный белок CD8 β содержит N-концевую сигнальную последовательность, за которой расположены домен, подобный иммуноглобулину V, короткая внеклеточная шарнирная область и цитоплазматический хвост. См. публикацию Littman (1987) The structure of the CD4 and CD8 genes, Ann Rev. Immunol. 5: 561-84. Шарнирная область представляет собой сайт обширного гликозилирования, 30 который, как считается, поддерживает конформацию белка и защищает его от расщепления протеазами. Leahy (1995) A structural view of CD4 and CD8, FASEB J. 9:17-25.

35 Белок CD8, как правило, экспрессируется на цитотоксических Т-клетках и взаимодействует с молекулами МНС I. Взаимодействие опосредуется через связывание CD8 с доменом α_3 МНС I. Хотя связывание МНС класса I с CD8 приблизительно в 100 раз слабее, чем связывание ТСР с МНС класса I, связывание CD8 усиливает аффинность связывания ТСР. 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.

40 Связывание CD8 с молекулами МНС класса I является видоспецифичным. Показано, что мышиный гомолог CD8, Lyt-2, связывается с молекулами H-2D^d в домене α_3 , но не связывается с молекулами HLA-A. 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. Дифференцированное связывание происходило предположительно за счет 45 CDR-подобных детерминант (CDR1- и CDR2-подобных) на CD8, которые не были сохранены у людей и мышей. 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 и Gao et al. (1997) Crystal structure of the complex between human CD8 $\alpha\alpha$ and HLA-A2, Nature 387:630-634. Было описано, что CD8 связывается с HLA-A2 в консервативной области домена α_3 (в положении 223-229). Одиночная замена (V245A)

5 в HLA-A ослабляла связывание CD8 с HLA-A с одновременным значительным уменьшением опосредованного Т-клетками лизиса. Salter et al. (1989), Polymorphism in the α_3 domain of HLA-A molecules affects binding to CD8, Nature 338:345-348. В целом полиморфизм в домене α_3 молекул HLA-A также влиял на связывание с CD8. Там же.

10 У мышей аминокислотная замена в остатке 227 в H-2D d влияла на связывание мышиного Lyt-2 с H-2D d , а клетки, трансфицированные мутантным H-2D d , не лизировались клетками CD8+. 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. Таким образом, экспрессия человеческого или гуманизированного CD8 может быть полезна

15 для исследования Т-клеточных ответов на антиген, представляемый человеческим или гуманизированным МНС I.

Аналогично CD4 цитоплазматический домен CD8 взаимодействует с тирозинкиназой Lck, что, в свою очередь, приводит к Т-клеточной активации. Хотя Lck предположительно взаимодействует с цитоплазматическим доменом CD8 α , по-видимому, это взаимодействие регулируется присутствием цитоплазматического домена CD8 β , так как мутации или делеции цитоплазматического домена CD8 β приводили к снижению CD8 α -ассоциированной активности Lck. Irie et al. (1998) The cytoplasmic domain of CD8 β Regulates Lck Kinase Activation and CD8 T cell Development, J. Immunol. 161:183-91. Снижение активности Lck было ассоциировано с нарушением развития Т-клеток. Там же.

25 Экспрессия CD8 на соответствующих клетках, например цитотоксических Т-клетках, жестко регулируется множеством энхансерных элементов, расположенных по всему локусу CD8. Например, в локусе CD8 было обнаружено по меньшей мере 4 области гиперчувствительности к ДНКазе I, которые часто ассоциируются со связыванием 30 регулятора. Hosert et al. (1997) A CD8 genomic fragment that directs subset-specific expression of CD8 in transgenic mice, J. Immunol. 158:4270-81. С момента открытия этих областей гиперчувствительности к ДНКазе I в локусе CD8 было обнаружено по меньшей мере 5 энхансерных элементов, распределенных по всему локусу CD8, которые регулируют экспрессию CD8 α и/или β в Т-клетках различных линий дифференцировки, включая Т-35 клетки DP, CD8 SP или клетки, экспрессирующие $\gamma\delta$ TCR. См., например, публикации Kioussis et al. (2002) Chromatin and CD4, CD8A, and CD8B gene expression during thymic differentiation. Nature Rev. 2:909-919 и 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.

40 Таким образом, аналогично пользе, полученной за счет сохранения эндогенных промоторных и регуляторных элементов CD4 у генетически модифицированных животных с человеческим или гуманизированным CD4, в некоторых вариантах осуществления может быть полезно создание генетически модифицированного не относящегося к человеку животного, у которого сохранены эндогенные мышиные 45 промоторные и регуляторные элементы, которые будут контролировать экспрессию человеческого или гуманизированного CD8. Особенно полезным может быть создание генетически модифицированных животных, содержащих замещение эндогенных нечеловеческих последовательностей, кодирующих белки CD8 α и/или β ,

последовательностями, кодирующими человеческие или гуманизированные белки CD8 α и/или β , как описано в настоящем документе.

В различных вариантах осуществления в изобретении предложено генетически модифицированное не относящееся к человеку животное, содержащее в своем геноме,

- 5 например в своем эндогенном локусе CD8, по меньшей мере одну нуклеотидную последовательность, кодирующую химерный человеческий/нечеловеческий полипептид CD8 (например, полипептид CD8 α и/или β), причем человеческий участок полипептида содержит весь или по существу весь внеклеточный участок (или его часть, например, внеклеточный домен) человеческого полипептида CD8 (например, CD8 α и/или β), при
- 10 этом нечеловеческий участок содержит по меньшей мере трансмембранный и цитоплазматический домены нечеловеческого CD8 (например, CD8 α и/или β), и при этом животное экспрессирует химерный полипептид CD8 (например, полипептид CD8 α и/или β). Таким образом, в одном варианте осуществления в изобретении предложено генетически модифицированное не относящееся к человеку животное, содержащее в
- 15 своем эндогенном нечеловеческом локусе CD8 первую нуклеотидную последовательность, кодирующую химерный человеческий/нечеловеческий полипептид CD8 α , и вторую нуклеотидную последовательность, кодирующую химерный человеческий/нечеловеческий полипептид CD8 β , причем первая нуклеотидная последовательность содержит последовательность, которая кодирует весь или по
- 20 существу весь внеклеточный участок человеческого полипептида CD8 α и по меньшей мере трансмембранный и цитоплазматический домены нечеловеческого полипептида CD8 α , и при этом вторая нуклеотидная последовательность содержит последовательность, которая кодирует весь или по существу весь внеклеточный участок человеческого полипептида CD8 β и по меньшей мере трансмембранный и
- 25 цитоплазматический домены нечеловеческого полипептида CD β , при этом животное экспрессирует функциональный химерный человеческий/нечеловеческий белок CD8. В одном аспекте у не относящегося к человеку животного экспрессируется только гуманизированный полипептид CD8 (например, химерный человеческий/нечеловеческий полипептид CD8 α и/или β) и не экспрессируется (-ются) соответствующий (-ие)
- 30 функциональный (-ые) нечеловеческий (-ие) полипептид (-ы) CD8 из эндогенного локуса CD8.

В одном варианте осуществления химерный человеческий/нечеловеческий полипептид CD8 α содержит в своем человеческом участке весь или по существу весь внеклеточный участок человеческого полипептида CD8 α . В одном варианте осуществления

- 35 человеческий участок химерного полипептида CD8 α содержит по меньшей мере домен связывания с МНС I человеческого полипептида CD8 α . В одном варианте осуществления человеческий участок химерного полипептида CD8 α содержит последовательность по меньшей мере всего или по существу всего подобного иммуноглобулину V домена человеческого CD8 α . В одном варианте осуществления нуклеотидная
- 40 последовательность, кодирующая человеческий участок химерного полипептида CD8 α , содержит по меньшей мере экзоны, которые кодируют внеклеточный участок человеческого полипептида CD8 α . В одном варианте осуществления нуклеотидная последовательность содержит по меньшей мере экзоны, которые кодируют IgV-подобные домены. В одном варианте осуществления внеклеточный участок
- 45 человеческого полипептида CD8 α представляет собой область, охватывающую участок полипептида, который не является трансмембранным или цитоплазматическим доменом. В одном варианте осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая химерный человеческий/нечеловеческий полипептид CD8 α , содержит

последовательность, кодирующую нечеловеческий (например, грызуна, например мышиный) сигнальный пептид CD8 α . Альтернативно нуклеотидная последовательность может содержать последовательность, кодирующую человеческую сигнальную последовательность CD8 α . В одном варианте осуществления химерный человеческий/

5 нечеловеческий полипептид CD8 α содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 88, а человеческий участок химерного полипептида включает аминокислоты 28-179 SEQ ID NO: 88 (представленные отдельно в SEQ ID NO: 89).

Аналогично в одном варианте осуществления химерный человеческий/нечеловеческий

10 полипептид CD8 β содержит в своем человеческом участке весь или по существу весь внеклеточный участок человеческого полипептида CD8 β . В одном варианте осуществления человеческий участок химерного полипептида CD8 β содержит последовательность всего или по существу всего подобного иммуноглобулину V домена человеческого CD8 β . В одном варианте осуществления нуклеотидная

15 последовательность, кодирующая человеческий участок химерного полипептида CD8 β , содержит по меньшей мере экзоны, которые кодируют внеклеточный участок человеческого полипептида CD8 β . В одном варианте осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая человеческий участок химерного человеческого/нечеловеческого полипептида CD8 β , содержит по меньшей мере экзоны, которые

20 кодируют IgV-подобный домен человеческого CD8 β . В одном варианте осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая химерный человеческий/нечеловеческий полипептид CD8 β , содержит последовательность, кодирующую нечеловеческий (например, грызуна, например мышиный) сигнальный пептид CD8 β . Альтернативно нуклеотидная последовательность может содержать последовательность, кодирующую

25 человеческую сигнальную последовательность CD8 β . В одном варианте осуществления химерный человеческий/нечеловеческий полипептид CD8 β содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 83, а человеческий участок химерного полипептида включает аминокислоты 15-165 в SEQ ID NO: 83 (представленные отдельно в SEQ ID NO: 84).

30 В одном варианте осуществления у не относящегося к человеку животного экспрессируются химерные человеческие/нечеловеческие полипептиды CD8 α и/или CD8 β . В некоторых вариантах осуществления человеческий участок химерного человеческого/нечеловеческого полипептида CD8 α и/или β содержит одну или более консервативных или неконсервативных модификаций.

35 В одном аспекте предложено не относящееся к человеку животное, которое экспрессирует человеческую последовательность полипептида CD8 α и/или β , причем человеческая последовательность полипептида CD8 α и/или β по меньшей мере приблизительно на 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична человеческой последовательности полипептида CD8 α и/или β соответственно. В конкретном варианте

40 осуществления человеческая последовательность полипептида CD8 α и/или β по меньшей мере приблизительно на 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична соответствующей человеческой последовательности полипептида CD8 α и/или β , описанной в примерах. В одном варианте осуществления человеческая последовательность полипептида CD8 α и/или β содержит одну или более консервативных замен. В одном варианте

45 осуществления человеческая последовательность полипептида CD8 α и/или β содержит одну или более неконсервативных замен.

В некоторых вариантах осуществления участок, например человеческий участок химерного CD8, может содержать по существу всю последовательность, указанную в

настоящем документе (например, по существу весь белковый домен, указанный в настоящем документе). По существу вся последовательность по существу включает 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% аминокислот, которые предположительно составляют конкретный участок белка (например, конкретный функциональный домен и т.д.). Специалисту в данной области будет понятно, что границы функционального домена могут немного варьировать в зависимости от используемых способов выравнивания и прогнозирования домена.

В одном аспекте нечеловеческий участок химерного человеческого/нечеловеческого полипептида CD8 α и/или β содержит по меньшей мере трансмембранный и/или цитоплазматический домены нечеловеческого полипептида CD8 α и/или β соответственно. В связи с важными функциями, выполняемыми цитоплазматическим доменом CD8, сохранение эндогенной нечеловеческой (например, мышью) последовательности у созданных методами генной инженерии животных обеспечивает сохранение правильной внутриклеточной сигнализации и других функций корецептора. В одном варианте осуществления не относящееся к человеку животное представляет собой мышь, а нечеловеческий полипептид CD8 α и/или β представляет собой мышевый полипептид CD8 α и/или β соответственно. Хотя в примерах описаны конкретные мышевые последовательности CD8 α и β , в объем настоящего изобретения входит любая приемлемая последовательность, полученная из нее, например последовательность, содержащая консервативные/неконсервативные аминокислотные замены. В одном варианте осуществления у не относящегося к человеку животного (например, грызуна, например мыши) сохранена эндогенная последовательность, которая не была гуманизирована.

Не относящееся к человеку животное, описанное в настоящем документе, может содержать в своем эндогенном локусе нуклеотидную последовательность, кодирующую химерный человеческий/нечеловеческий полипептид CD8 α и/или β . В одном аспекте это приводит к замещению участка эндогенного гена CD8 α нуклеотидной последовательностью, кодирующей участок человеческого полипептида CD8 α , и/или замещению участка эндогенного гена CD8 β нуклеотидной последовательностью, кодирующей участок человеческого полипептида CD8 β . В одном варианте осуществления такое замещение представляет собой замещение эндогенной нуклеотидной последовательности, кодирующей весь или по существу весь внеклеточный участок нечеловеческого CD8 α и/или β , человеческой нуклеотидной последовательностью, кодирующей вышеупомянутое. В одном варианте осуществления такое замещение представляет собой замещение последовательности, кодирующей по меньшей мере весь или по существу весь подобный иммуноглобулину V домен нечеловеческого CD8 α и/или β , человеческой нуклеотидной последовательностью, кодирующей вышеупомянутое. В одном варианте осуществления замещение не содержит замещения последовательности CD8 α и/или β , кодирующей трансмембранный и цитоплазматический домены нечеловеческого полипептида CD8 α и/или β . Таким образом, у не относящегося к человеку животного экспрессируется химерный человеческий/нечеловеческий полипептид CD8 α и/или β из эндогенного нечеловеческого локуса CD8. В еще одном варианте осуществления замещение приводит к образованию белка CD8 α и/или β , содержащего последовательность полипептида, представленную в SEQ ID NO: 88 и/или 84 соответственно.

В одном варианте осуществления предложена нуклеотидная последовательность химерного человеческого/нечеловеческого локуса CD8 (например, химерного локуса

CD8 грызуна, например химерного мышиного локуса CD8). В одном аспекте в связи с тем, что химерная человеческая/нечеловеческая (например, человека/грызуна, например человека/мыши) последовательность CD8 α и/или β находится в соответствующем эндогенном нечеловеческом (например, грызуна, например мышом) локусе CD8 α и/или β , в ней сохранены эндогенные промоторные и регуляторные элементы CD8 α и/или β . В другом варианте осуществления химерный локус может содержать человеческие промоторные и регуляторные элементы CD8 α и/или β в количестве, достаточном для надлежащей экспрессии CD8 α и/или β (надлежащей пространственно-временной экспрессии), развития Т-клеток CD8+, выбора линии дифференцировки CD8 и

функционирования корецептора. Таким образом, в одном аспекте животные изобретения содержат генетическую модификацию, которая не нарушает правильный выбор линии дифференцировки и развитие Т-клеток. В одном аспекте животные (например, грызуны, например мыши) изобретения не экспрессируют химерный белок CD8 на иммунных клетках, отличных от клеток, которые в норме экспрессируют CD8, например, животные не экспрессируют CD8 на В-клетках или зрелых Т-клетках CD4+. В одном варианте осуществления замещение приводит к сохранению элементов, которые позволяют выполнять надлежащую пространственно-временную регуляцию экспрессии CD8 α и/или β .

В различных вариантах осуществления не относящееся к человеку животное (например, грызун, например мышь или крыса), которое экспрессирует функциональный химерный белок CD8 (например, CD8 $\alpha\beta$ или CD8 $\alpha\alpha$) из химерного локуса CD8, как описано в настоящем документе, представляет химерный белок на клеточной поверхности. В одном варианте осуществления у не относящегося к человеку животного экспрессируется химерный белок CD8 на клеточной поверхности с таким же клеточным распределением, которое наблюдается у человека. В одном аспекте белок CD8 изобретения способен взаимодействовать с белком МНС I, экспрессируемым на поверхности второй клетки.

Человеческий или гуманизированный Т-клеточный рецептор

В настоящем документе описаны генетически модифицированные не относящиеся к человеку животные, содержащие по существу гуманизированную Т-клеточную иммунную систему. В некотором варианте осуществления не относящееся к человеку животное, описанное в настоящем документе, содержит, например, в своем геноме: (а) нуклеотидную последовательность, кодирующую химерный человеческий/нечеловеческий Т-клеточный корецептор, причем человеческий участок химерного полипептида Т-клеточного корецептора кодируется последовательностью, кодирующей внеклеточный домен человеческого Т-клеточного корецептора, и при этом последовательность, кодирующая внеклеточный домен человеческого Т-клеточного корецептора, функционально связана с нуклеотидом, содержащим последовательность, кодирующую трансмембранный и/или цитоплазматический домены нечеловеческого Т-клеточного корецептора; (б) неперестроенный ген вариабельного участка Т-клеточного рецептора, содержащий по меньшей мере один человеческий сегмент V, необязательно по меньшей мере один человеческий сегмент D и по меньшей мере один человеческий сегмент J, при этом неперестроенные сегменты V, необязательно D и J гена вариабельного участка TCR способны к рекомбинации с образованием перестроенного гена, функционально связанного с нечеловеческой константной последовательностью гена TCR; и (с) последовательность нукleinовых кислот, кодирующую химерный человеческий/нечеловеческий полипептид МНС, при этом человеческий участок химерного полипептида МНС содержит внеклеточный домен

человеческого полипептида МНС, который ассоциируется с человеческим участком химерного полипептида Т-клеточного корецептора. Необязательно не относящееся к человеку животное также содержит человеческий или гуманизированный полипептид β2-микроглобулин.

- 5 Соответственно, в различных вариантах осуществления в изобретении по существу предложены генетически модифицированные не относящиеся к человеку животные, содержащие в геноме неперестроенные гуманизированные вариабельные локусы гена TCR, например неперестроенный человеческий вариабельный участок гена TCR, содержащий человеческие вариабельные сегменты TCR, способные к рекомбинации с 10 образованием перестроенной вариабельной последовательности гена TCR. Локус TCR или локус гена TCR (например, локус TCR α или локус TCR β) в настоящем документе означает геномную ДНК, содержащую кодирующий регион TCR, включающий весь кодирующий регион TCR, включая неперестроенные последовательности V(D)J, последовательность энхансера, константную (-ые) последовательность (-и) и любую 15 расположенную ближе к 5'-концу или ближе к 3'-концу (нетранслируемые области, регуляторные области и т.д.) или вставочную последовательность ДНК (интроны и т.д.). Вариабельный локус TCR, вариабельный участок TCR или вариабельный локус гена TCR (например, вариабельный локус гена TCR α или вариабельный локус гена TCR β) означает геномную ДНК, которая включает сегменты вариабельного участка 20 TCR (область V(D)J), но не включает константные последовательности TCR и в различных вариантах осуществления последовательности энхансера. Другие последовательности могут быть включены в вариабельный локус гена TCR с целью выполнения генетических манипуляций (например, кассеты селекции, сайты рестрикции и т.д.), и эти последовательности входят в объем настоящего изобретения.
- 25 Т-клетки связываются с эпитопами на небольших антигенных детерминантах на поверхности антигенпредставляющих клеток, которые ассоциированы с главным комплексом гистосовместимости (МНС; у мышей) или человеческим лейкоцитарным антигеном (HLA; у людей). Т-клетки связываются с этими эпитопами посредством Т-клеточного рецепторного (TCR) комплекса на поверхности Т-клетки. Т-клеточные 30 рецепторы представляют собой гетеродимерные структуры, состоящие из двух типов цепей: цепи α (альфа) и β (бета) или цепи γ (гамма) и δ (дельта). Цепь α кодируется последовательностью нуклеиновых кислот, расположенной в пределах локуса α (на человеческой или мышиной хромосоме 14), которая также охватывает весь локус δ, а цепь β кодируется последовательностью нуклеиновых кислот, расположенной в пределах 35 локуса β (на мышиной хромосоме 6 или человеческой хромосоме 7). Большинство Т-клеток имеют αβ-TCR; а меньшинство Т-клеток несут γδ-TCR. Взаимодействия TCR с молекулами МНС класса I (представляющими Т-клеткам CD8+) и МНС класса II (представляющими Т-клеткам CD4+) показаны на ФИГ. 1 (закрашенные символы обозначают нечеловеческие последовательности; заштрихованные обозначают 40 человеческие последовательности, показывающие один конкретный вариант осуществления белка TCR настоящего изобретения).
- 45 α- и β-полипептиды Т-клеточного рецептора (и аналогично γ- и δ-полипептиды) связаны друг с другом дисульфидным мостиком. Каждый из двух полипептидов, составляющих TCR, включает внеклеточный домен, содержащий константный и вариабельный участки, трансмембранный домен и цитоплазматический хвост (трансмембранный домен и цитоплазматический хвост также являются частью константного участка). Вариабельный участок TCR определяет антигенную специфичность рецептора и по аналогии с иммуноглобулинами содержит три области,

определяющие комплементарность (CDR). Также по аналогии с генами иммуноглобулина вариабельные локусы гена Т-клеточного рецептора (например, локусы TCR α и TCR β) содержат ряд неперестроенных сегментов V(D)J (вариабельный (V), соединительный (J) и, в TCR β и δ , дополнительный (D) сегменты). В процессе

5 развития Т-клетки в тимусе вариабельный локус гена TCR α подвергается перестройке таким образом, что конечная цепь α TCR кодируется специфической комбинацией сегментов VJ (последовательность Va/Ja); а вариабельный локус гена TCR β подвергается перестройке таким образом, что конечная цепь β TCR кодируется специфической комбинацией сегментов VDJ (последовательность V β /D β /J β).

10 Взаимодействия со стромой тимуса активируют тимоциты, которые проходят несколько стадий развития, характеризуемых экспрессией различных маркеров на клеточной поверхности. Обзор характеристик маркеров клеточной поверхности на различных этапах развития в тимусе представлен в таблице 1. Перестройка в вариабельном локусе гена TCR β начинается на стадии DN2 и завершается во время 15 стадии DN4, а перестройка вариабельного локуса гена TCR α происходит на стадии DP. После завершения перестройки локуса TCR β клетки экспрессируют на клеточной поверхности цепь β TCR, а также суррогатную цепь α , pT α . См. публикацию Janeway's Immunobiology, Chapter 7, 7th Ed., Murphy et al. eds., Garland Science, 2008.

20 **Таблица 1. Стадии развития Т-клеток в тимусе**

Стадия развития	DN1	DN2	DN3	DN4	DP	SP
Маркер (-ы)	CD44+/CD25-	CD44+/CD25+	CD44 ^{low} /CD25+	CD44-/CD25-	CD4+/CD8+	CD4+ или CD8+

Интактные Т-клетки CD4+ и CD8+ находятся в тимусе и попадают в периферические лимфоидные органы (например, селезенку), где при воздействии на них антигенов

30 активируется клonalное размножение и дифференцировка в ряд эффекторных Т-клеток (Teff), например цитотоксические Т-клетки, клетки T_{REG}, клетки T_{H17}, клетки T_{H1}, клетки T_{H2} и т.д. После инфицирования ряд Т-клеток сохраняется в виде Т-клеток памяти, которые могут быть двух типов: центральные Т-клетки памяти (Tcm) и

35 эффекторные Т-клетки памяти (Tem). Sallusto et al. (1999) Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions, Nature 401:708-12 и Commentary by Mackay (1999) Dual personality of memory T cells, Nature 401:659-60. Sallusto и коллеги предположили, что после первичного инфицирования клетки Tem представляют собой легкодоступный путь приморванных антигеном Т-клеток в

40 периферических тканях с эффекторными функциями, а клетки Tcm представляют собой приморванные антигеном Т-клетки в периферических лимфоидных органах, которые при вторичном введении антигена могут стать новыми эффекторными Т-клетками.

Хотя все Т-клетки памяти экспрессируют изоформу CD45RO рецептора CD45 (интактные Т-клетки экспрессируют изоформу CD45RA), Tcm характеризуются экспрессией L-селектина (также известного как CD62L) и CCR7+, которые играют важную роль в связывании и сигнализации в периферических лимфоидных органах и лимфатических узлах. Там же. Таким образом, все Т-клетки, обнаруживаемые в периферических лимфоидных органах (например, интактные Т-клетки, клетки Tcm и т.д.), экспрессируют CD62L. Известно, что, кроме CD45RO, все Т-клетки памяти экспрессируют ряд

различных маркеров клеточной поверхности, например CD44. Обзор различных маркеров клеточной поверхности на Т-клетках см. в Janeway's Immunobiology, Chapter 10, выше.

Хотя за распознавание антигена главным образом отвечает вариабельный домен

- 5 TCR, внеклеточный участок константного домена, а также трансмембранный и цитоплазматический домены TCR также выполняют важные функции. Полный рецепторный комплекс TCR включает не только полипептиды α и β или γ и δ ; необходимы дополнительные молекулы, такие как CD3 γ , CD3 δ и CD3 ϵ , а также гомодимер цепи ζ , ($\zeta\zeta$). После завершения перестройки TCR β (когда клетки
- 10 экспрессируют TCR $\beta/pT\alpha$) данный неполный комплекс TCR находится на клеточной поверхности вместе с CD3. TCR α (или pT α) на клеточной поверхности имеет в своем трансмембранном домене два щелочных остатка, один из которых мобилизует гетеродимер CD3 $\gamma\epsilon$, а другой мобилизует $\zeta\zeta$ с помощью соответствующих им кислых остатков. TCR β имеет в своем трансмембранном домене дополнительный щелочной
- 15 остаток, который, как считается, мобилизует гетеродимер CD3 $\delta\epsilon$. См., например, публикации Kuhns et al. (2006) Deconstructing the Form and Function of the TCR/CD3 Complex, Immunity 24:133-39; Wucherpfennig et al. (2009) Structural Biology of the T-cell Receptor: Insights into Receptor Assembly, Ligand Recognition, and Initiation of Signaling, Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2:a005140. Собранный комплекс, содержащий гетеродимер TCR $\alpha\beta$,
- 20 CD3 $\gamma\epsilon$, CD3 $\delta\epsilon$ и $\zeta\zeta$ экспрессируется на поверхности Т-клетки. Было выдвинуто предположение, что полярные остатки в трансмембранном домене служат для контроля качества на выходе из эндоплазматического ретикулума. Было продемонстрировано, что при отсутствии субъединиц CD3 TCR-цепи остаются в эндоплазматическом ретикулуме и нацеливаются для разрушения. См., например, публикацию Call and
- 25 Wucherpfennig (2005) The T Cell Receptor: Critical Role of the Membrane Environment in Receptor Assembly and Function, Annu. Rev. Immunol. 23:101-25.

Цепи CD3 и ζ собранного комплекса предоставляют компоненты для TCR-сигнализации, так как сам по себе гетеродимер TCR $\alpha\beta$ (или гетеродимер TCR $\gamma\delta$) не обладает способностью к передаче сигнала. Каждая цепь CD3 имеет один

- 30 иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM), а цепь ζ содержит три последовательных ITAM. ITAM содержат тирозиновые остатки, которые могут подвергаться фосфорилированию соответствующими киназами. Таким образом, собранный комплекс TCR-CD3 содержит 10 мотивов ITAM. См., например, публикацию Love and Hayes (2010) ITAM-Mediated Signaling by the T-Cell Antigen Receptor, Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2:e002485. После задействования TCR мотивы ITAM подвергаются фосфорилированию тирозинкиназами семейства Scr (Lck и Fyn), которые инициируют сигнальный каскад, приводящий к активации Ras, мобилизации кальция, перестройкам актинового цитоскелета и активации факторов транскрипции, и все это в конечном счете приводит к Т-клеточной дифференцировке, пролиферации и эффекторным
- 35 действиям. Там же, см. также Janeway's Immunobiology, выше; обе публикации включены в настоящий документ путем ссылки.

Кроме того, предполагается, что трансмембранный и цитоплазматический домены TCR β играют роль в митохондриальном нацеливании и индукции апоптоза. Фактически в тимоцитах находятся усеченные со стороны N-конца молекулы TCR β природного

- 45 происхождения. Shani et al. (2009) Incomplete T-cell receptor- β peptides target the mitochondrion and induce apoptosis, Blood 113:3530-41. Таким образом, константный участок TCR (который в различных вариантах осуществления содержит участок внеклеточного, а также трансмембранного и цитоплазматического доменов) выполняет

несколько важных функций, и в различных вариантах осуществления структуру этой области следует учитывать при создании гуманизированных TCR или экспрессирующих их генетически модифицированных не относящихся к человеку животных.

В данной области известны мыши, трансгенные по перестроенным

- 5 последовательностям Т-клеточного рецептора. Настоящее изобретение относится к генетически модифицированным не относящимся к человеку животным (например, грызунам, например крысам, мышам), которые содержат неперестроенные человеческие или гуманизированные Т-клеточные вариабельные локусы гена, способные перестраиваться с образованием последовательностей нуклеиновых кислот, которые
- 10 кодируют человеческие вариабельные домены Т-клеточного рецептора, включая животных, которые содержат Т-клетки, содержащие перестроенные человеческие вариабельные домены и нечеловеческие (например, мышиные или крысиные) константные участки. В настоящем изобретении также предложены не относящиеся к человеку животные (например, грызуны, например крысы, мыши), которые способны
- 15 продуцировать разнородный набор человеческих последовательностей вариабельного участка Т-клеточного рецептора. Таким образом, в настоящем изобретении предложены не относящиеся к человеку животные, которые экспрессируют TCR с полностью человеческими вариабельными доменами в ответ на введение интересующего антигена, которые связываются с эпитопом интересующего антигена. В некоторых вариантах
- 20 осуществления предложены не относящиеся к человеку животные, которые продуцируют разнородный набор Т-клеточных рецепторов, способных реагировать с различными антигенами, включая, без ограничений, антигены, представляемые АПК.

В одном варианте осуществления в изобретении предложены генетически модифицированные не относящиеся к человеку животные (например, грызуны, например 25 крысы или мыши), которые содержат в своем геноме неперестроенные человеческие сегменты вариабельного участка TCR (сегменты V(D)J), при этом неперестроенные человеческие сегменты вариабельного участка TCR замещают в эндогенном нечеловеческом (например, грызуна) вариабельном локусе гена TCR (например, вариабельном локусе гена TCR α , β , δ и/или γ) эндогенные нечеловеческие сегменты 30 вариабельного участка TCR. В одном варианте осуществления неперестроенный человеческий вариабельный локус гена TCR замещает эндогенный нечеловеческий вариабельный локус гена TCR.

В другом варианте осуществления в изобретении предложены генетически модифицированные не относящиеся к человеку животные (например, грызуны, например 35 крысы, мыши), которые содержат в своем геноме неперестроенные человеческие сегменты вариабельного участка TCR (сегменты V(D)J), при этом неперестроенные человеческие сегменты вариабельного участка TCR функционально связаны с нечеловеческой последовательностью гена константного участка TCR, что приводит к образованию гуманизированного локуса TCR, при этом гуманизированный локус 40 TCR находится в таком сайте в геноме, который отличен от эндогенного нечеловеческого локуса TCR. Таким образом, в одном варианте осуществления также предложено не относящееся к человеку животное (например, грызун, например мышь, крыса), содержащее трансген, который содержит неперестроенные человеческие сегменты вариабельного участка TCR, функционально связанные с нечеловеческой 45 последовательностью гена константного участка TCR.

В одном аспекте генетически модифицированные не относящиеся к человеку животные изобретения содержат в своем геноме человеческие сегменты вариабельного участка TCR, при этом сохраняя нечеловеческую(-ие) (например, грызуна, например

мыши, крысы) константную(-ые) последовательность(-и) гена TCR, которая(-ые) кодирует(-ют) константные домены TCR. В различных вариантах осуществления константный домен TCR включает трансмембранный домен и цитоплазматический хвост TCR. Таким образом, в различных вариантах осуществления настоящего изобретения генетически модифицированные не относящиеся к человеку животные сохраняют эндогенные нечеловеческие трансмембранный домен и цитоплазматический хвост TCR. В других вариантах осуществления не относящиеся к человеку животные содержат нечеловеческие неэндогенные константные последовательности гена TCR, например, кодирующие нечеловеческие неэндогенные трансмембранный домен и цитоплазматический хвост TCR. Как указано выше, константный домен TCR участвует в сигнальном каскаде, запущенном в процессе активации приморованной антигеном Т-клетки. Таким образом, эндогенный константный домен TCR взаимодействует с разнообразными нечеловеческими якорными и сигнальными белками в Т-клетке. Таким образом, в одном аспекте генетически модифицированные не относящиеся к человеку животные изобретения экспрессируют гуманизированные Т-клеточные рецепторы, которые сохраняют способность мобилизовать разнообразные эндогенные нечеловеческие якорные или сигнальные молекулы, например молекулы CD3 (например, CD3 γ , CD3 δ , CD3 ε), цепь ζ , Lck, Fyn, ZAP-70 и т.д. Не имеющий ограничительного характера список молекул, которые мобилизуются к комплексу TCR, описан в публикации Janeway's Immunobiology, выше. Считается, что возможность протекания процессов развития и дифференцировки Т-клеток у не относящихся к человеку животных и формирования устойчивого иммунного ответа может быть по меньшей мере частично связана с включением вариабельных участков в эндогенные мышиные локусы и сохранением мышиных константных доменов.

В некоторых вариантах осуществления предложено не относящееся к человеку животное, которое содержит в своем геноме неперестроенные человеческие сегменты вариабельного участка TCR α , при этом неперестроенные человеческие сегменты вариабельного участка TCR α функционально связаны с нечеловеческой последовательностью гена константного участка TCR α , что приводит к образованию гуманизированного локуса TCR α . В одном варианте осуществления гуманизированный локус TCR α находится в таком сайте в геноме, который не является эндогенным нечеловеческим локусом TCR α . В другом варианте осуществления неперестроенные человеческие сегменты вариабельного участка TCR α замещают эндогенные нечеловеческие сегменты вариабельного участка TCR α , при этом сохраняется(-ются) эндогенная(-ые) нечеловеческая(-ие) последовательность(-и) гена константного участка TCR α . В одном варианте осуществления неперестроенный человеческий вариабельный локус гена TCR α замещает эндогенный нечеловеческий вариабельный локус гена TCR α . В некоторых вариантах осуществления замещение эндогенного нечеловеческого локуса гена вариабельного участка TCR α неперестроенным человеческим вариабельным локусом гена TCR α включает делению или инактивацию вариабельного локуса гена TCR δ . В других вариантах осуществления замещение эндогенного нечеловеческого локуса гена вариабельного участка TCR α неперестроенным человеческим локусом гена TCR α включает замещение эндогенного вариабельного локуса гена TCR δ неперестроенными человеческими сегментами вариабельного участка TCR δ . В некоторых вариантах осуществления животное сохраняет эндогенные последовательности гена вариабельного участка и константного участка TCR β . Таким образом, у животного экспрессируется TCR, который содержит химерную человеческую/нечеловеческую (т.е. гуманизированную) цепь α TCR и нечеловеческую цепь β TCR.

В некоторых вариантах осуществления предложено не относящееся к человеку животное, которое содержит в своем геноме неперестроенные человеческие сегменты вариабельного участка TCRδ, при этом неперестроенные человеческие сегменты вариабельного участка TCRδ функционально связаны с нечеловеческой

- 5 последовательностью гена константного участка TCRδ, что приводит к образованию гуманизированного локуса TCRδ. В одном варианте осуществления гуманизированный локус TCRδ находится в таком сайте в геноме, который не является эндогенным нечеловеческим локусом TCRδ. В другом варианте осуществления неперестроенные человеческие сегменты вариабельного участка TCRδ замещают эндогенные
- 10 нечеловеческие сегменты вариабельного участка TCRδ, при этом сохраняется(-ются) эндогенная(-ые) нечеловеческая(-ие) последовательность(-и) гена константного участка TCRδ. В одном варианте осуществления неперестроенный человеческий вариабельный локус гена TCRδ замещает эндогенный нечеловеческий вариабельный локус гена TCRδ.

В других вариантах осуществления предложено не относящееся к человеку животное,

- 15 которое содержит в своем геноме неперестроенные человеческие сегменты вариабельного участка TCRβ, при этом неперестроенные человеческие сегменты вариабельного участка TCRβ функционально связаны с нечеловеческой последовательностью гена константного участка TCRβ, что приводит к образованию гуманизированного локуса TCRβ. В одном варианте осуществления гуманизированный локус TCRβ находится в таком сайте в геноме, который не является эндогенным нечеловеческим локусом TCRβ. В другом варианте осуществления неперестроенные человеческие сегменты вариабельного участка TCRβ замещают эндогенные нечеловеческие сегменты вариабельного участка TCRβ, при этом сохраняется(-ются) эндогенная(-ые) нечеловеческая(-ие) последовательность(-и) гена константного участка
- 25 TCRβ. В одном варианте осуществления неперестроенный человеческий вариабельный локус гена TCRβ замещает эндогенный нечеловеческий вариабельный локус гена TCRβ. В некоторых вариантах осуществления животное сохраняет эндогенные последовательности гена вариабельного участка и константного участка TCRα. Таким образом, у животного экспрессируется TCR, который содержит химерную человеческую/ нечеловеческую (т.е. гуманизированную) цепь β TCR и нечеловеческую цепь α TCR.

В некоторых конкретных вариантах осуществления в изобретении предложено генетически модифицированное не относящееся к человеку животное (например, грызун, например мышь или крыса), которое содержит в своем геноме: (а) неперестроенный вариабельный локус гена Т-клеточного рецептора (TCR) α, содержащий по меньшей

- 35 мере один человеческий сегмент Vα и по меньшей мере один человеческий сегмент Jα, функционально связанные с эндогенной(-ыми) нечеловеческой(-ими) (например, грызуна, например мыши или крысы) константной(-ыми) последовательностью(-ями) гена TCRα; (б) неперестроенный вариабельный локус гена TCRβ, содержащий по меньшей мере один человеческий сегмент Vβ, по меньшей мере один человеческий сегмент Dβ и по
- 40 меньшей мере один человеческий сегмент Jβ, функционально связанные с эндогенной (-ыми) нечеловеческой(-ими) (например, грызуна, например мыши или крысы) последовательностью(-ями) гена константного участка TCRβ; и/или (с) неперестроенный вариабельный локус гена TCRδ, содержащий по меньшей мере один человеческий сегмент Vδ, по меньшей мере один человеческий сегмент Dδ и по меньшей мере один
- 45 человеческий сегмент Jδ, функционально связанные с эндогенной нечеловеческой (например, грызуна, например мыши или крысы) последовательностью гена константного участка TCRδ. Другое не относящееся к человеку животное, предложенное в настоящем документе, содержит в своем геноме: (а) неперестроенный вариабельный

локус гена Т-клеточного рецептора (TCR) α , содержащий по меньшей мере один человеческий сегмент $V\alpha$ и по меньшей мере один человеческий сегмент $J\alpha$, функционально связанные с эндогенной(-ыми) нечеловеческой(-ими) (например, грызуна, например мыши или крысы) константной(-ыми) последовательностью(-ями) гена TCR α ;

5 (b) неперестроенный вариабельный локус гена TCR β , содержащий по меньшей мере один человеческий сегмент $V\beta$, по меньшей мере один человеческий сегмент $D\beta$ и по меньшей мере один человеческий сегмент $J\beta$, функционально связанные с эндогенной (-ыми) нечеловеческой(-ими) (например, грызуна, например мыши или крысы) последовательностью(-ями) гена константного участка TCR β ; (c) неперестроенный

10 вариабельный локус гена TCR δ , содержащий по меньшей мере один человеческий сегмент $V\delta$, по меньшей мере один человеческий сегмент $D\delta$ и по меньшей мере один человеческий сегмент $J\delta$, функционально связанные с эндогенной(-ыми) нечеловеческой (-ими) (например, грызуна, например мыши или крысы) последовательностью(-ями) гена константного участка TCR δ ; и/или (d) неперестроенный вариабельный локус гена

15 TCR γ , содержащий по меньшей мере один человеческий сегмент $V\gamma$ и по меньшей мере один человеческий сегмент $J\gamma$, функционально связанные с эндогенной нечеловеческой (например, грызуна, например мыши или крысы) последовательностью гена константного участка TCR γ .

В различных вариантах осуществления изобретения неперестроенный человеческий

20 или гуманизированный вариабельный локус гена TCR (например, вариабельный локус гена TCR α , TCR β и/или TCR δ) содержится в зародышевой линии не относящегося к человеку животного (например, грызуна, например мыши или крысы). В различных вариантах осуществления замещения сегментов TCR V(D)J неперестроенными человеческими сегментами TCR V(D)J (например, сегментами $V\alpha$ и $J\alpha$; $V\beta$ и $D\beta$ и $J\beta$; $V\delta$ 25 и $D\delta$ и $J\delta$; $V\gamma$ и $J\gamma$) выполняют в эндогенном нечеловеческом вариабельном локусе (или локусах) TCR, при этом неперестроенные человеческие сегменты V и J и/или V и D и J функционально связаны с нечеловескими последовательностями гена константного участка TCR.

В некоторых вариантах осуществления изобретения не относящееся к человеку

30 животное содержит две копии неперестроенного человеческого или гуманизированного вариабельного локуса гена TCR α , две копии неперестроенного человеческого или гуманизированного вариабельного локуса гена TCR β и/или две копии неперестроенного человеческого или гуманизированного вариабельного локуса гена TCR δ . Таким образом, не относящееся к человеку животное является гомозиготным по одному или более 35 неперестроенным человеческим или гуманизированным вариабельным локусам гена TCR α , TCR β и/или TCR δ . В некоторых вариантах осуществления изобретения не относящееся к человеку животное содержит одну копию неперестроенного человеческого или гуманизированного вариабельного локуса гена TCR α , одну копию неперестроенного человеческого или гуманизированного вариабельного локуса гена

40 TCR β и/или одну копию неперестроенного человеческого или гуманизированного вариабельного локуса гена TCR δ . Таким образом, не относящееся к человеку животное является гетерозиготным по неперестроенному человеческому или гуманизированному вариабельному локусу гена TCR α , TCR β и/или TCR δ . В другом варианте осуществления 45 не относящееся к человеку животное является гетерозиготным или гомозиготным по неперестроенному человеческому или гуманизированному вариабельному локусу гена TCR γ .

В одном варианте осуществления неперестроенный вариабельный локус гена TCR α , содержащий человеческие сегменты вариабельного участка (например, человеческие

сегменты $V\alpha$ и $J\alpha$) расположены в нечеловеческом геноме таким образом, что человеческие сегменты вариабельного участка замещают соответствующие нечеловеческие сегменты вариабельного участка. В одном варианте осуществления неперестроенный вариабельный локус гена $TCR\alpha$, содержащий человеческие сегменты вариабельного участка, замещает эндогенные вариабельные локусы гена $TCR\alpha$. В одном аспекте эндогенные нечеловеческие сегменты $V\alpha$ и $J\alpha$ неспособны к перестройке с образованием перестроенной последовательности $V\alpha/J\alpha$. Таким образом, в одном аспекте человеческие сегменты $V\alpha$ и $J\alpha$ в неперестроенном вариабельном локусе гена $TCR\alpha$ способны к перестройке с образованием перестроенной человеческой последовательности $V\alpha/J\alpha$.

Аналогичным образом, в одном варианте осуществления неперестроенный вариабельный локус гена $TCR\beta$, содержащий человеческие сегменты вариабельного участка (например, человеческие сегменты $V\beta$, $D\beta$ и $J\beta$), расположен в нечеловеческом геноме таким образом, что человеческие сегменты вариабельного участка замещают соответствующие нечеловеческие сегменты вариабельного участка. В одном варианте осуществления неперестроенный вариабельный локус гена $TCR\beta$, содержащий человеческие сегменты вариабельного участка, замещает эндогенный вариабельный локус гена $TCR\beta$. В одном аспекте эндогенные нечеловеческие сегменты $V\beta$, $D\beta$ и $J\beta$ способны к перестройке с образованием перестроенной последовательности $V\beta/D\beta/J\beta$. Таким образом, в одном аспекте человеческие сегменты $V\beta$, $D\beta$ и $J\beta$ в неперестроенном вариабельном локусе гена $TCR\beta$ способны к перестройке с образованием перестроенной человеческой последовательности $V\beta/D\beta/J\beta$.

В одном варианте осуществления неперестроенный вариабельный локус гена $TCR\delta$, содержащий человеческие сегменты вариабельного участка (например, человеческие сегменты $V\delta$, $D\delta$ и $J\delta$), расположен в нечеловеческом геноме таким образом, что человеческие сегменты вариабельного участка замещают соответствующие нечеловеческие сегменты вариабельного участка. В одном варианте осуществления неперестроенный вариабельный локус гена $TCR\delta$, содержащий человеческие сегменты вариабельного участка, замещает эндогенный вариабельный локус гена $TCR\delta$. В одном аспекте эндогенные нечеловеческие сегменты $V\delta$, $D\delta$ и $J\delta$ неспособны к перестройке с образованием перестроенной последовательности $V\delta/D\delta/J\delta$. Таким образом, в одном аспекте человеческие сегменты $V\delta$, $D\delta$ и $J\delta$ в неперестроенном вариабельном локусе гена $TCR\delta$ способны к перестройке с образованием перестроенной человеческой последовательности $V\delta/D\delta/J\delta$.

В одном варианте осуществления неперестроенный вариабельный локус гена $TCR\gamma$, содержащий человеческие сегменты вариабельного участка (например, человеческие сегменты $V\gamma$ и $J\gamma$), расположен в нечеловеческом геноме таким образом, что человеческие сегменты вариабельного участка замещают соответствующие нечеловеческие сегменты вариабельного участка. В одном варианте осуществления неперестроенный вариабельный локус гена $TCR\gamma$, содержащий человеческие сегменты вариабельного участка, замещает эндогенный вариабельный локус гена $TCR\gamma$. В одном аспекте эндогенные нечеловеческие сегменты $V\gamma$ и $J\gamma$ неспособны к перестройке с образованием перестроенной последовательности $V\gamma/J\gamma$. Таким образом, в одном аспекте человеческие сегменты $V\gamma$ и $J\gamma$ в неперестроенном вариабельном локусе гена $TCR\gamma$ способны к перестройке с образованием перестроенной человеческой последовательности $V\gamma/J\gamma$.

В еще одном варианте осуществления неперестроенные вариабельные локусы гена $TCR\alpha$, β , δ и/или γ , содержащие человеческие сегменты вариабельного участка, замещают соответствующие эндогенные вариабельные локусы гена $TCR\alpha$, β , δ и γ . В одном аспекте

эндогенные нечеловеческие сегменты V α и J α неспособны к перестройке с образованием перестроенной последовательности V α /J α , эндогенные нечеловеческие сегменты V β , D β и J β неспособны к перестройке с образованием перестроенной последовательности V β /D β /J β , эндогенные сегменты V δ , D δ и J δ неспособны к перестройке с образованием перестроенной последовательности V δ /D δ /J δ и/или эндогенные сегменты V γ и J γ неспособны к перестройке с образованием перестроенной последовательности V γ /J γ . Таким образом, в одном аспекте человеческие сегменты V α и J α в неперестроенном вариабельном локусе гена TCR α способны к перестройке с образованием перестроенной человеческой последовательности V α /J α , человеческие сегменты V β , D β и J β в неперестроенном вариабельном локусе гена TCR β способны к перестройке с образованием перестроенной человеческой последовательности V β /D β /J β человеческие сегменты V δ , D δ и J δ в неперестроенном вариабельном локусе гена TCR δ способны к перестройке с образованием перестроенной человеческой последовательности V δ /D δ /J δ и/или человеческие сегменты V γ и J γ в неперестроенном вариабельном локусе гена TCR γ способны к перестройке с образованием перестроенной человеческой последовательности V γ /J γ .

В некоторых аспектах изобретения не относящееся к человеку животное, содержащее гуманизированный локус гена TCR α , TCR β и/или TCR δ (содержащий неперестроенный человеческий вариабельный локус гена TCR α , TCR β и/или TCR δ), сохраняет эндогенный нечеловеческий вариабельный локус гена TCR α , TCR β и/или TCR δ . В одном варианте осуществления эндогенный нечеловеческий вариабельный локус гена TCR α , TCR β и/или TCR δ представляет собой нефункциональный локус. В одном варианте осуществления нефункциональный локус представляет собой инактивированный локус, например инвертированный локус (например, кодирующая последовательность нукleinовых кислот вариабельного локуса гена находится в инвертированной ориентации по отношению к последовательности константной области так, что успешные перестройки не могут быть выполнены с использованием сегментов вариабельного участка из инвертированного локуса). В одном варианте осуществления гуманизированный вариабельный локус гена TCR α , TCR β и/или TCR δ расположен между эндогенным нечеловеческим вариабельным локусом гена TCR α , TCR β и/или TCR δ и эндогенным нечеловеческим константным локусом гена TCR α , TCR β и/или TCR δ соответственно. Аналогичные хромосомные перестройки могут быть выполнены для размещения человеческого или гуманизированного TCR γ в геном не относящегося к человеку животного, например, в локусе TCR γ .

Количество, номенклатура, положение, а также другие аспекты сегментов V и J и/или V, D и J человеческих и мышиных локусов TCR могут быть установлены с использованием базы данных IMGT, доступной на веб-сайте Международной иммуногенетической информационной системы (IMGT). Мышиный вариабельный локус TCR α имеет размер приблизительно 1,5 м. п. н. и содержит всего 110 сегментов V α и 60 сегментов J α . Человеческий вариабельный локус TCR α имеет размер приблизительно 1 м. п. н. и содержит всего 54 сегмента V α и 61 сегмент J α , при этом 45 V α и 50 J α считаются функциональными. Если не указано иное, количества человеческих сегментов V(D)J, упоминаемые в тексте описания, относятся к общему количеству сегментов V(D)J. В одном варианте осуществления изобретения генетически модифицированное не относящееся к человеку животное (например, грызун, например мышь или крыса) содержит по меньшей мере один человеческий сегмент V α и по меньшей мере один человеческий сегмент J α . В одном варианте осуществления не относящееся к человеку животное содержит гуманизированный локус TCR α , который содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6,

7, 8, 9, 10, 15, 20, 23, 25, 30, 35, 40, 45, 48, 50 или до 54 человеческих сегментов Va. В некоторых вариантах осуществления гуманизированный локус TCR α содержит 2, 8, 23, 35, 48 или 54 человеческих сегмента Va. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления гуманизированный локус TCR α у не относящегося к человеку животного может содержать 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 99% или 100% человеческих Va; в некоторых вариантах осуществления он может содержать приблизительно 2%, приблизительно 3%, приблизительно 15%, приблизительно 65%, приблизительно 90% или 100% человеческих Va.

- 10 В одном варианте осуществления не относящееся к человеку животное содержит гуманизированный локус TCR α , который содержит фрагмент ДНК, содержащий непрерывную человеческую последовательность из человеческих Va40-Va41 (сегмент Va также обозначается как TRAV или TCRAV), и фрагмент ДНК, содержащий непрерывную человеческую последовательность из 61 человеческого сегмента Ja
- 15 (сегмент Ja также обозначается как TRAJ или TCRAJ). В одном варианте осуществления не относящееся к человеку животное содержит гуманизированный локус TCR α , который содержит фрагмент ДНК, содержащий непрерывную человеческую последовательность из человеческих TRAV35-TRAV41, и фрагмент ДНК, содержащий непрерывную человеческую последовательность из 61 человеческого TRAJ. В одном варианте
- 20 осуществления не относящееся к человеку животное содержит гуманизированный локус TCR α , который содержит фрагмент ДНК, содержащий непрерывную человеческую последовательность из человеческих TRAV22-TRAV41, и фрагмент ДНК, содержащий непрерывную человеческую последовательность из 61 человеческого TRAJ. В одном варианте осуществления не относящееся к человеку животное содержит
- 25 гуманизированный локус TCR α , который содержит фрагмент ДНК, содержащий непрерывную человеческую последовательность из человеческих TRAV13-2-TRAV41, и фрагмент ДНК, содержащий непрерывную человеческую последовательность из 61 человеческого TRAJ. В одном варианте осуществления не относящееся к человеку животное содержит гуманизированный локус TCR α , который содержит фрагмент ДНК,
- 30 содержащий непрерывную человеческую последовательность из человеческих TRAV6-TRAV41 и 61 человеческого TRAJ. В одном варианте осуществления не относящееся к человеку животное содержит гуманизированный локус TCR α , который содержит фрагмент ДНК, содержащий непрерывную человеческую последовательность из человеческих TRAV1-1-TRAV41 и 61 человеческого TRAJ. В различных вариантах
- 35 осуществления фрагменты ДНК, содержащие непрерывные человеческие последовательности из человеческих сегментов вариабельного участка TCR α , также содержат сайты рестрикционных ферментов, кассеты селекции, сайты эндонуклеаз и другие сайты, вставленные для содействия клонированию и селекции в процессе гуманизации локуса. В различных вариантах осуществления эти дополнительные сайты
- 40 не нарушают надлежащее функционирование (например, перестройку, сплайсинг и т.д.) различных генов в локусе TCR α .

В одном варианте осуществления гуманизированный локус TCR α содержит 61 человеческий сегмент Ja или 100% человеческих сегментов Ja. В конкретном варианте осуществления гуманизированный локус TCR α содержит 8 человеческих сегментов Va или 61 человеческий сегмент Ja; в другом конкретном варианте осуществления гуманизированный локус TCR α содержит 23 человеческих сегмента Va или 61 человеческий сегмент Ja. В другом конкретном варианте осуществления гуманизированный локус TCR α содержит полный набор человеческих сегментов Va и

Ja, т.е. все человеческие сегменты гена вариабельного а-участка, кодируемые локусом а, или 54 человеческих сегмента V α , или 61 человеческий сегмент Ja. В различных вариантах осуществления не относящееся к человеку животное не содержит каких-либо нечеловеческих сегментов V α или Ja в локусе TCR α .

- 5 Мышиный вариабельный локус TCR β имеет размер приблизительно 0,6 м. п. н. и содержит всего 33 сегмента V β , 2 сегмента D β и 14 сегментов J β . Человеческий вариабельный локус TCR β имеет размер приблизительно 0,6 м. п. н. и содержит всего 67 сегментов V β , 2 сегмента D β и 14 сегментов J β . В одном варианте осуществления изобретения генетически модифицированное не относящееся к человеку животное
- 10 (например, грызун, например мышь или крыса) содержит по меньшей мере один человеческий сегмент V β , по меньшей мере один человеческий сегмент D β и по меньшей мере один человеческий сегмент J α . В одном варианте осуществления не относящееся к человеку животное содержит гуманизированный локус TCR β , который содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 23, 25, 30, 35, 40, 45, 48, 50, 55, 60 или до 67 человеческих
- 15 сегментов V β . В некоторых вариантах осуществления гуманизированный локус TCR β содержит 8, 14, 40, 66 или 67 человеческих сегментов V β . Таким образом, в некоторых вариантах осуществления гуманизированный локус TCR β у не относящегося к человеку животного может содержать 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 99% или 100% человеческих
- 20 V β ; в некоторых вариантах осуществления он может содержать приблизительно 20%, приблизительно 60%, приблизительно 15%, приблизительно 98% или 100% человеческих V β .

- 25 В одном варианте осуществления не относящееся к человеку животное содержит гуманизированный локус TCR β , который содержит фрагмент ДНК, содержащий непрерывную человеческую последовательность из человеческих V β 18-V β 29-1 (сегмент V β также обозначается как TRBV или TCRBV). В одном варианте осуществления не относящееся к человеку животное содержит гуманизированный локус TCR β , который содержит фрагмент ДНК, содержащий непрерывную человеческую последовательность из человеческих TRBV18-TRBV29-1, отдельный фрагмент ДНК, содержащий непрерывную человеческую последовательность из человеческих D β 1-J β 1 (т.е. человеческих сегментов D β 1-J β 1-J β 1-6), и отдельный фрагмент ДНК, содержащий непрерывную человеческую последовательность из человеческих D β 2-J β 2 (т.е. человеческих сегментов D β 2-J β 2-1-J β 2-7). В одном варианте осуществления не относящееся к человеку животное содержит гуманизированный локус TCR β , который
- 30 содержит фрагмент ДНК, содержащий непрерывную человеческую последовательность из человеческих TRBV6-5-TRBV29-1, отдельный фрагмент ДНК, содержащий непрерывную человеческую последовательность из человеческих D β 1-J β 1 (т.е. человеческих сегментов D β 1-J β 1-1-J β 1-6), и отдельный фрагмент ДНК, содержащий непрерывную человеческую последовательность из человеческих D β 2-J β 2 (т.е.
- 35 человеческих сегментов D β 2-H β 2-1-J β 2-7). В одном варианте осуществления не относящееся к человеку животное содержит гуманизированный локус TCR β , который содержит фрагмент ДНК, содержащий непрерывную человеческую последовательность из человеческих TRBV1-TRBV29-1, отдельный фрагмент ДНК, содержащий непрерывную человеческую последовательность из человеческих D β 1-J β 1, и отдельный фрагмент
- 40 ДНК, содержащий непрерывную человеческую последовательность из человеческих D β 2-J β 2. В одном варианте осуществления не относящееся к человеку животное содержит гуманизированный локус TCR β , который содержит фрагмент ДНК, содержащий непрерывную человеческую последовательность из человеческих TRBV1-TRBV29-1,
- 45

отдельный фрагмент ДНК, содержащий непрерывную человеческую последовательность из человеческих D β 1-J β 1, отдельный фрагмент ДНК, содержащий непрерывную человеческую последовательность из человеческих D β 2-J β 2 и отдельный фрагмент ДНК, содержащий последовательность человеческого TRBV30. В различных вариантах

- 5 осуществления фрагменты ДНК, содержащие непрерывные человеческие последовательности из человеческих сегментов вариабельного участка TCR β , также содержат сайты рестрикционных ферментов, кассеты селекции, сайты эндонуклеаз и другие сайты, вставленные для содействия клонированию и селекции в процессе гуманизации локуса. В различных вариантах осуществления эти дополнительные сайты
- 10 не нарушают надлежащее функционирование (например, перестройку, сплайсинг и т.д.) различных генов в локусе TCR β .

В одном варианте осуществления гуманизированный локус TCR β содержит 14 человеческих сегментов J β или 100% человеческих сегментов J β и 2 человеческих сегмента D β или 100% человеческих сегментов J β . В другом варианте осуществления

- 15 гуманизированный локус TCR β содержит по меньшей мере один человеческий сегмент V β , например 14 человеческих сегментов V β , и все мышиные сегменты D β и J β . В конкретном варианте осуществления гуманизированный локус TCR β содержит 14 человеческих сегментов V β , 2 человеческих сегмента D β или 14 человеческих сегментов J β . В другом конкретном варианте осуществления гуманизированный локус TCR β
- 20 содержит полный набор человеческих сегментов V β , D β и J β , т.е. все человеческие сегменты гена вариабельного участка β , кодируемые локусом β , или 67 человеческих сегментов V β , 2 человеческих D β или 14 человеческих сегментов J β . В одном варианте осуществления не относящееся к человеку животное содержит один (например, 5') нечеловеческий сегмент V β в гуманизированном локусе TCR β . В различных вариантах
- 25 осуществления не относящееся к человеку животное не содержит каких-либо нечеловеческих сегментов V β , D β или J β в локусе TCR β .

В различных вариантах осуществления, в которых не относящееся к человеку животное (например, грызун) содержит набор сегментов вариабельного участка человеческих TCR α и TCR β (и необязательно человеческих TCR δ и TCR γ) (например,

- 30 полный набор сегментов вариабельного участка), набор различных сегментов (например, полный набор различных сегментов) используется животным для продукции разнородного набора молекул TCR для различных антигенов.

В различных аспектах не относящиеся к человеку животные содержат непрерывные участки человеческих геномных вариабельных локусов TCR, которые содержат сегменты

- 35 V, D и J, или D и J, или V и J, или V, сгруппированные так же, как в неперестроенном человеческом геномном вариабельном локусе, например содержащие промоторные последовательности, лидерные последовательности, межгенные последовательности, регуляторные последовательности и т.д., сгруппированные так же, как в человеческом геномном вариабельном локусе TCR. В других аспектах различные сегменты
- 40 сгруппированы так же, как в неперестроенном нечеловеческом геномном вариабельном локусе TCR. В различных вариантах осуществления гуманизированного локуса TCR α , β , δ и/или γ гуманизированный локус может содержать два или более геномных сегмента, которые не располагаются в человеческом геноме рядом друг с другом, например, фрагмент сегментов V человеческого вариабельного локуса, расположенный
- 45 в человеческом геноме проксимально по отношению к константному участку, может располагаться рядом с фрагментом сегментов V человеческого вариабельного локуса, расположенного в человеческом геноме на 5'-конце человеческого вариабельного локуса.

Как у мыши, так и у человека сегменты гена TCRδ расположены с локусом TCRα (см. ФИГ. 4А сверху, область TCRD заключена в рамку). Сегменты J и D TCRδ расположены между сегментами Vα и Jα, а сегменты V TCRδ разбросаны по всему локусу TCRα, причем большинство расположено среди различных сегментов Vα.

5 Количество и местоположения различных сегментов TCRδ можно определить по базе данных IMGT. В связи с расположением в геноме сегментов гена TCRδ в пределах локуса TCRα успешная перестройка в локусе TCRα может привести к делеции или инактивации сегментов гена TCRδ.

В некоторых вариантах осуществления изобретения не относящееся к человеку

10 животное, содержащее неперестроенный человеческий вариабельный локус гена TCRα, также содержит по меньшей мере один человеческий сегмент Vδ, например вплоть до полного набора человеческих сегментов Vδ. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления замещение эндогенного вариабельного локуса гена TCRα приводит к замещению по меньшей мере одного нечеловеческого сегмента Vδ человеческим

15 сегментом Vδ. В других вариантах осуществления не относящееся к человеку животное изобретения содержит полный набор человеческих сегментов Vδ, Dδ и Jδ в неперестроенном гуманизированном локусе TCRα; в других вариантах осуществления не относящееся к человеку животное содержит полный неперестроенный человеческий локус TCRδ в неперестроенном гуманизированном локусе TCRα (т.е. локус TCRδ,

20 включая человеческие сегменты вариабельного участка, а также человеческие энхансер и константный участок). Пример осуществления для конструирования неперестроенного гуманизированного локуса TCRα, содержащего полный неперестроенный локус TCRδ, показан в патенте США №9,113,616, включенном в настоящий документ путем ссылки.

В еще одном варианте осуществления не относящееся к человеку животное

25 изобретения дополнительно содержит неперестроенный гуманизированный локус TCRγ, например локус TCRγ, содержащий по меньшей мере один человеческий сегмент Vγ и по меньшей мере один человеческий сегмент Jγ (например, полный набор человеческих сегментов вариабельного участка Vγ и Jγ). Человеческий локус TCRγ находится на человеческой хромосоме 7, а мышний локус TCRγ находится на мышной хромосоме

30 13. Более подробная информация о локусе TCRγ представлена в базе данных IMGT.

В одном аспекте не относящееся к человеку животное (например, грызун, например мышь или крыса), содержащее гуманизированные вариабельные локусы гена TCRα и β (и необязательно гуманизированные вариабельные локусы гена TCRδ/γ), описанные в настоящем документе, экспрессирует на поверхности Т-клетки гуманизированный

35 Т-клеточный рецептор, содержащий человеческий вариабельный участок и нечеловеческий (например, грызуна, например мыши или крысы) константный участок. В некоторых аспектах не относящееся к человеку животное может экспрессировать или экспрессирует разнородный набор гуманизированных Т-клеточных рецепторов, которые распознают множество представленных антигенов.

40 В различных вариантах осуществления изобретения гуманизированные полипептиды Т-клеточного рецептора, описанные в настоящем документе, содержат человеческие лидерные последовательности. В альтернативных вариантах осуществления гуманизированные последовательности нуклеиновых кислот рецептора TCR созданы таким образом, что гуманизированные полипептиды TCR содержат нечеловеческие лидерные последовательности.

45 Гуманизированные полипептиды TCR, описанные в настоящем документе, могут экспрессироваться под контролем эндогенных нечеловеческих регуляторных элементов (например, регуляторных элементов грызуна), например промотора, сайленсера,

энхансера и т.д. Гуманизированные полипептиды TCR, описанные в настоящем документе, могут альтернативно экспрессироваться под контролем человеческих регуляторных элементов. В различных вариантах осуществления не относящиеся к человеку животные, описанные в настоящем документе, дополнительно содержат все 5 регуляторные и другие последовательности, в норме обнаруживаемые *in situ* в человеческом геноме.

В различных вариантах осуществления человеческий вариабельный участок гуманизированного белка TCR способен взаимодействовать с различными белками на поверхности той же клетки или другой клетки. В одном варианте осуществления 10 человеческий вариабельный участок гуманизированного TCR взаимодействует с белками МНС (например, белками МНС класса I или II), представляющими антигены на поверхности второй клетки, например антигенпредставляющей клетки (АПК). В некоторых вариантах осуществления белок МНС I или II представляет собой 15 нечеловеческий белок (например, грызуна, например мыши или крысы). В других вариантах осуществления белок МНС I или II представляет собой человеческий (гуманизированный) белок. В одном аспекте вторая клетка, например АПК, представляет собой эндогенную нечеловеческую клетку, экспрессирующую человеческую или гуманизированную молекулу МНС. В другом варианте осуществления вторая 20 клетка представляет собой человеческую клетку, экспрессирующую человеческую молекулу МНС.

В одном аспекте у не относящегося к человеку животного на поверхности Т-клетки экспрессируется гуманизированный Т-клеточный receptor с нечеловеческим константным участком, причем receptor способен взаимодействовать с нечеловеческими молекулами, например якорными или сигнальными молекулами, экспрессирующимиися 25 в Т-клетке (например, молекулами CD3, цепью ζ , или другими белками, присоединенными к TCR посредством молекул CD3 или цепи ζ). Таким образом, в одном аспекте предложен клеточный комплекс, содержащий: (a) нечеловеческую Т-клетку, которая экспрессирует: (i) TCR, который содержит гуманизированную цепь α TCR, описанную в настоящем документе, и гуманизированную цепь β TCR, описанную 30 в настоящем документе; и (ii) химерный корецептор, описанный в настоящем документе; и (b) нечеловеческую антигенпредставляющую клетку, содержащую антиген, связанный с химерным МНС I и/или химерным МНС II, описанным в настоящем документе. В одном варианте осуществления нечеловеческие константные цепи TCR α и TCR β находятся в комплексе с нечеловеческими гомодимером зета (ζ) цепи и гетеродимерами 35 CD3. В одном варианте осуществления клеточный комплекс представляет собой клеточный комплекс *in vivo*. В одном варианте осуществления клеточный комплекс представляет собой клеточный комплекс *in vitro*.

В различных вариантах осуществления не относящиеся к человеку животные (например, грызуны, например мыши или крысы), описанные в настоящем документе, 40 производят Т-клетки, которые способны подвергаться дифференцировке в тимусе, превращаясь из Т-клеток SP DN1 в DN2, в DN3, в DN4, в DP и в CD4 или CD8. Такие Т-клетки не относящиеся к человеку животного изобретения экспрессируют молекулы клеточной поверхности, в норме производимые Т-клеткой во время конкретной стадии дифференцировки в тимусе (например, CD25, CD44, Kit, CD3, pTa и т.д.). Таким образом, 45 в одном варианте осуществления не относящиеся к человеку животные, описанные в настоящем документе, могут экспрессировать pTa в комплексе с TCR β на стадии DN3 дифференцировки в тимусе. Не относящиеся к человеку животные, описанные в настоящем документе, экспрессируют Т-клетки, способные подвергаться

дифференцировке в тимусе с образованием Т-клеток CD4+ и CD8+.

В различных вариантах осуществления не относящиеся к человеку животные, описанные в настоящем документе, продуцируют Т-клетки, которые способны подвергаться Т-клеточной дифференцировке в периферических органах. В некоторых 5 вариантах осуществления не относящиеся к человеку животные, описанные в настоящем документе, способны продуцировать набор эффекторных Т-клеток, например CTL (цитотоксические Т-лимфоциты), TH1, TH2, TREG, TH17 и т.д. Таким образом, в этих 10 вариантах осуществления не относящиеся к человеку животные, описанные в настоящем документе, продуцируют Т-клетки, которые выполняют различные функции, типичные для конкретного типа Т-клеток, например распознают, связывают или формируют ответ на инородные антигены. В различных вариантах осуществления не относящиеся 15 к человеку животные, описанные в настоящем документе, продуцируют эффекторные Т-клетки, которые уничтожают клетки, представляющие пептидные фрагменты цитоплазматических патогенов, экспрессированных в связи с молекулами МНС I; распознают пептиды, полученные из антигенов, разрушенных во внутриклеточных 20 везикулах и представленных молекулами МНС II на поверхности макрофагов, и индуцируют уничтожение макрофагами микроорганизмов; продуцируют цитокины, которые запускают В-клеточную дифференцировку; активируют продукцию В-клетками опсонизирующих антител; индуцируют продукцию эпителиальными клетками хемокинов, 25 которые мобилизуют нейтрофилы к очагам инфекции; и т.д.

В дополнительных вариантах осуществления не относящиеся к человеку животные, описанные в настоящем документе, содержат Т-клетки CD3+ в периферических органах, например в селезенке. В других аспектах не относящиеся к человеку животные, описанные в настоящем документе, способны продуцировать популяцию Т-клеток 25 памяти в ответ на введение интересующего антигена. Например, не относящиеся к человеку животные продуцируют как центральные Т-клетки памяти (Tcm), так и эффекторные Т-клетки памяти (Tcm) в ответ на введение антигена, например интересующего антигена (например, антигена, тестируемого с целью разработки вакцины, и т.д.).

Клетки DN1 и DN2, которые не получают достаточно сигналов (например, сигналов Notch), могут развиваться в В-клетки, миелоидные клетки (например, дендритные клетки), тучные клетки и NK-клетки. См., например, публикацию Yashiro-Ohtani et al. (2010) Notch regulation of early thymocyte development, Seminars in Immunology 22:261-69. В некоторых вариантах осуществления у не относящихся к человеку животных, 30 описанных в настоящем документе, развиваются В-клетки, миелоидные клетки (например, дендритные клетки), тучные клетки и NK-клетки. В некоторых вариантах осуществления у не относящихся к человеку животных, описанных в настоящем 35 документе, развивается популяция дендритных клеток в тимусе.

Преимущественным типом Т-клеточных рецепторов, экспрессированных на 40 поверхности Т-клеток, является TCR α/β , и лишь небольшая часть клеток экспрессирует TCR δ/γ . В некоторых вариантах осуществления изобретения Т-клетки не относящихся к человеку животных, содержащие гуманизированные локусы TCR α и/или β , демонстрируют задействование локусов TCR α/β и TCR δ/γ , например задействование локусов TCR α/β и TCR δ/γ , аналогичное таковому у животных дикого типа (например, 45 Т-клетки не относящихся к человеку животных, описанных в настоящем документе, экспрессируют белки TCR α/β и TCR δ/γ в пропорциях, сопоставимых с таковыми, экспрессируемыми животными дикого типа). Таким образом, в некоторых вариантах осуществления не относящиеся к человеку животные, содержащие гуманизированные

локусы TCR α/β и эндогенные нечеловеческие локусы TCR δ/γ , демонстрируют задействование всех локусов.

Человеческие или гуманизированные молекулы МНС

В различных вариантах осуществления в настоящем документе предложены

- 5 генетически модифицированные не относящиеся к человеку животные, которые совместно экспрессируют по меньшей мере один гуманизированный Т-клеточный корецептор, по меньшей мере один гуманизированный МНС, который ассоциируется с гуманизированным Т-клеточным корецептором, и необязательно гуманизированный TCR, который при распознавании и связывании с пептидом, представленным
- 10 гуманизированным МНС, и в сочетании с гуманизированным корецептором передает сигналы активации в клетку, экспрессирующую полипептиды гуманизированного TCR и химерного Т-клеточного корецептора. Соответственно, не относящееся к человеку животное, описанное в настоящем документе, содержит по меньшей мере одну из первой, второй и/или третьей последовательности нуклеиновых кислот, каждая из
- 15 которых кодирует разные человеческие или гуманизированные полипептиды МНС, выбранные из группы, состоящей из человеческого или гуманизированного полипептида МНС II α , человеческого или гуманизированного полипептида МНС II β и человеческого или гуманизированного полипептида МНС I α ; не относящееся к человеку животное также необязательно содержит человеческий или гуманизированный $\beta 2$ -микроглобулин.
- 20 Использование обозначений «первая», «вторая» и «третья» в настоящем документе не следует толковать как требование обязательного наличия у не относящихся к человеку животных, описанных в настоящем документе, всех трех последовательностей нуклеиновых кислот или наличия какого-либо из человеческих или гуманизированных полипептидов МНС в каком-либо конкретном порядке.
- 25 Соответственно, в некоторых вариантах осуществления не относящееся к человеку животное, описанное в настоящем документе, может содержать, например, первую и вторую нуклеотидные последовательности, кодирующие, например, человеческий или химерный полипептид CD8 α и человеческий или химерный полипептид CD8 β , неперестроенный вариабельный локус гена Т-клеточного рецептора (TCR) α ,
- 30 содержащий по меньшей мере один человеческий сегмент V α и по меньшей мере один человеческий сегмент J α , функционально связанный с нечеловеческой константной последовательностью гена TCR α , и/или неперестроенный вариабельный локус гена TCR β , содержащий по меньшей мере один человеческий сегмент V β , по меньшей мере один человеческий сегмент D β и по меньшей мере один человеческий сегмент J β ,
- 35 функционально связанный с нечеловеческой константной последовательностью гена TCR β , и необязательно первую и вторую последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие, например, человеческий или гуманизированный полипептид МНС I α и человеческий или гуманизированный полипептид $\beta 2$ -микроглобулин. В других вариантах осуществления не относящееся к человеку животное, описанное в настоящем документе,
- 40 может содержать первую нуклеотидную последовательность, кодирующую, например, химерный полипептид CD4; вариабельный локус гена неперестроенного Т-клеточного рецептора (TCR) α , содержащий по меньшей мере один человеческий сегмент V α и по меньшей мере один человеческий сегмент J α , функционально связанный с нечеловеческой константной последовательностью гена TCR α , и/или неперестроенный вариабельный
- 45 локус гена TCR β , содержащий по меньшей мере один человеческий сегмент V β , по меньшей мере один человеческий сегмент D β и по меньшей мере один человеческий сегмент J β , функционально связанный с нечеловеческой константной последовательностью гена TCR β ; и необязательно первую и вторую последовательности

нуклеиновых кислот, кодирующие, например, человеческий или гуманизированный полипептид МНС II α и человеческий или гуманизированный полипептид МНС II β . В некоторых вариантах осуществления не относящееся к человеку животное, описанное в настоящем документе, может содержать, например, первую, вторую и третью

- 5 нуклеотидные последовательности, кодирующие, например, химерный полипептид CD4, химерный полипептид CD8 α и химерный полипептид CD8 β ; вариабельный локус гена неперестроенного Т-клеточного рецептора (TCR) α , содержащий по меньшей мере один человеческий сегмент V α и по меньшей мере один человеческий сегмент J α , функционально связанный с нечеловеческой константной последовательностью гена
- 10 TCR α , и/или неперестроенный вариабельный локус гена TCR β , содержащий по меньшей мере один человеческий сегмент V β , по меньшей мере один человеческий сегмент D β и по меньшей мере один человеческий сегмент J β , функционально связанный с нечеловеческой константной последовательностью гена TCR β ; и необязательно первую, вторую, третью и четвертую последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие,
- 15 например, человеческий или гуманизированный полипептид МНС α , человеческий или гуманизированный полипептид МНС II β , человеческий или гуманизированный полипептид МНС I α и человеческий или гуманизированный полипептид β -2-микроглобулин.

В различных вариантах осуществления в настоящем документе предложено

- 20 генетически модифицированное не относящееся к человеку животное, например грызун (например, мышь или крыса), содержащее в своем геноме последовательность нуклеиновых кислот, кодирующую человеческий или гуманизированный полипептид МНС I, и/или последовательность нуклеиновых кислот, кодирующую человеческий или гуманизированный белок МНС II. Последовательность нуклеиновых кислот МНС
- 25 I может кодировать полипептид МНС I, который является частично человеческим и частично нечеловеческим, например химерный человеческий/нечеловеческий полипептид МНС I, а последовательность нуклеиновых кислот МНС II может кодировать полипептид МНС II, который является частично человеческим и частично нечеловеческим, например химерный человеческий/нечеловеческий белок МНС II
- 30 (например, содержащий химерные человеческие/нечеловеческие полипептиды МНС II α и β). В некоторых аспектах животное не экспрессирует эндогенные полипептиды МНС I и/или МНС II, например функциональные эндогенные полипептиды МНС I и/или МНС II, на клеточной поверхности. В некоторых вариантах осуществления только молекулы МНС I и/или МНС II, экспрессированные на клеточной поверхности
- 35 животного, представляют собой химерные молекулы МНС I и/или МНС II.

Генетически модифицированное не относящееся к человеку животное, содержащее в своем геноме, например в эндогенном локусе, последовательность нуклеиновых кислот, кодирующую химерный человеческий/нечеловеческий полипептид МНС I, описано в публикациях патентов США №20130111617 и №20130185819, полностью включенных в настоящий документ путем ссылки. Генетически модифицированное не относящееся к человеку животное, содержащее в своем геноме, например в эндогенном локусе, последовательность нуклеиновых кислот, кодирующую гуманизированные, например химерные человеческие/нечеловеческие полипептиды МНС II, описано в патенте США №8,847,005 и в публикации патента США №20130185820, каждый из которых полностью включен в настоящий документ путем ссылки. Генетически модифицированное не относящееся к человеку животное, содержащее в своем геноме, например в эндогенном локусе, последовательность нуклеиновых кислот, кодирующую химерный человеческий/нечеловеческий полипептид МНС I, и содержащее в своем

геноме, например в эндогенном локусе, последовательность нуклеиновых кислот, кодирующую гуманизированные, например химерные человеческие/нечеловеческие полипептиды МНС II, описано в публикации патента США №20140245467, полностью включенной в настоящий документ путем ссылки.

- 5 В различных вариантах осуществления в настоящем документе предложено генетически модифицированное не относящееся к человеку животное, содержащее в своем геноме, например в одном или более эндогенных локусах МНС, первую последовательность нуклеиновых кислот, кодирующую химерный человеческий/нечеловеческий полипептид МНС I, причем человеческий участок химерного
- 10 полипептида МНС I содержит внеклеточный участок (или его часть, например один или более внеклеточных доменов) человеческого полипептида МНС I; вторую последовательность нуклеиновых кислот, кодирующую химерный человеческий/нечеловеческий полипептид МНС II α, при этом человеческий участок химерного полипептида МНС II α содержит внеклеточный участок (или его часть, например один
- 15 или более внеклеточных доменов) человеческого полипептида МНС II α; и/или третью последовательность нуклеиновых кислот, кодирующую химерный человеческий/нечеловеческий полипептид МНС II β, при этом человеческий участок химерного полипептида МНС II β содержит внеклеточный участок (или его часть, например один или более внеклеточных доменов) человеческого полипептида МНС II β; при этом у
- 20 не относящегося к человеку животного экспрессируются функциональные химерные человеческие/нечеловеческие белки МНС I и МНС II из его эндогенного нечеловеческого локуса МНС. В одном варианте осуществления первая, вторая и/или третья последовательности нуклеиновых кислот соответственно расположены в эндогенных нечеловеческих локусах МНС I, МНС II α и МНС II β. В одном варианте осуществления,
- 25 в котором не относящееся к человеку животное представляет собой мышь, первая, вторая и/или третья последовательности нуклеиновых кислот расположены в эндогенном мышином локусе МНС на мышиной хромосоме 17. В одном варианте осуществления первая последовательность нуклеиновых кислот расположена в эндогенном нечеловеческом локусе МНС I. В одном варианте осуществления вторая
- 30 последовательность нуклеиновых кислот расположена в эндогенном нечеловеческом локусе МНС II α. В одном варианте осуществления третья последовательность нуклеиновых кислот расположена в эндогенном нечеловеческом локусе МНС II β.

В одном варианте осуществления у не относящегося к человеку животного экспрессируются только химерные человеческие/нечеловеческие полипептиды МНС I, МНС II α и/или МНС β и не экспрессируются эндогенные нечеловеческие полипептиды МНС (например, функциональные эндогенные полипептиды МНС I, II α и/или II β) из эндогенного нечеловеческого локуса МНС. В одном варианте осуществления у животного, описанного в настоящем документе, экспрессируется функциональный химерный МНС I или функциональный химерный МНС II на поверхности его клеток, например антигендемонстрирующих клеток и т.д. В одном варианте осуществления только МНС I и МНС II, экспрессируемые животным на клеточной поверхности, представляют собой химерный МНС I и химерный МНС II, а животное не экспрессирует какой-либо эндогенный МНС I и МНС II на клеточной поверхности.

- 45 В одном варианте осуществления химерный человеческий/нечеловеческий полипептид МНС I содержит в своем человеческом участке карман связывания с полипептидом, например человеческим полипептидом МНС I. В одном аспекте человеческий участок химерного полипептида содержит внеклеточный участок человеческого МНС I. В этом варианте осуществления человеческий участок химерного полипептида содержит

внеклеточный домен цепи а человеческого МНС I. В одном варианте осуществления человеческий участок химерного полипептида содержит домены α_1 и α_2 человеческого МНС I. В другом варианте осуществления человеческий участок химерного полипептида содержит домены α_1 , α_2 и α_3 человеческого МНС I.

- 5 В одном аспекте человеческий участок химерного полипептида МНС II α и/или человеческий участок химерного полипептида МНС II β содержит пептид-связывающий домен человеческого полипептида МНС II α и/или человеческого полипептида МНС II β соответственно. В одном аспекте человеческий участок химерного полипептида МНС II α и/или β содержит внеклеточный участок человеческого полипептида МНС II α и/или β соответственно. В одном варианте осуществления человеческий участок химерного полипептида МНС II α содержит домен α_1 человеческого полипептида МНС II α ; в другом варианте осуществления человеческий участок химерного полипептида МНС II α содержит домены α_1 и α_2 человеческого полипептида МНС II α . В дополнительном варианте осуществления человеческий участок химерного полипептида МНС II β содержит домен β_1 человеческого полипептида МНС II β ; в другом варианте осуществления человеческий участок химерного полипептида МНС II β содержит домены β_1 и β_2 человеческого полипептида МНС II β .

В некоторых вариантах осуществления человеческий или гуманизированный полипептид МНС I может быть получен из функциональной человеческой молекулы HLA, кодируемой любым из локусов HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-E, HLA-F или HLA-G. Человеческий или гуманизированный полипептид МНС II может быть получен из функциональной человеческой молекулы HLA, кодируемой локусами HLA-DP, -DQ и -DR. Список наиболее часто используемых антигенов и аллелей HLA приведен в публикации Shankarkumar et al. ((2004) The Human Leukocyte Antigen (HLA) System, Int. J. Hum. Genet. 4(2):91-103), включенной в настоящий документ путем ссылки. Shankarkumar et al. также представили краткое пояснение номенклатуры HLA, используемой в данной области. Дополнительную информацию о номенклатуре HLA и различных аллелях HLA можно найти в публикации Holdsworth et al. (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 и недавней публикации Marsh et al. (2010) Nomenclature for factors of the HLA system, 2010, Tissue Antigens 75:291-455, обе из которых включены в настоящий документ путем ссылки. В некоторых вариантах осуществления полипептиды МНС I или МНС II могут быть получены из любых функциональных человеческих молекул HLA-A, B, C, DR или DQ. Таким образом, человеческие или гуманизированные полипептиды МНС I и/или II могут быть получены из любых функциональных человеческих молекул HLA, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления все полипептиды МНС I и МНС II, экспрессированные на клеточной поверхности, содержат участок, полученный из человеческих молекул HLA.

40 Особый интерес представляют человеческие молекулы HLA, специфические полиморфные аллели HLA, которые, как известно, ассоциированы с рядом человеческих заболеваний, например человеческими аутоиммунными заболеваниями. Фактически был обнаружен специфический полиморфизм в локусах HLA, который коррелирует с развитием ревматоидного артрита, сахарного диабета I типа, тиреоидита Хасимото, 45 рассеянного склероза, тяжелой миастении, базедовой болезни, системной красной волчанки, целиакии, болезни Крона, язвенного колита и других аутоиммунных расстройств. См., например, публикации Wong and Wen (2004) What can the HLA transgenic mouse tell us about autoimmune diabetes?, Diabetologia 47:1476-87; Taneja and David (1998)

HLA Transgenic Mice as Humanized Mouse Models of Disease and Immunity, J. Clin. Invest. 101:921-26; Bakker et al. (2006), A high-resolution HLA and SNP haplotype map for disease association studies in the extended human MHC, Nature Genetics 38:1166- 72 и Supplementary Information; и International MHC and Autoimmunity Genetics Network (2009) Mapping of

5 multiple susceptibility variants within the MHC region for 7 immune-mediated diseases, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 106:18680-85. Таким образом, человеческие или гуманизированные полипептиды МНС I и/или МНС II могут быть получены из человеческой молекулы HLA, которая ассоциирована с конкретным заболеванием, например аутоиммунным заболеванием.

10 В одном конкретном аспекте человеческий или гуманизированный полипептид МНС I получен из человеческого HLA-A. В конкретном варианте осуществления полипептид HLA-A представляет собой полипептид HLA-A2 (например, полипептид HLA-A2.1). В одном варианте осуществления полипептид HLA-A представляет собой полипептид, кодируемый аллелью HLA-A*0201, например аллелью HLA-A*02:01:01:01. Аллель HLA-
15 A*0201 широко распространена среди североамериканской популяции. Хотя в настоящих примерах описана эта конкретная последовательность HLA, в объем настоящего изобретения входит любая приемлемая последовательность HLA-A, например полиморфные варианты HLA-A2, встречающиеся в человеческой популяции, последовательности с одной или более консервативными или неконсервативными
20 аминокислотными модификациями, последовательности нуклеиновых кислот, отличающиеся от последовательности, описанной в настоящем документе, в связи с вырождением генетического кода, и т.д.

В другом конкретном аспекте человеческий участок химерного полипептида МНС I получен из человеческого МНС I, выбранного из HLA-B и HLA-C. В одном аспекте он получен из HLA-B, например HLA-B27. В другом аспекте он получен из HLA-A3, -B7, -Cw6 и т.д.

30 В одном конкретном аспекте человеческие участки гуманизированных полипептидов МНС II α и β , описанные в настоящем документе, получены из человеческого HLA-DR, например HLA-DR2. Как правило, цепи α HLA-DR являются мономорфными, например, цепь α комплекса HLA-DR кодируется геном HLA-DRA (например, геном HLA-DR α *01). С другой стороны, цепь β HLA-DR является полиморфной. Таким образом, HLA-DR2 содержит цепь α , кодируемую геном HLA-DRA, а цепь β кодируется геном HLA-
35 DR1 β *1501. Хотя в настоящих примерах описаны эти конкретные последовательности HLA, в объем настоящего изобретения входят любые приемлемые последовательности HLA-DR, например полиморфные варианты, встречающиеся в человеческой популяции, последовательности с одной или более консервативными или неконсервативными аминокислотными модификациями, последовательности нуклеиновых кислот, отличающиеся от последовательностей, описанных в настоящем документе, в связи с вырождением генетического кода и т.д.

40 Человеческие участки химерного полипептида МНС II α и/или β могут кодироваться последовательностями нуклеиновых кислот аллелей HLA, которые ассоциированы с распространенными человеческими заболеваниями. Такие аллели HLA включают, без ограничений, HLA-DRB 1*0401, -DRB1*0301, -DQA1*0501, -DQB1*0201, DRB1*1501, -DRB1*1502, -DQB1*0602, -DQA1*0102, -DQA1*0201, -DQB1*0202, -DQA1*0501 и их
45 комбинации. Обзор ассоциации аллелей HLA с заболеваниями см. в публикации Bakker et al. (2006), выше, включенной в настоящий документ путем ссылки.

В одном аспекте нечеловеческий участок полипептида(-ов) химерных человеческих МНС I, МНС II α и/или МНС II $\alpha\beta$ содержит трансмембранный и/или

цитоплазматический домены полипептида(-ов) эндогенных нечеловеческих (например, грызуна, например мыши, крысы и т.д.) МНС I, МНС II α и/или МНС II β соответственно. Таким образом, нечеловеческий участок химерного человеческого/ нечеловеческого полипептида МНС I может содержать трансмембранный и/или 5 цитоплазматический домены эндогенного нечеловеческого полипептида МНС I. Нечеловеческий участок химерного полипептида МНС II α может содержать трансмембранный и/или цитоплазматический домены эндогенного нечеловеческого полипептида МНС II α. Нечеловеческий участок химерного человеческого/ нечеловеческого полипептида МНС II β может содержать трансмембранный и/или 10 цитоплазматический домены эндогенного нечеловеческого полипептида МНС II β. В одном аспекте не относящееся к человеку животное представляет собой мышь, а нечеловеческий участок химерного полипептида МНС I получен из мышиного белка H-2K. В одном аспекте животное представляет собой мышь, а нечеловеческие участки 15 химерных полипептидов МНС II α и β получены из мышиного белка H-2E. Таким образом, нечеловеческий участок химерного полипептида МНС I может содержать трансмембранный и цитоплазматический домены, полученные из мышиного H-2K, а нечеловеческие участки химерных полипептидов МНС II α и β могут содержать трансмембранный и цитоплазматический домены, полученные из мышиного белка H-2E. Хотя в примерах рассматриваются конкретные последовательности H-2K и H-2E, 20 область настоящего изобретения охватывает любые приемлемые последовательности, например полиморфные варианты, консервативные/неконсервативные аминокислотные замены и т.д. В одном аспекте не относящееся к человеку животное представляет собой мышь, и у мыши не экспрессируются функциональные эндогенные полипептиды МНС из ее локуса H-2D. В некоторых вариантах осуществления мышь конструируют таким 25 образом, что у нее отсутствует весь эндогенный локус H-2D или его участок. В других аспектах у мыши не экспрессируются какие-либо функциональные мышиные МНС I и МНС II на клеточной поверхности.

Химерный человеческий/нечеловеческий полипептид может содержать человеческую или нечеловеческую лидерную (сигнальную) последовательность. В одном варианте 30 осуществления химерный полипептид МНС I содержит нечеловеческую лидерную последовательность эндогенного полипептида МНС I. В одном варианте осуществления химерный полипептид МНС II α содержит нечеловеческую лидерную последовательность эндогенного полипептида МНС II α. В одном варианте осуществления химерный полипептид МНС II β содержит нечеловеческую лидерную 35 последовательность эндогенного полипептида МНС II β. В альтернативном варианте осуществления химерный(-ые) полипептид(-ы) МНС I, МНС II α и/или МНС II β содержит(-ат) нечеловеческую лидерную последовательность полипептида(-ов) МНС I, МНС II α и/или МНС II β соответственно от другого не относящегося к человеку животного, например от другой линии грызуна или другой линии мыши. Таким образом, 40 последовательность нуклеиновых кислот, кодирующая химерный полипептид МНС I, МНС II α и/или МНС II β, может быть функционально связана с последовательностью нуклеиновых кислот, кодирующей нечеловеческую лидерную последовательность МНС I, МНС II α и/или МНС II β соответственно. В еще одном варианте осуществления химерный(-ые) полипептид(-ы) МНС I, МНС II α и/или МНС II β содержит(-ат) 45 человеческую лидерную последовательность полипептида человеческого МНС I, человеческого МНС II α и/или человеческого МНС II β соответственно (например, лидерную последовательность человеческого HLA-A2, человеческого HLA-DRα и/или человеческого HLA-DRβ1*1501 соответственно).

Химерный человеческий/нечеловеческий полипептид МНС I, МНС II α и/или МНС II β может содержать в своем человеческом участке полный или по существу полный внеклеточный домен полипептида человеческого МНС I, человеческого МНС II α и/или человеческого МНС II β соответственно. Таким образом, человеческий участок 5 может содержать по меньшей мере 80%, предпочтительно по меньшей мере 85%, более предпочтительно по меньшей мере 90%, например 95% или более, аминокислот, кодирующих внеклеточный домен полипептида человеческого МНС I, человеческого МНС II α и/или человеческого МНС II β (например, человеческого HLA-A2, человеческого HLA-DRα и/или человеческого HLA-DRβ1*1501). В одном примере в по 10 существу полном внеклеточном домене полипептида человеческого МНС I, человеческого МНС II α и/или человеческого МНС II β отсутствует человеческая лидерная последовательность. В другом примере полипептид химерного человеческого/нечеловеческого МНС I, химерного человеческого/нечеловеческого МНС II α и/или химерного человеческого/нечеловеческого МНС II β содержит человеческую лидерную 15 последовательность.

Более того, химерный полипептид МНС I, МНС II α и/или МНС II β может быть функционально связан (например, может экспрессироваться под регуляторным контролем) с эндогенными нечеловеческими промоторными и регуляторными элементами, например мышиными регуляторными элементами МНС I, МНС IIα и/или 20 МНС II β соответственно. Такое сочетание будет способствовать правильной экспрессии химерных полипептидов МНС I и/или МНС II γ не относящегося к человеку животного, например, в ходе иммунного ответа у не относящегося к человеку животного.

В дополнительном варианте осуществления не относящееся к человеку животное изобретения, например грызун, например мышь, содержит (например, в эндогенном 25 локусе β2-микроглобулина) последовательность нуклеиновых кислот, кодирующую человеческий или гуманизированный β2 микроглобулин, β2-микроглобулин или легкая цепь комплекса МНС класса I (также обозначаемая β2M) представляет собой небольшой (12 кДа) негликозилированный белок, основная функция которого заключается в стабилизации цепи α МНС I. Создание животных с человеческим или гуманизированным 30 β2-микроглобулином подробно описано в публикации патента США №20130111617, которая включена в настоящий документ путем ссылки.

Нуклеотидная последовательность, кодирующая человеческий или гуманизированный полипептид β2-микроглобулин, может содержать остатки нуклеиновых кислот, соответствующие 35льному человеческому гену β2-микроглобулина. Альтернативно нуклеотидная последовательность может содержать остатки нуклеиновых кислот, кодирующие аминокислотную последовательность, идентичную аминокислотам 21-119 человеческого белка β2-микроглобулина (т.е. аминокислотные остатки, соответствующие зрелому человеческому β2-микроглобулину). В альтернативном варианте осуществления нуклеотидная последовательность может содержать остатки 40 нуклеиновых кислот, кодирующие аминокислотную последовательность, идентичную аминокислотам 23-115 человеческого белка β2-микроглобулина, например, аминокислотную последовательность, идентичную аминокислотам 23-119 человеческого белка β2-микроглобулина. Нуклеотидные и аминокислотные последовательности 45 человеческого β2-микроглобулина описаны в публикации Gussow et al., выше, включенной в настоящий документ путем ссылки.

Таким образом, человеческий или гуманизированный полипептид β2-микроглобулин может содержать аминокислотную последовательность, аналогичную аминокислотам 23-115 человеческого полипептида β2-микроглобулина, например аминокислотную

последовательность, аналогичную аминокислотам 23-119 человеческого полипептида β 2-микроглобулина, например аминокислотную последовательность, аналогичную аминокислотам 21-119 человеческого полипептида β 2-микроглобулина. Альтернативно человеческий β 2-микроглобулин может содержать аминокислоты 1-119 человеческого полипептида β 2-микроглобулина.

В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая человеческий или гуманизированный β 2-микроглобулин, содержит нуклеотидную последовательность, представленную в экзонах 2-4 человеческого гена β 2-микроглобулина. Альтернативно нуклеотидная последовательность содержит нуклеотидные последовательности, представленные в экзонах 2, 3 и 4 человеческого гена β 2-микроглобулина. В этом варианте осуществления нуклеотидные последовательности, представленные в экзонах 2, 3 и 4, функционально связаны для обеспечения нормальной транскрипции и трансляции гена. Таким образом, в одном варианте осуществления человеческая последовательность содержит нуклеотидную последовательность, соответствующую экзонам 2-4 человеческого гена β 2-микроглобулина. В конкретном варианте осуществления человеческая последовательность содержит нуклеотидную последовательность, соответствующую последовательности, начинающейся от экзона 2 и до приблизительно 267 п. н. после экзона 4 человеческого гена β 2-микроглобулина. В конкретном варианте осуществления человеческая последовательность содержит приблизительно 2,8 т. п. н. человеческого гена β 2-микроглобулина.

Таким образом, человеческий или гуманизированный полипептид β 2-микроглобулин может кодироваться нуклеотидной последовательностью, представленной в экзонах 2-4 человеческого β 2-микроглобулина, например нуклеотидной последовательностью, соответствующей экзонам 2-4 человеческого гена β 2-микроглобулина. Альтернативно полипептид может кодироваться нуклеотидной последовательностью, содержащей нуклеотидные последовательности, представленные в экзонах 2, 3 и 4 человеческого гена β 2-микроглобулина. В конкретном варианте осуществления человеческий или гуманизированный полипептид β 2-микроглобулин кодируется нуклеотидной последовательностью, соответствующей последовательности, начинающейся от экзона 2 и до приблизительно 267 п. н. после экзона 4 человеческого гена β 2-микроглобулина. В другом конкретном варианте осуществления человеческий или гуманизированный полипептид кодируется нуклеотидной последовательностью, содержащей приблизительно 2,8 т. п. н. человеческого гена β 2-микроглобулина. Так как экзон 4 гена β 2-микроглобулина содержит нетранслируемую область на 5'-конце, человеческий или гуманизированный полипептид может кодироваться нуклеотидной последовательностью, содержащей экзоны 2 и 3 гена β 2-микроглобулина.

Обычному специалисту в данной области будет понятно, что хотя в настоящем документе описаны конкретные нуклеотидные и аминокислотные последовательности для получения созданных методами генной инженерии животных, также предусмотрены последовательности с одной или более консервативными или неконсервативными аминокислотными заменами или последовательности, отличающиеся от описанных в настоящем документе в связи с вырождением генетического кода.

Таким образом, предложено не относящееся к человеку животное, которое экспрессирует человеческую последовательность β 2-микроглобулина, причем последовательность β 2-микроглобулина по меньшей мере приблизительно на 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична человеческой последовательности β 2-микроглобулина. В конкретном варианте осуществления последовательность β 2-

микроглобулина по меньшей мере приблизительно на 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична человеческой последовательности $\beta 2$ -микроглобулина, описанной в настоящем документе. В одном варианте осуществления человеческая последовательность $\beta 2$ -микроглобулина содержит одну или более консервативных замен. В одном варианте осуществления человеческая последовательность $\beta 2$ -микроглобулина содержит одну или более неконсервативных замен.

Кроме того, предложены не относящиеся к человеку животные, у которых нуклеотидная последовательность, кодирующая человеческий или гуманизированный $\beta 2$ -микроглобулин, также содержит нуклеотидную последовательность, представленную в экзоне 1 нечеловеческого гена $\beta 2$ -микроглобулина. Таким образом, в конкретном варианте осуществления не относящееся к человеку животное содержит в своем геноме нуклеотидную последовательность, кодирующую человеческий или гуманизированный $\beta 2$ -микроглобулин, причем нуклеотидная последовательность содержит экзон 1 нечеловеческого гена $\beta 2$ -микроглобулина и экзоны 2, 3 и 4 человеческого гена $\beta 2$ -микроглобулина. Таким образом, человеческий или гуманизированный полипептид $\beta 2$ -микроглобулин кодируется экзоном 1 нечеловеческого гена $\beta 2$ -микроглобулина и экзонами 2, 3 и 4 человеческого гена $\beta 2$ -микроглобулина (например, экзонами 2 и 3 человеческого гена $\beta 2$ -микроглобулина).

В одном варианте осуществления не относящееся к человеку животное (например, грызун, например мышь) изобретения в дополнение к нуклеотидной последовательности, кодирующей химерный белок CD8, дополнительно содержит последовательность нукleinовых кислот, кодирующую человеческий или гуманизированный белок МНС I, таким образом, что химерный белок CD8, экспрессированный на поверхности Т-клетки, способен ассоциироваться, связываться и/или взаимодействовать с человеческим или гуманизированным МНС I, экспрессирующимся на поверхности второй клетки, например антигенпредставляющей клетки. В одном варианте осуществления белок МНС I содержит внеклеточный домен человеческого полипептида МНС I. В одном варианте осуществления животное дополнительно содержит человеческий или гуманизированный полипептид $\beta 2$ -микроглобулин. Примеры генетически модифицированных животных, экспрессирующих человеческий или гуманизированный полипептид МНС I и/или полипептид $\beta 2$ -микроглобулин, описаны в публикациях патентов США №№ 20130111617 и 20130185819, полностью включенных в настоящий документ путем ссылки. Таким образом, в одном варианте осуществления животное, содержащее химерный белок CD8, описанный в настоящем документе, может дополнительно содержать гуманизированный комплекс МНС I, причем гуманизированный комплекс МНС I содержит: (1) гуманизированный полипептид МНС I, например, при этом гуманизированный полипептид МНС I содержит внеклеточный домен человеческого МНС I и трансмембранный и цитоплазматический домены эндогенного (например, мышного) МНС I, например, при этом гуманизированный МНС I содержит домены $\alpha 1$, $\alpha 2$ и $\alpha 3$ человеческого полипептида МНС I; и (2) человеческий или гуманизированный $\beta 2$ -микроглобулин (например, животное содержит в своем геноме нуклеотидную последовательность, представленную в экзонах 2, 3 и 4 человеческого $\beta 2$ -микроглобулина). В одном аспекте полипептиды как гуманизированного МНС I, так и человеческого или гуманизированного $\beta 2$ -микроглобулина кодируются нуклеотидными последовательностями, расположенными в эндогенных локусах МНС I и $\beta 2$ -микроглобулина соответственно; в одном аспекте животное не экспрессирует функциональные эндогенные полипептиды МНС I и $\beta 2$ -микроглобулин. Таким образом, МНС I, экспрессируемый животными, может

представлять собой химерный человеческий/нечеловеческий полипептид МНС I (например, человека/грызуна, например человека/мыши). Человеческий участок химерного полипептида МНС I может быть получен из человеческого белка HLA класса I, выбранного из группы, состоящей из HLA-A, HLA-B и HLA-C, например HLA-A2,

5 HLA-B27, HLA-B7, HLA-Cw6, или любой другой молекулы HLA класса I, присутствующей в человеческой популяции. В варианте осуществления, в котором животное представляет собой мышь, нечеловеческий (т.е. мышиный) участок химерного полипептида МНС I может быть получен из мышиного белка МНС I, выбранного из H-2D, H-2K и H-2L.

В одном варианте осуществления не относящееся к человеку животное (например,

10 грызун, например мышь) изобретения дополнительно содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую человеческий или гуманизированный белок МНС II таким образом, что химерный белок CD4, экспрессирующийся на поверхности Т-клетки, способен взаимодействовать с человеческим или гуманизированным МНС II, экспрессирующимся на поверхности второй клетки, например антигенпредставляющей

15 клетки. В одном варианте осуществления белок МНС II содержит внеклеточный домен человеческого полипептида МНС II α и внеклеточный домен человеческого полипептида МНС II β . Примеры генетически модифицированных животных, экспрессирующих человеческий или гуманизированный полипептид МНС II, описаны в патенте США №8,847,005, выданном 30 сентября 2014 г., и публикации патента США №20130185820,

20 которые полностью включены в настоящий документ путем ссылки. Таким образом, в одном варианте осуществления животное, содержащее химерный белок CD4, описанный в настоящем документе, может дополнительно содержать гуманизированный комплекс МНС II, причем гуманизированный белок МНС II содержит: (1) гуманизированный полипептид МНС II α , содержащий внеклеточный домен

25 человеческого МНС II α и трансмембранный и цитоплазматический домены эндогенного (например, мышиного) МНС II, при этом человеческий внеклеточный домен МНС II α содержит домены $\alpha 1$ и $\alpha 2$ человеческого МНС II α ; и (2) гуманизированный полипептид МНС II β , содержащий внеклеточный домен человеческого МНС II β и трансмембранный и цитоплазматический домены эндогенного (например, мышиного)

30 МНС II, при этом человеческий внеклеточный домен МНС II β содержит домены $\beta 1$ и $\beta 2$ человеческого МНС II β . В одном аспекте оба гуманизированных полипептида МНС II α и β кодируются последовательностями нуклеиновых кислот, расположенными в эндогенных локусах МНС II α и β соответственно; в одном аспекте у животного не экспрессируются функциональные эндогенные полипептиды МНС II α и β . Таким

35 образом, МНС II, экспрессируемый у животных, может представлять собой химерный человеческий/нечеловеческий белок МНС II (например, человека/грызуна, например человека/мыши). Человеческий участок химерного белка МНС II может быть получен из человеческого белка HLA класса II, выбранного из группы, состоящей из HLA-DR, HLA-DQ и HLA-DP, например HLA-DR4, HLA-DR2, HLA-DQ2.5, HLA-DQ8, или любой

40 другой молекулы HLA класса II, присутствующей в человеческой популяции. В варианте осуществления, в котором животное представляет собой мышь, нечеловеческий (т.е. мышиный) участок химерного полипептида МНС II может быть получен из мышиного белка МНС II, выбранного из H-2E и H-2A.

Специалисту в данной области будут очевидны различные другие варианты

45 осуществления генетически модифицированного не относящегося к человеку животного, например грызуна, например мыши или крысы, на основании настоящего описания и на основании описания публикаций патентов США №№20130111617, 20130185819 и 20130185820 и патента США №8,847,005, включенных в настоящий документ путем

ссылки.

В различных вариантах осуществления генетически модифицированные не относящиеся к человеку животные, описанные в настоящем документе, производят клетки, например АПК, на поверхности которых находятся человеческий или

- 5 гуманизированный МНС I или II, и в результате представляют пептиды в качестве эпитопов для Т-клеток так, как это происходит у человека, так как по существу все из компонентов комплекса являются человеческими или гуманизированными. Генетически модифицированные не относящиеся к человеку животные изобретения могут использоваться для изучения функции человеческой иммунной системы у
- 10 гуманизированного животного; для выявления антигенов и эпитопов антигенов, которые вызывают иммунный ответ (например, эпитопов Т-клеток, например уникальных человеческих раковых эпитопов), например, с целью использования для разработки вакцины; для оценки потенциальных вакцин и других стратегий вакцинации; для изучения человеческих аутоиммунных реакций; для изучения человеческих инфекционных
- 15 заболеваний и иным образом для разработки улучшенных терапевтических стратегий на основании экспрессии человеческого МНС.

Не относящиеся к человеку животные, ткани и клетки

Не относящееся к человеку генетически модифицированное животное изобретения можно выбрать из группы, состоящей из мыши, крысы, кролика, свиньи, крупного

- 20 рогатого скота (например, коровы, быка, буйвола), олена, овцы, козы, курицы, кота, собаки, хорька, примата (например, мартышки, макаки-резус). В случае не относящихся к человеку животных, для которых отсутствуют легкодоступные приемлемые генетически модифицируемые ЭС-клетки, применяют другие способы создания не относящегося к человеку животного, содержащего генетическую модификацию. Такие
- 25 способы включают, например, модификацию генома другой клетки, кроме ЭС-клетки (например, фибробласта или индуцированной плорипотентной клетки), и использование ядерного переноса для переноса модифицированного генома в приемлемую клетку, например ооцит, и постепенное созревание модифицированной клетки (например, модифицированного ооцита) в не относящемся к человеку животном в приемлемых
- 30 условиях для формирования эмбриона.

В одном аспекте не относящееся к человеку животное представляет собой млекопитающее. В одном аспекте не относящееся к человеку животное представляет собой мелкое млекопитающее, например, из надсемейства Dipodoidea или Muroidea. В одном варианте осуществления генетически модифицированное животное представляет

- 35 собой грызуна. В одном варианте осуществления грызуна выбирают из мыши, крысы и хомяка. В одном варианте осуществления грызуна выбирают из надсемейства Muroidea. В одном варианте осуществления генетически модифицированное животное относится к семейству, которое выбирают из Calomyscidae (например, мышевидные хомяки), Cricetidae (например, хомяк, мыши и крысы Нового света, полевка), Muridae (например,
- 40 мыши и крысы, песчанки, иглистые мыши, косматые хомяки), Nesomyidae (например, рипидомисы, скальные крысы, белохвостые крысы, мадагаскарские крысы и мыши), Platacanthomyidae (например, колючие соневидные хомяки) и Spalacidae (например, слепыши, бамбуковые крысы и цокоры). В конкретном варианте осуществления генетически модифицированного грызуна выбирают из мыши или крысы (семейство
- 45 Muridae), песчанки, иглистые мыши и косматого хомяка. В одном варианте осуществления генетически модифицированная мышь является представителем семейства Muridae. В одном варианте осуществления животное представляет собой грызуна. В конкретном варианте осуществления грызуна выбирают из мыши и крысы. В одном

варианте осуществления не относящееся к человеку животное представляет собой мышь.

В конкретном варианте осуществления не относящееся к человеку животное представляет собой грызуна, который является мышью линии C57BL, выбранной из 5 C57BL/A, C57BL/An, C57BL/GrFa, C57BL/KaLwN, C57BL/6, C57BL/6J, C57BL/6ByJ, C57BL/6NJ, C57BL/10, C57BL/10ScSn, C57BL/10Cr и C57BL/01a. В другом варианте осуществления мышь представляет собой мышь линии 129, которую выбирают из группы, состоящей из линий 129P1, 129P2, 129P3, 129X1, 129S1 (например, 129S1/SV, 129S1/SvIm), 129S2, 129S4, 129S5, 129S9/SvEvH, 129S6 (129/SvEvTac), 129S7, 129S8, 129T1, 10 129T2 (см., например, публикацию Festing et al. (1999) Revised nomenclature for strain 129 mice, Mammalian Genome 10:836, см. также публикацию Auerbach et al (2000) Establishment and Chimera Analysis of 129/SvEv- and C57BL/6-Derived Mouse Embryonic Stem Cell Lines). В одном варианте осуществления генетически модифицированная мышь представляет собой смесь вышеупомянутой линии 129 и вышеупомянутой линии C57BL/6. В другом 15 конкретном варианте осуществления мышь представляет собой смесь вышеупомянутых линий 129 или смесь вышеупомянутых линий BL/6. В конкретном варианте осуществления линия 129 смеси представляет собой линию 129S6 (129/SvEvTac). В другом варианте осуществления мышь представляет собой мышь линии BALB, например, линии BALB/c. В другом варианте осуществления мышь представляет собой смесь 20 линии BALB с другой вышеупомянутой линией. Не относящиеся к человеку животные, предложенные в настоящем документе, могут представлять собой мышь, полученную от любой комбинации вышеупомянутых линий.

В одном варианте осуществления не относящееся к человеку животное представляет собой крысу. В конкретном варианте осуществления крысу выбирают из крысы линии 25 Вистар, линии LEA, линии Спрег-Доули, линии Фишер, F344, F6 и темной агутти. В одном варианте осуществления линия крыс представляет собой смесь из двух или более линий, которые выбирают из группы, состоящей из линий Вистар, LEA, Спрег-Доули, Фишер, F344, F6 и темной агутти.

Таким образом, в одном варианте осуществления изобретения предложена

30 генетически модифицированная мышь, причем мышь содержит, например, в своем геноме, например в своем геноме зародышевой линии: (а) первую нуклеотидную последовательность, кодирующую первый химерный человеческий/мышиный полипептид Т-клеточного корецептора (например, CD4), вторую нуклеотидную последовательность, кодирующую второй химерный человеческий/мышиный полипептид 35 Т-клеточного корецептора (например, CD8 α), и/или третью нуклеотидную последовательность, кодирующую третий химерный человеческий/мышиный полипептид Т-клеточного корецептора (например, CD8 β), при этом мышиный участок каждого химерного полипептида Т-клеточного корецептора содержит по меньшей мере трансмембранный и цитоплазматический домены мышного Т-клеточного корецептора, 40 при этом человеческий участок каждого химерного полипептида содержит внеклеточный участок (или его часть, например один или более внеклеточных доменов) человеческого Т-клеточного корецептора, и при этом у мыши экспрессируются первый, второй и/или третий химерный полипептид Т-клеточного корецептора; (б) вариабельный локус гена неперестроенного Т-клеточного рецептора (TCR) α , содержащий по меньшей мере один 45 человеческий сегмент V α и по меньшей мере один человеческий сегмент J α , функционально связанный с мышной константной последовательностью гена TCR α , и/или неперестроенный вариабельный локус гена TCR β , содержащий по меньшей мере один человеческий сегмент V β , по меньшей мере один человеческий сегмент D β и по

меньшей мере один человеческий сегмент J β , функционально связанный с мышиной константной последовательностью гена TCR β ; и необязательно (с) первую последовательность нуклеиновых кислот, кодирующую первый химерный человеческий/мышиный полипептид МНС (например, МНС II а), вторую последовательность

- 5 нуклеиновых кислот, кодирующую второй химерный человеческий/мышиный полипептид МНС (например, МНС II β), и/или третью последовательность нуклеиновых кислот, кодирующую третий химерный человеческий/мышиный полипептид МНС (например, МНС I), и локус β 2-микроглобулина, кодирующий человеческий или гуманизированный β 2-микроглобулин, при этом человеческий участок каждого
- 10 химерного полипептида МНС содержит внеклеточный домен человеческого полипептида МНС, который ассоциируется с первым, вторым и/или третьим химерным полипептидом Т-клеточного корецептора (например, при этом человеческий участок химерного комплекса МНС II (например, гуманизированных полипептидов МНС II а и β) ассоциируется с химерным полипептидом CD4, и/или человеческий участок
- 15 химерного полипептида МНС I (или комплекса МНС I, например гуманизированного МНС Iа и человеческого (гуманизированного) β 2-микроглобулина) ассоциируется с химерным корецептором CD8 (например, гуманизированными полипептидами CD8 а и β).

В настоящем документе предложена генетически модифицированная мышь,

- 20 содержащая в своем геноме, например в своем эндогенном локусе CD4, нуклеотидную последовательность, кодирующую химерный человеческий/мышиный полипептид CD4, причем мышиный участок химерного полипептида содержит по меньшей мере трансмембранный и цитоплазматический домены мышного полипептида CD4, и при этом у мыши экспрессируется химерный человеческий/мышиный CD4. В одном варианте
- 25 осуществления человеческий участок химерного полипептида содержит по меньшей мере весь или по существу весь внеклеточный домен человеческого полипептида CD4. В одном варианте осуществления человеческий участок химерного полипептида содержит по меньшей мере весь или по существу весь домен D1 человеческого белка CD4. В одном варианте осуществления человеческий участок химерного полипептида
- 30 содержит по меньшей мере все или по существу все из доменов D1-D2 человеческого белка CD4, например по меньшей мере все или по существу все из доменов D1-D3 человеческого белка CD4, например все или по существу все из доменов D1-D4 человеческого белка CD4. Таким образом, в одном варианте осуществления мышь содержит в эндогенном локусе CD4 нуклеотидную последовательность, содержащую
- 35 по меньшей мере все или по существу все из экзонов 4, 5 и 6 человеческого гена CD4, например последовательность экзона 3 человеческого гена CD4, кодирующую участок домена D1 человеческого CD4, и экзоны 4-6 человеческого гена CD4. В одном варианте осуществления мышь содержит в эндогенном локусе CD4 химерный человеческий/мышиный CD4, который содержит человеческую последовательность CD4, которая
- 40 отвечает за взаимодействие с МНС II и/или внеклеточным участком Т-клеточного рецептора. В другом варианте осуществления мышь содержит в эндогенном локусе CD4 химерный человеческий/мышиный CD4, который содержит человеческую последовательность CD4, отвечающую за взаимодействие с МНС II и/или вариабельным доменом Т-клеточного рецептора. В одном варианте осуществления нуклеотидная
- 45 последовательность содержит последовательность, кодирующую мышиный сигнальный пептид CD4. В одном варианте осуществления мышь содержит замещение нуклеотидной последовательности, кодирующее мышиный внеклеточный домен CD4, нуклеотидной последовательностью, кодирующей человеческий внеклеточный домен CD4. В другом

варианте осуществления мышь содержит замещение нуклеотидной последовательности, кодирующей по меньшей мере весь или по существу весь мышиный домен D1 CD4, например нуклеотидной последовательности, кодирующей по меньшей мере все или по существу все из мышиных доменов D1-D2 CD4, например нуклеотидной

5 последовательности, кодирующей по меньшей мере все или по существу все из мышиных доменов D1-D3 CD4, человеческой нуклеотидной последовательностью, кодирующей вышеперечисленное. В одном варианте осуществления домены химерного полипептида CD4 кодируются нуклеотидной последовательностью, которая схематически представлена на ФИГ. 5А.

10 В одном варианте осуществления у мыши не экспрессируется функциональный эндогенный CD4 из ее эндогенного мышиного локуса CD4. В одном варианте осуществления мышь, описанная в настоящем документе, содержит химерную человеческую/мышиную нуклеотидную последовательность CD4 в своей зародышевой линии.

15 В одном варианте осуществления у мыши сохранены любые эндогенные последовательности, которые не были гуманизированы, например, в варианте осуществления, в котором мышь содержит замещение нуклеотидной последовательности, кодирующей все или по существу все из мышиных доменов D1-D3, у мыши сохранена эндогенная нуклеотидная последовательность, кодирующая мышиный домен D4 CD4,

20 а также нуклеотидная последовательность, кодирующая трансмембранный и цитоплазматический домены мышного CD4.

В одном аспекте у мыши, экспрессирующей химерный человеческий/мышиный белок CD4, сохранены мышиные промоторные и регуляторные последовательности CD4, например нуклеотидная последовательность у мыши, кодирующая химерный

25 человеческий/мышиный CD4, функционально связана с эндогенными мышиными промоторными и регуляторными последовательностями CD4. В одном аспекте эти мышиные регуляторные последовательности, сохраненные у созданного методами генной инженерии животного по изобретению, включают последовательности, которые регулируют экспрессию химерного белка на соответствующих стадиях в процессе

30 развития Т-клетки. Таким образом, в одном аспекте у мыши не экспрессируется CD4 на В-клетках или зрелых Т-клетках CD8+. В одном аспекте у мыши также не экспрессируется химерный CD4 на клетках любого типа, например иммунных клетках любого типа, которые в норме не экспрессируют эндогенный CD4.

Генетически модифицированная мышь, описанная в настоящем документе, может

35 содержать в своем геноме, например в своем эндогенном локусе CD8, первую нуклеотидную последовательность, кодирующую химерный человеческий/мышиный полипептид CD8 α , и вторую нуклеотидную последовательность, кодирующую химерный человеческий/мышиный полипептид CD8 β . В одном варианте осуществления первая нуклеотидная последовательность содержит последовательность, которая кодирует

40 весь или по существу весь внеклеточный участок человеческого полипептида CD8 α и по меньшей мере трансмембранный и цитоплазматический домены мышного полипептида CD8 α , а вторая нуклеотидная последовательность содержит последовательность, которая кодирует весь или по существу весь внеклеточный участок человеческого полипептида CD8 β и по меньшей мере трансмембранный и

45 цитоплазматический домены мышного полипептида CD8 β , и при этом у мыши экспрессируется функциональный химерный человеческий/мышиный белок CD8. В одном варианте осуществления первая нуклеотидная последовательность содержит последовательность, которая кодирует по меньшей мере подобный иммуноглобулину

V домен человеческого полипептида CD8 α и остальные последовательности мышного полипептида CD8 α , а вторая нуклеотидная последовательность содержит последовательность, которая кодирует по меньшей мере подобный иммуноглобулину V домен человеческого полипептида CD8 β и остальные последовательности мышного полипептида CD8 β . В одном варианте осуществления первая нуклеотидная последовательность содержит по меньшей мере домен связывания с МНС I человеческого полипептида CD8 α . В одном варианте осуществления первая и вторая нуклеотидные последовательности содержат по меньшей мере экзоны, которые кодируют внеклеточный участок человеческого полипептида CD8 α и/или полипептида CD8 β соответственно. В одном варианте осуществления внеклеточный участок человеческого полипептида CD8 α и/или полипептида CD8 β представляет собой область, охватывающую участок человеческого полипептида CD8 α и/или полипептида CD8 β , который не является трансмембранным или цитоплазматическим доменом. В одном варианте осуществления домены химерного полипептида CD8 α кодируются нуклеотидной последовательностью, которая схематически представлена на ФИГ. 5В. В одном варианте осуществления домены химерного полипептида CD8 β кодируются нуклеотидной последовательностью, которая схематически представлена на ФИГ. 5В. В одном варианте осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая химерный человеческий/мышиный полипептид CD8 α и/или полипептид CD8 β , содержит последовательность, кодирующую мышный сигнальный пептид CD8 α и/или CD8 β соответственно. Альтернативно нуклеотидная последовательность может содержать последовательность, кодирующую человеческую сигнальную последовательность CD8 α и/или CD8 β . В одном варианте осуществления мышь содержит замещение нуклеотидной последовательности, кодирующей весь или по существу весь мышный внеклеточный домен CD8 α и/или CD8 β , нуклеотидной последовательностью, кодирующей весь или по существу весь человеческий внеклеточный домен CD8 α и/или CD8Р соответственно.

В одном варианте осуществления у мыши не экспрессируется функциональный эндогенный мышный полипептид CD8 α и/или CD8 β из ее эндогенного локуса CD8. В одном варианте осуществления мышь, описанная в настоящем документе, содержит химерную человеческую/мышную последовательность CD8 в своей зародышевой линии.

В одном аспекте у мыши, экспрессирующей химерный человеческий/мышний полипептид CD8 α и/или CD8 β , сохранены мышные промоторные и регуляторные последовательности CD8 α и/или CD8 β , например, нуклеотидная последовательность у мыши, кодирующая химерный человеческий/мышний CD8, функционально связана с эндогенными мышными промоторными и регуляторными последовательностями CD8. В одном аспекте регуляторные последовательности, сохраненные у мыши, включают последовательности, регулирующие экспрессию белка CD8 на соответствующих стадиях развития Т-клетки. В одном аспекте у генетически модифицированной мыши не экспрессируется химерный CD8 на В-клетках, или зрелых Т-клетках CD4+, или любых клетках, например иммунных клетках, которые в норме не экспрессируют эндогенный CD8.

В изобретении также предложена генетически модифицированная мышь, содержащая в своем геноме неперестроенный человеческий или гуманизированный вариабельный локус гена TCR, например вариабельный локус гена TCR α , TCR β , TCR δ и/или TCR γ . В некоторых вариантах осуществления неперестроенный человеческий или гуманизированный вариабельный локус гена TCR замещает эндогенный мышний вариабельный локус гена TCR. В других вариантах осуществления неперестроенный

человеческий или гуманизированный вариабельный локус гена TCR находится в таком сайте в геноме, который отличен от соответствующего эндогенного мышного локуса TCR. В некоторых вариантах осуществления человеческий или гуманизированный неперестроенный вариабельный локус гена TCR функционально связан с мышным

5 константным участком TCR.

В одном варианте осуществления предложена генетически модифицированная мышь, причем мышь содержит в своем геноме неперестроенный вариабельный локус гена Т-клеточного рецептора (TCR) α, содержащий по меньшей мере один человеческий сегмент V_α и по меньшей мере один человеческий сегмент J_α, функционально связанный с

10 мышной константной последовательностью гена TCR_α, и неперестроенный вариабельный локус гена TCR_β, содержащий по меньшей мере один человеческий сегмент V_β, по меньшей мере один человеческий сегмент D_β и по меньшей мере один человеческий сегмент J_β, функционально связанный с мышной константной

15 последовательностью гена TCR_β. В одном конкретном варианте осуществления мышь

15 содержит в своем геноме неперестроенный вариабельный локус гена TCR α, содержащий полный набор человеческих сегментов V_α и полный набор человеческих сегментов J_α, функционально связанных с мышной константной последовательностью гена TCR_α, и неперестроенный вариабельный локус гена TCR_β, содержащий полный набор

20 человеческих сегментов V_β, полный набор человеческих сегментов D_β и полный набор

25 человеческих сегментов J_β, функционально связанных с мышной константной

последовательностью гена TCR_β.

В некоторых вариантах осуществления неперестроенный вариабельный локус гена TCR_α, содержащий человеческие сегменты вариабельного участка TCR_α, замещает

25 эндогенный мышный вариабельный локус гена TCR_α, а неперестроенный вариабельный локус гена TCR_β, содержащий человеческие сегменты вариабельного участка TCR_β, замещает эндогенный мышный вариабельный локус гена TCR_β. В некоторых вариантах

осуществления эндогенные мышные сегменты V_α и J_α неспособны перестраиваться с образованием перестроенной последовательности V_α/J_α, а эндогенные мышные

30 сегменты V_β, D_β и J_β неспособны перестраиваться с образованием перестроенной последовательности V_β/D_β/J_β. В некоторых вариантах осуществления человеческие

сегменты V_α и J_α перестраиваются с образованием перестроенной человеческой

последовательности V_α/J_α, а человеческие сегменты V_β, D_β и J_β перестраиваются с

образованием перестроенной человеческой последовательности V_β/D_β/J_β.

Изобретение также относится к генетически модифицированной мыши, которая

35 содержит в своем геноме последовательность нуклеиновых кислот, кодирующую химерный полипептид МНС, причем человеческий участок химерного полипептида МНС ассоциируется с человеческим внеклеточным доменом химерного Т-клеточного корецептора, как описано в настоящем документе. Генетически модифицированные мыши, описанные в настоящем документе, могут содержать первую последовательность

40 нуклеиновых кислот, кодирующую химерный человеческий/мышний полипептид МНС I, вторую последовательность нуклеиновых кислот, кодирующую химерный человеческий/мышний полипептид МНС II α, и/или третью последовательность нуклеиновых кислот, кодирующую химерный человеческий/мышний полипептид МНС II β. Человеческий участок химерного МНС I, МНС II α и/или МНС II β может

45 содержать внеклеточный домен человеческого МНС I, МНС II α и/или МНС II β

соответственно. В одном варианте осуществления у мыши экспрессируются

функциональные химерные человеческие/мышные полипептиды МНС I, МНС II α и/

или МНС II β из ее эндогенного мышного локуса МНС. В одном варианте

осуществления у мыши не экспрессируются функциональные мышиные полипептиды МНС, например функциональные мышиные полипептиды МНС I, МНС II α и/или МНС II β , из ее эндогенного мышного локуса МНС. В других вариантах осуществления единственны МНС I и МНС II, экспрессируемые мышью на клеточной поверхности, 5 представляют собой химерные МНС I и МНС II.

В одном варианте осуществления человеческий участок химерного человеческого/ мышного полипептида МНС I содержит домен связывания с пептидом или внеклеточный домен человеческого МНС I (например, человеческого HLA-A, например человеческого HLA-A2, например человеческого HLA-A2.1). В некоторых вариантах 10 осуществления у мыши не экспрессируется домен связывания с пептидом или внеклеточный домен эндогенного мышного полипептида МНС I из ее эндогенного мышного локуса МНС I. Домен связывания с пептидом человеческого МНС I может содержать домены $\alpha 1$ и $\alpha 2$. Альтернативно домен связывания с пептидом человеческого МНС I может содержать домены $\alpha 1$, $\alpha 2$ и $\alpha 3$. В одном аспекте внеклеточный домен

15 человеческого МНС I содержит внеклеточный домен цепи α человеческого МНС I. В одном варианте осуществления эндогенный мышный локус МНС I представляет собой локус H-2K (например, H-2K b), а мышный участок химерного полипептида МНС I содержит трансмембранный и цитоплазматический домены мышного полипептида H-2K (например, H-2K b). Таким образом, в одном варианте осуществления мышь

20 изобретения содержит в своем эндогенном мышном локусе МНС I последовательность нуклеиновых кислот, кодирующую химерный человеческий/мышний МНС I, причем человеческий участок химерного полипептида содержит внеклеточный домен человеческого полипептида HLA-A2 (например, HLA-A2.1), а мышный участок содержит трансмембранный и цитоплазматический домены мышного полипептида

25 H-2K (например, H-2K b), и у мыши экспрессируется химерный человеческий/мышний белок HLA-A2/H-2K. В другом варианте осуществления мышный участок химерного полипептида МНС I может быть получен из другого мышного МНС I, например H-2D, H-2L и т.д.; а человеческий участок химерного полипептида МНС I может быть получен из другого человеческого МНС I, например HLA-B, HLA-C и т.д. В одном

30 аспекте у мыши не экспрессируется функциональный эндогенный полипептид H-2K из ее эндогенного мышного локуса H-2K. В одном варианте осуществления у мыши не экспрессируются функциональные эндогенные полипептиды МНС из ее эндогенного локуса H-2D. В некоторых вариантах осуществления мышь конструируют таким образом, что у нее отсутствует весь эндогенный локус H-2D или его участок. В других

35 вариантах осуществления единственны полипептиды МНС I, экспрессируемые у мыши на клеточной поверхности, представляют собой химерные человеческие/мышьные полипептиды МНС I.

В одном варианте осуществления человеческий участок химерного человеческого/ мышного полипептида МНС II α содержит человеческий домен связывания с пептидом

40 или внеклеточный домен МНС II α , а человеческий участок химерного человеческого/ мышного полипептида МНС II β содержит человеческий домен связывания с пептидом или внеклеточный домен МНС II β . В некоторых вариантах осуществления у мыши не экспрессируется домен связывания с пептидом или внеклеточный домен эндогенного мышного полипептида α и/или β из эндогенного мышного локуса (например, локуса

45 H-2A и/или H-2E). В некоторых вариантах осуществления мышь содержит геном, в котором отсутствует ген, который кодирует функциональную молекулу МНС класса II, содержащую H-2Ab1, H-2Aa, H-2Eb1, H-2Eb2, H-2Ea и их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления единственны полипептиды МНС II, экспрессируемые у мыши

на клеточной поверхности, представляют собой химерные человеческие/мышиные полипептиды МНС II. Домен связывания с пептидом человеческого полипептида МНС II α может содержать домен α1, а домен связывания с пептидом человеческого полипептида МНС II β может содержать домен β1; таким образом, домен связывания с пептидом химерного комплекса МНС II может содержать человеческие домены α1 и β1. Внеклеточный домен человеческого полипептида МНС II α может содержать домены α1 и α2, а внеклеточный домен человеческого полипептида МНС II β может содержать домены β1 и β2; таким образом, внеклеточный домен химерного комплекса МНС II может содержать человеческие домены α1, α2, β1 и β2. В одном варианте осуществления мышиной участок химерного комплекса МНС II содержит трансмембранный и цитоплазматический домены мышевого МНС II, например мышевого H-2E (например, трансмембранный и цитоплазматический домен мышевых цепей α и β H-2E). Таким образом, в одном варианте осуществления мышь изобретения содержит в своем эндогенном мышевом локусе МНС II последовательность нуклеиновых кислот, кодирующую химерный человеческий/мышевый МНС II α, причем человеческий участок химерного полипептида МНС II α содержит внеклеточный домен, полученный из цепи α человеческого МНС II (например, цепи α HLA-DR2), а мышевый участок содержит трансмембранный и цитоплазматический домены, полученные из цепи α мышевого МНС II (например, H-2E); и мышь содержит в своем эндогенном мышевом локусе МНС II последовательность нуклеиновых кислот, кодирующую химерный человеческий/мышевый МНС II β, при этом человеческий участок химерного полипептида МНС II β содержит внеклеточный домен, полученный из цепи β человеческого МНС II (например, цепи β HLA-DR2), а мышевый участок содержит трансмембранный и цитоплазматический домены, полученные из цепи β мышевого МНС II (например, H-2E); например, при этом у мыши экспрессируется химерный человеческий/мышевый белок HLA-DR2/H-2E. В другом варианте осуществления мышевый участок химерного белка МНС II может быть получен из другого мышевого МНС II, например H-2A и т.д.; а человеческий участок химерного белка МНС II может быть получен из другого человеческого МНС II, например, HLA-DQ и т.д. В одном аспекте у мыши не экспрессируются функциональные эндогенные полипептиды H-2A и H-2E из ее эндогенных мышевых локусов (например, у мыши не экспрессируются полипептиды H-2Ab1, H-2Aa, H-2Eb1, H-2Eb2 и H-2Ea). В некоторых вариантах осуществления у мыши не экспрессируется эндогенная молекула МНС I или МНС II на клеточной поверхности.

В различных аспектах человеческий или гуманизированный β2-микроглобулин, экспрессируемый генетически модифицированным не относящимся к человеку животным или клетками, эмбрионами или тканями, полученными от не относящегося к человеку животного, сохраняет все функциональные аспекты эндогенного и/или человеческого β2-микроглобулина. Например, предпочтительно, чтобы человеческий или гуманизированный β2-микроглобулин связывался с цепью α полипептида МНС I (например, эндогенным нечеловеческим или человеческим полипептидом МНС I). Человеческий или гуманизированный полипептид β2-микроглобулин может связываться или иным образом ассоциироваться с любыми другими молекулами, например, рецепторными, якорными или сигнальными молекулами, которые ассоциируются с эндогенным нечеловеческим и/или человеческим β2-микроглобулином (например, HFE и т.д.), или мобилизовать их.

Кроме генетически модифицированных животных (например, грызунов, например мышей или крыс) также предложена ткань или клетка, причем ткань или клетка получена

из не относящегося к человеку животного, описанного в настоящем документе, и содержит гетерологичный ген $\beta 2$ -микроглобулина или последовательность $\beta 2$ -микроглобулина, т.е. нуклеотидную и/или аминокислотную последовательность. В одном варианте осуществления гетерологичный ген $\beta 2$ -микроглобулина или

- 5 последовательность $\beta 2$ -микроглобулина представляет собой человеческий или гуманизированный ген $\beta 2$ -микроглобулина или человеческую или гуманизированную последовательность $\beta 2$ -микроглобулина. Предпочтительно клетка представляет собой клетку с ядром. Клетка может являться любой клеткой, экспрессирующей комплекс МНС, например антигенпредставляющей клеткой. Человеческий или гуманизированный
- 10 полипептид $\beta 2$ -микроглобулин, экспрессируемый указанной клеткой, может взаимодействовать с эндогенным нечеловеческим МНС I (например, МНС I грызуна) с образованием функционального комплекса МНС I. Полученный комплекс МНС I может быть способен взаимодействовать с Т-клеткой, например цитотоксической Т-клеткой. Таким образом, также предложен комплекс *in vitro*, состоящий из клетки из
- 15 не относящегося к человеку животного, описанного в настоящем документе, и Т-клетки.

Также предложены нечеловеческие клетки, которые содержат человеческий или гуманизированный ген или последовательность $\beta 2$ -микроглобулина и дополнительную человеческую или гуманизированную последовательность, например описанный в настоящем документе химерный полипептид МНС I. В таком случае человеческий или

- 20 гуманизированный полипептид $\beta 2$ -микроглобулин может взаимодействовать, например, с химерным человеческим/нечеловеческим полипептидом МНС I, и может образовываться функциональный комплекс МНС I. В некоторых аспектах такой комплекс способен взаимодействовать с TCR на Т-клетке, например человеческой или нечеловеческой Т-клетке. Таким образом, также предложен комплекс *in vitro* из клетки
- 25 из не относящегося к человеку животного, описанного в настоящем документе, и человеческой или нечеловеческой Т-клетки.

В другом аспекте описания предложен эмбрион грызуна (например, эмбрион мыши или крысы), содержащий гетерологичный ген $\beta 2$ -микроглобулина или

- 30 последовательность $\beta 2$ -микроглобулина, как описано в настоящем документе. В одном варианте осуществления эмбрион содержит донорскую ЭС-клетку, которая содержит гетерологичный ген $\beta 2$ -микроглобулина или последовательность $\beta 2$ -микроглобулина, и клетки эмбриона-хозяина. Гетерологичный ген $\beta 2$ -микроглобулина или последовательность $\beta 2$ -микроглобулина представляет собой человеческий или гуманизированный ген $\beta 2$ -микроглобулина или последовательность $\beta 2$ -микроглобулина.

- 35 В объем настоящего изобретения также входит нечеловеческая клетка, содержащая хромосому или фрагмент хромосомы не относящегося к человеку животного, описанного в настоящем документе (например, причем хромосома или ее фрагмент содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую человеческий или гуманизированный полипептид $\beta 2$ -микроглобулин). Нечеловеческая клетка может содержать ядро не относящегося к человеку животного, описанного в настоящем документе. В одном варианте осуществления в результате переноса ядра нечеловеческая клетка содержит хромосому или ее фрагмент.

- 40 В одном аспекте предложена нечеловеческая индуцированная плюрипотентная клетка, содержащая гетерологичный ген $\beta 2$ -микроглобулина или последовательность $\beta 2$ -микроглобулина. В одном варианте осуществления индуцированная плюрипотентная клетка получена из не относящегося к человеку животного, описанного в настоящем документе. В одном варианте осуществления гетерологичный ген $\beta 2$ -микроглобулина или последовательность $\beta 2$ -микроглобулина представляет собой человеческий или

гуманизированный ген или последовательность.

В некоторых вариантах осуществления изобретения у мыши, описанной в настоящем документе, экспрессируется химерный человеческий/мышиный МНС II только на профессиональных антигенпредставляющих клетках, например В-клетках, моноцитах/5 макрофагах и/или дендритных клетках мыши. В некоторых вариантах осуществления у мыши, описанной в настоящем документе, формируется иммунный ответ, например клеточный иммунный ответ, на один или более человеческих антигенов. В некоторых вариантах осуществления у мыши, описанной в настоящем документе, формируется гуманизированный Т-клеточный ответ на один или более человеческих антигенов.

10 Кроме созданного методами генной инженерии не относящегося к человеку животного также предложен нечеловеческий эмбрион (например, эмбрион грызуна, например мышевидный или крысиный эмбрион), содержащий донорскую ЭС-клетку, которая получена от не относящегося к человеку животного (например, грызуна, например мыши или крысы), как описано в настоящем документе. В одном аспекте 15 эмбрион содержит донорскую ЭС-клетку, которая содержит химерный ген CD4, химерный ген CD8 (например, CD8 α и/или CD8 β), гуманизированную последовательность нуклеиновых кислот МНС I (например, МНС I α), гуманизированную последовательность нуклеиновых кислот МНС II (например, МНС II α и/или МНС II β), неперестроенный гуманизированный локус TCR (например, TCR α и/или TCR β или 20 TCR δ и/или TCR γ) и/или человеческую или гуманизированную последовательность гена β 2-микроглобулина, и клетки эмбриона-хозяина.

Также предложена ткань, которая получена от не относящегося к человеку животного (например, грызуна, например мыши или крысы), описанного в настоящем документе, и экспрессирует химерный белок CD4, химерный белок CD8 (например, белок CD8 α и/или 25 CD8 β), гуманизированный полипептид TCR (например, полипептид TCR α и/или TCR β или TCR δ и/или TCR γ), гуманизированный полипептид МНС I (например, МНС I α), гуманизированный полипептид МНС II (например, полипептид МНС II α и/или МНС II β) и/или человеческий или гуманизированный β 2-микроглобулин.

В одном аспекте предложен способ получения химерной человеческой/нечеловеческой 30 молекулы CD4, включающий экспрессию в одной клетке химерного белка CD4 из нуклеотидного конструкта, как описано в настоящем документе. В одном варианте осуществления нуклеотидный конструкт представляет собой вирусный вектор; в определенном варианте осуществления вирусный вектор представляет собой 35 лентивирусный вектор. В одном варианте осуществления клетку выбирают из CHO, COS, 293, HeLa и клетки сетчатки, экспрессирующими вирусную последовательность нуклеиновых кислот (например, клетки PERC.6TM).

В одном аспекте предложена клетка, которая экспрессирует химерный белок CD4. В одном варианте осуществления клетка содержит экспрессионный вектор, содержащий химерную последовательность CD4, как описано в настоящем документе. В одном 40 варианте осуществления клетку выбирают из CHO, COS, 293, HeLa и клетки сетчатки, экспрессирующими вирусную последовательность нуклеиновых кислот (например, клетки PERC.6TM).

Также предложена химерная молекула CD4, продуцируемая не относящимся к 45 человеку животным, как описано в настоящем документе, причем в одном варианте осуществления химерная молекула CD4 содержит аминокислотную последовательность всего или по существу всего внеклеточного домена человеческого белка CD4 и по меньшей мере трансмембранный и цитоплазматический домены нечеловеческого белка CD4, например мышевидного белка CD4. В другом варианте осуществления предложена

химерная молекула CD4, продуцируемая не относящимся к человеку животным, описанным в настоящем документе, причем химерная молекула CD4 содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере всего или по существу всего домена D1 человеческого CD4, например по меньшей мере всех или по существу всех 5 доменов D1-D2 человеческого CD4, например по меньшей мере всех или по существу всех доменов D1-D3 человеческого CD4, например аминокислотную последовательность человеческого CD4, которая отвечает за связывание с МНС II и/или внеклеточным доменом TCR, например аминокислотную последовательность человеческого CD4, которая отвечает за связывание с МНС II и/или вариабельным доменом TCR; и при 10 этом остальная часть белка (например, трансмембранный домен, цитоплазматический домен, любой участок внеклеточного домена, который не был гуманизирован) получена из эндогенной нечеловеческой последовательность белка. Пример химерного человеческого/нечеловеческого полипептида CD4 содержит аминокислотную 15 последовательность, представленную в SEQ ID NO: 78, а человеческий участок химерного полипептида охватывает приблизительно аминокислоты 27-319 SEQ ID NO: 78 (представленные отдельно в SEQ ID NO: 79).

В одном аспекте предложен способ получения химерной человеческой/нечеловеческой молекулы CD8 (например, CD8 α и/или CD8 β), включающий экспрессию в одной клетке химерного(-ых) полипептида(-ов) CD8 из нуклеотидного(-ых) конструкта(-ов), как 20 описано в настоящем документе. В одном варианте осуществления нуклеотидный конструкт представляет собой вирусный вектор; в определенном варианте осуществления вирусный вектор представляет собой лентивирусный вектор. В одном варианте осуществления клетку выбирают из CHO, COS, 293, HeLa и клетки сетчатки, экспрессирующую вирусную последовательность нуклеиновых кислот (например, клетки 25 PERC.6TM).

В одном аспекте предложена клетка, которая экспрессирует химерный белок CD8. В одном варианте осуществления клетка содержит экспрессионный вектор, содержащий химерную(-ые) последовательность(-и) CD8, как описано в настоящем документе. В одном варианте осуществления клетку выбирают из CHO, COS, 293, HeLa и клетки 30 сетчатки, экспрессирующую вирусную последовательность нуклеиновых кислот (например, клетки PERC.6TM).

Также предложена химерная молекула CD8, продуцируемая не относящимся к человеку животным, описанным в настоящем документе, причем химерная молекула CD8 содержит весь или по существу весь внеклеточный домен человеческого белка CD8 35 (например, CD8 α и/или CD8 β) и по меньшей мере трансмембранный и цитоплазматический домены нечеловеческого белка CD8, например мышного белка CD8. Пример химерного полипептида CD8 α представлен в SEQ ID NO: 88, а пример химерного белка CD8 β представлен в SEQ ID NO: 83.

Также предложен гуманизированный белок TCR, продуцируемый не относящимся 40 к человеку животным (например, грызуном, например мышью или крысой), описанным в настоящем документе, содержащий человеческий вариабельный участок и нечеловеческий константный участок. Таким образом, гуманизированный белок TCR содержит человеческие участки, определяющие комплементарность (т.е. человеческие CDR1, 2 и 3), в своем вариабельном домене и нечеловеческий константный участок. 45 Также предложены нуклеиновые кислоты, которые кодируют человеческие вариабельные домены TCR, продуцируемые не относящимся к человеку животным, описанным в настоящем документе.

Кроме того, предложена нечеловеческая клетка, выделенная из не относящегося к

человеку животного, как описано в настоящем документе. В одном варианте осуществления клетка представляет собой ЭС-клетку. В одном варианте осуществления клетка представляет собой Т-клетку, например Т-клетку CD4+. В одном варианте осуществления клетка представляет собой хелперную Т-клетку (клетку T_H). В одном 5 варианте осуществления клетка T_H представляет собой эффекторную клетку T_H, например клетку T_{H1} или клетку T_{H2}. В одном варианте осуществления клетка представляет собой Т-клетку CD8+. В одном варианте осуществления клетка представляет собой цитотоксическую Т-клетку. Также предложена нечеловеческая 10 клетка, которая экспрессирует белок TCR, содержащий человеческий вариабельный участок и нечеловеческий константный участок. Белок TCR может содержать TCR α , TCR β или их комбинацию. В одном варианте осуществления клетка представляет собой Т-клетку, например Т-клетку CD4+ или CD8+. Кроме того, нечеловеческие Т-клетки, предложенные в настоящем документе, могут экспрессировать на своей клеточной 15 поверхности: (а) химерный человеческий/нечеловеческий Т-клеточный корецептор, например химерный полипептид CD4 или химерный полипептид CD8, содержащий внеклеточный домен человеческого Т-клеточного корецептора, функционально связанный с нечеловеческим трансмембранным и/или внутриклеточным доменом Т-клеточного корецептора; и (б) белок TCR, содержащий человеческий вариабельный 20 участок и нечеловеческий константный участок.

В другом варианте осуществления клетка представляет собой антигенпредставляющую клетку. В одном варианте осуществления антигенпредставляющая клетка представляет антиген на гуманизированных молекулах МНС I. В другом варианте осуществления антигенпредставляющая клетка является 25 профессиональной антигенпредставляющей клеткой, например В-клеткой, дендритной клеткой и макрофагом. В другом варианте осуществления антигенпредставляющая клетка представляет антиген на гуманизированных молекулах МНС I и/или МНС II.

В одном аспекте предложена клетка, которая экспрессирует химерные человеческие/нечеловеческие белки МНС I и МНС II (например, белки HLA-A2/H-2K и HLA-DR2/H-2E). В одном аспекте клетка представляет собой мышиную клетку, которая не экспрессирует функциональные эндогенные полипептиды МНС из своего локуса H-2D. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой мышиную клетку, сконструированную таким образом, что в ней отсутствует весь эндогенный локус H-2D или его участок. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой 30 мышиную клетку, которая не экспрессирует на своей поверхности какой-либо функциональный эндогенный полипептид МНС I и МНС II. В одном варианте осуществления клетка содержит экспрессионный вектор, содержащий химерную последовательность МНС класса I и химерную последовательность МНС класса II, как описано в настоящем документе. В одном варианте осуществления клетку выбирают 35 из CHO, COS, 293, HeLa и клетки сетчатки, экспрессирующими вирусную последовательность нуклеиновых кислот (например, клетки PERC.6TM).

Химерный комплекс МНС II, содержащий внеклеточный домен HLA-DR2, описанный в настоящем документе, может быть обнаружен антителами против HLA-DR. Таким образом, клетка, представляющая химерный человеческий/нечеловеческий полипептид 40 МНС II, может быть обнаружена и/или отобрана с использованием антитела против HLA-DR. Химерный комплекс МНС I, содержащий внеклеточный домен HLA-A2, описанный в настоящем документе, может быть обнаружен с использованием антител против HLA-A, например против HLA-A2. Таким образом, клетка, представляющая

химерный человеческий/нечеловеческий полипептид МНС I, может быть обнаружена и/или отобрана с использованием антитела против HLA-A. Антитела, которые распознают другие аллели HLA, могут быть приобретены на рынке или могут быть получены и использованы для обнаружения/отбора.

- 5 Хотя в примерах ниже описано созданное методами генной инженерии животное, в геноме которого содержится замещение последовательности нуклеиновых кислот, кодирующей мышиные белки H-2K, H-2A и H-2E, последовательностью нуклеиновых кислот, кодирующей химерные человеческие/мышиные белки HLA-A2/H-2K и HLA-DR2/H-2E соответственно, специалисту в данной области будет понятно, что
- 10 аналогичную стратегию можно использовать для внедрения химер, содержащих другие человеческие гены МНС I и II (другие гены HLA-A, HLA-B и HLA-C; а также другие гены HLA-DR, HLA-DP и HLA-DQ). Также предложены такие животные, содержащие множество химерных человеческих/нечеловеческих генов МНС I и МНС II (например, человека/грызуна, например человека/мыши) в эндогенных локусах МНС. Примеры
- 15 таких химерных белков МНС I и МНС II описаны в публикациях патентов США №№20130111617, 20130185819, 20130185820 и 20140245467 и патенте США №8,847,005, которые включены в настоящий документ путем ссылки.

Также предложена нечеловеческая клетка, содержащая хромосому или фрагмент хромосомы не относящегося к человеку животного, описанного в настоящем документе.

- 20 В одном варианте осуществления нечеловеческая клетка содержит ядро не относящегося к человеку животного, описанного в настоящем документе. В одном варианте осуществления в результате переноса ядра нечеловеческая клетка содержит хромосому или ее фрагмент.

В одном аспекте предложена нечеловеческая индуцированная плюрипотентная

- 25 клетка, содержащая ген, кодирующий химерный полипептид CD4, ген, кодирующий химерный полипептид CD8 (например, полипептид CD8 α и/или CD8 β), ген, кодирующий гуманизированный полипептид МНС I (например, МНС I α и/или β 2-микроглобулина), ген, кодирующий гуманизированный полипептид МНС II (например, МНС II α и/или МНС II β), и/или неперестроенный гуманизированный локус TCR, кодирующий гуманизированный полипептид TCR α и/или TCR β , описанные в настоящем документе. В одном варианте осуществления индуцированная плюрипотентная клетка получена из не относящегося к человеку животного, описанного в настоящем документе.

30 В одном аспекте предложена гибридома или квадрома, полученная из не относящегося к человеку животного, описанного в настоящем документе. В одном варианте осуществления не относящееся к человеку животное представляет собой мышь или крысу.

Получение генетически модифицированных не относящихся к человеку животных, которые формируют по существу гуманизированные Т-клеточные иммунные ответы

35 Также предложен способ получения созданного методами генной инженерии не

- 40 относящегося к человеку животного (например, сконструированного методами генной инженерии грызуна, например мыши или крысы), описанного в настоящем документе. Как правило, способы включают: (а) внедрение в геном не относящегося к человеку животного первой нуклеотидной последовательности, кодирующей химерный человеческий/нечеловеческий полипептид Т-клеточного корецептора, второй
- 45 нуклеотидной последовательности, кодирующей второй химерный человеческий/нечеловеческий полипептид Т-клеточного корецептора, и/или третьей нуклеотидной последовательности, кодирующей третий химерный человеческий/нечеловеческий полипептид Т-клеточного корецептора, причем нечеловеческий участок каждого

химерного полипептида Т-клеточного корецептора содержит по меньшей мере трансмембранный и цитоплазматический домены нечеловеческого Т-клеточного корецептора, и при этом человеческий участок каждого химерного полипептида содержит внеклеточный участок (или его часть) человеческого Т-клеточного рецептора;

- 5 (b) вставку в геном не относящегося к человеку животного неперестроенного вариабельного локуса гена Т-клеточного рецептора (TCR) α, содержащего по меньшей мере один человеческий сегмент V_α и по меньшей мере один человеческий сегмент J_α, функционально связанный с нечеловеческой константной последовательностью гена TCR_α, и/или неперестроенный вариабельный локус гена TCR_β, содержащий по меньшей 10 мере один человеческий сегмент V_β, по меньшей мере один человеческий сегмент D_β и по меньшей мере один человеческий сегмент J_β, функционально связанный с нечеловеческой константной последовательностью гена TCR_β; и необязательно (c) включение в геном первой последовательности нуклеиновых кислот, кодирующей первый химерный человеческий/нечеловеческий полипептид МНС, второй 15 последовательности нуклеиновых кислот, кодирующей второй химерный человеческий/нечеловеческий полипептид МНС, и/или третьей последовательности нуклеиновых кислот, кодирующей третий химерный человеческий/нечеловеческий полипептид МНС; и/или (d) добавление в геном не относящегося к человеку животного локуса β2-микроглобулина, кодирующего человеческий или гуманизированный полипептид β2- 20 микроглобулин. В некоторых вариантах осуществления этапы внедрения, вставки и/или включения включают нацеливание на последовательности, кодирующие внеклеточный(-ые) домен(-ы) Т-клеточного корецептора, вариабельный(-ые) домен(-ы) TCR, внеклеточный(-ые) домен(-ы) полипептида МНС или участок β2-микроглобулина, и замещение их последовательностями, кодирующими человеческий 25 (-ие) внеклеточный(-ые) домен(-ы) Т-клеточного корецептора, человеческие вариабельные домены TCR, человеческий(-ие) внеклеточный(-ые) домен(-ы) МНС и/или человеческий участок β2-микроглобулина соответственно.

В других вариантах осуществления внедрение, вставка, включение и/или добавление могут включать разведение, например скрещивание, животных одного вида. В других 30 вариантах осуществления внедрение, вставка, размещение и/или добавление включают последовательную гомологичную рекомбинацию ЭС-клеток. В некоторых вариантах осуществления ЭС-клетки получены из не относящихся к человеку животных, генетически модифицированных так, что они содержат одну или более, но не все нужные генетические модификации, и гомологичная рекомбинация в таких ЭС-клетках завершает 35 генетическую модификацию. В других вариантах осуществления внедрение, вставка, размещение и/или добавление могут включать комбинацию скрещивания и гомологичной рекомбинации в ЭС-клетках, например скрещивание животного с другим (или несколькими) животным одного вида, причем некоторые или все из животных могут быть получены из ЭС-клеток, генетически модифицированных посредством одиночной 40 гомологичной рекомбинации или последовательных этапов гомологичной рекомбинации, и при этом ЭС-клетка может быть выделена из не относящегося к человеку животного, содержащего одну или более генетических модификаций, описанных в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления в способе применяется нацеливающий 45 конструкт, полученный по технологии VELOCIGENE®, причем конструкт внедряют в ЭС-клетки, а нацеленные ЭС-клеточные клонны внедряют в мышиный эмбрион по технологии VELOCIMOUSE®, как описано в примерах. Нацеливающий конструкт может содержать гомологичные плечи на 5'- и/или 3'-конце, которые нацеливают на

подлежащую замещению эндогенную последовательность, вставляемые последовательности (которые замещают эндогенную последовательность) и одну или более кассет селекции. Кассета селекции представляет собой нуклеотидную последовательность, вставленную в нацеливающий конструкт для упрощения отбора клеток (например, ЭС-клеток), в которые был интегрирован интересующий конструкт. В данной области известно множество приемлемых кассет селекции. Как правило, кассета селекции позволяет осуществить положительный отбор в присутствии конкретного антибиотика (например, Neo, Hyg, Pur, CM, SPEC и т.д.). Кроме того, кассета селекции может бытьflenкирована сайтами рекомбинации, которые позволяют осуществлять делецию кассеты селекции путем обработки рекомбиназными ферментами. Наиболее распространенными сайтами рекомбинации являются loxP и Frt, распознаваемые ферментами Cre и Flp соответственно, но в данной области также известны другие сайты рекомбинации. Кассета селекции может быть расположена в любом месте конструкта за пределами кодирующего региона. В одном варианте осуществления кассета селекции расположена на 5'-конце человеческого фрагмента ДНК. В другом варианте осуществления кассета селекции расположена на 3'-конце человеческого фрагмента ДНК. В другом варианте осуществления кассета селекции расположена в пределах человеческого фрагмента ДНК. В другом варианте осуществления кассета селекции расположена в пределах интрона человеческого фрагмента ДНК. В другом варианте осуществления кассета селекции расположена в участке соединения человеческого и мышевиного фрагментов ДНК.

В одном варианте осуществления способ получения созданного методами генной инженерии не относящегося к человеку животного приводит к получению животного, которое содержит в эндогенном локусе CD4 нуклеотидную последовательность, кодирующую химерный человеческий/нечеловеческий полипептид CD4. В одном варианте осуществления в изобретении предложен способ модификации локуса CD4 не относящегося к человеку животного так, чтобы обеспечить экспрессию химерного человеческого/нечеловеческого полипептида CD4, описанного в настоящем документе. В одном варианте осуществления в изобретении предложен способ модификации локуса CD4 мыши таким образом, чтобы обеспечить экспрессию химерного человеческого/мышевиного полипептида CD4, включающий внедрение, например замещение в эндогенном локусе CD4 не относящегося к человеку животного, например мыши, нуклеотидной последовательности, кодирующей эндогенный нечеловеческий полипептид CD4, нуклеотидной последовательностью, кодирующей химерный человеческий/нечеловеческий полипептид CD4. В одном аспекте способа химерный человеческий мышевиный полипептид CD4 содержит весь или по существу весь внеклеточный домен человеческого полипептида CD4 и по меньшей мере трансмембранный и цитоплазматический домены эндогенного мышевиного полипептида CD4. В другом аспекте способа химерный человеческий/нечеловеческий полипептид CD4 содержит все или по существу все из доменов D1-D2 человеческого полипептида CD4. В еще одном варианте осуществления химерный человеческий/мышевиный полипептид CD4 содержит все или по существу все из доменов D1-D3 человеческого полипептида CD4. В еще одном варианте осуществления химерный человеческий/мышевиный полипептид CD4 содержит всю или по существу всю аминокислотную последовательность человеческого CD4, которая отвечает за взаимодействие с МНС II и/или внеклеточным доменом Т-клеточного рецептора. В еще одном варианте осуществления химерный человеческий/мышевиный полипептид CD4 содержит всю или по существу всю аминокислотную последовательность человеческого CD4, которая отвечает за взаимодействие с МНС

II и/или вариабельным доменом Т-клеточного рецептора.

Таким образом, предложен нуклеотидный конструкт для создания генетически модифицированных животных, содержащих химерный человеческий/нечеловеческий CD4. В одном аспекте нуклеотидная последовательность содержит гомологичные плечи на 5'- и 3'-концах, фрагмент ДНК, содержащий человеческую последовательность гена CD4 (например, человеческую последовательность гена внеклеточного домена CD4, например последовательность гена всех или по существу всех из доменов D1-D2 человеческого CD4, например последовательность гена всех или по существу всех из доменов D1-D3 и/или D2-D3 человеческого CD4, например последовательность гена всех или по существу всех из доменов D1-D4 человеческого CD4), и кассету селекции, фланкированную сайтами рекомбинации. В одном варианте осуществления человеческая последовательность гена CD4 представляет собой геномную последовательность, которая содержит интроны и экзоны человеческого CD4. В одном варианте осуществления гомологичные плечи гомологичны нечеловеческой (например, мышной) геномной последовательности CD4. Пример конструкта изобретения показан на ФИГ. 5А.

В некоторых вариантах осуществления способ приводит к получению животного, которое содержит в эндогенном локусе CD8 нуклеотидную(-ые) последовательность(-и), кодирующую(-ие) химерный человеческий/нечеловеческий полипептид CD8 α и/или CD8 β . В одном варианте осуществления в изобретении предложен способ модификации локуса CD8 не относящегося к человеку животного таким образом, чтобы обеспечить экспрессию химерного человеческого/нечеловеческого полипептида CD8, описанного в настоящем документе. В одном аспекте предложен способ модификации локуса CD8 мыши таким образом, чтобы обеспечить экспрессию химерного человеческого/ мышного полипептида CD8, включающий внедрение, например замещение в эндогенном локусе CD8 не относящегося к человеку животного, например мыши, нуклеотидной последовательности, кодирующей эндогенный нечеловеческий полипептид CD8, нуклеотидной последовательностью, кодирующей химерный человеческий/ нечеловеческий полипептид CD8. Полипептид CD8 может быть выбран из CD8 α , CD8 β и их комбинации. В одном аспекте химерный полипептид содержит весь или по существу весь внеклеточный домен человеческого полипептида CD8 и по меньшей мере трансмембранный и цитоплазматический домены эндогенного мышного полипептида CD8.

Таким образом, также предложен нуклеотидный конструкт для создания генетически модифицированных животных, содержащих человеческий/нечеловеческий CD8. В одном аспекте последовательность нуклеотидного конструкта содержит гомологичные плечи на 5'- и 3'-концах, фрагмент ДНК, содержащий человеческую последовательность CD8 α или CD8 β , и кассету селекции, фланкированную сайтами рекомбинации. В некоторых вариантах осуществления человеческая последовательность содержит интроны и экзоны человеческого CD8 α или CD8 β , например экзоны, кодирующие внеклеточный домен человеческого CD8 α или CD8 β соответственно. В одном варианте осуществления гомологичные плечи гомологичны нечеловеческой последовательности CD8 α или CD8 β . Примеры конструктов для CD8 α и CD8 β показаны на ФИГ. 5В.

В связи с близким хромосомным расположением генов, кодирующих CD8 α и CD8 β , последовательное нацеливание двух генов повышает шансы на успешную гуманизацию. В одном варианте осуществления стратегия нацеливания включает внедрение химерного конструкта CD8 β , описанного в настоящем документе, в ЭС-клетки, создание мыши из нацеленных ЭС-клеток, получение генетически модифицированных ЭС-клеток из

указанной мыши и внедрение химерного конструкта CD8 α , описанного в настоящем документе, в указанные генетически модифицированные ЭС-клетки. В другом варианте осуществления стратегия нацеливания включает внедрение химерного конструкта CD8 β , описанного в настоящем документе, в ЭС-клетки, отбор клеток, в которые был внедрен химерный конструкт CD8 β , внедрение химерного конструкта CD8 α , описанного в настоящем документе, в ЭС-клетки, в которые был внедрен химерный конструкт CD8 β и которые его содержат, и отбор клеток, в которые были внедрены оба химерных рецептора: CD8 β и CD8 α . В одном аспекте данного варианта осуществления этапы отбора выполняют с использованием разных селективных маркеров. В альтернативных вариантах осуществления сначала может быть выполнена гуманизация CD8 α . После завершения нацеливания гена ЭС-клетки генетически модифицированных не относящихся к человеку животных могут быть подвергнуты скринингу для подтверждения успешного внедрения интересующей экзогенной нуклеотидной последовательности или экспрессии экзогенного полипептида с использованием разнообразных способов, известных в данной области (например, модифицированного анализа аллелей, описанного в публикации Valenzuela et al. (2003) High-throughput engineering of the mouse genome coupled with high-resolution expression analysis, Nature Biotech. 21(6):652-659).

В некоторых вариантах осуществления способ создания генетически

20 модифицированного не относящегося к человеку животного приводит к получению животного, в геноме которого содержится гуманизированный неперестроенный локус TCR (например, гуманизированный неперестроенный локус TCR α , TCR β , TCR δ и/или TCR γ). В одном варианте осуществления предложен способ создания генетически модифицированного не относящегося к человеку животного (например, грызуна, 25 например мыши или крысы), которое экспрессирует Т-клеточный рецептор, содержащий человеческий вариабельный участок и нечеловеческий (например, грызуна, например мыши или крысы) константный участок на поверхности Т-клетки, причем способ включает вставку, например замещение, у первого не относящегося к человеку животного эндогенного нечеловеческого вариабельного локуса гена TCR α 30 неперестроенным гуманизированным вариабельном локусом гена TCR α , содержащим по меньшей мере один человеческий сегмент V α и по меньшей мере один человеческий сегмент J α , при этом гуманизированный вариабельный локус гена TCR α функционально связан с эндогенным константным участком TCR α ; вставку, например замещение, у второго не относящегося к человеку животного эндогенного нечеловеческого 35 вариабельного локуса гена TCR β неперестроенным гуманизированным вариабельным локусом гена TCR β , содержащим по меньшей мере один человеческий сегмент V β , один человеческий сегмент D β и один человеческий сегмент J β , при этом гуманизированный вариабельный локус гена TCR β функционально связан с эндогенным константным участком TCR β ; и скрещивание первого и второго не относящихся к человеку животных 40 с получением не относящегося к человеку животного, у которого экспрессируется Т-клеточный рецептор, содержащий человеческий вариабельный участок и нечеловеческий константный участок. В других вариантах осуществления в изобретении предложены способы получения генетически модифицированного не относящегося к человеку животного, в геноме которого содержится гуманизированный неперестроенный локус TCR α , или не относящегося к человеку животного, в геноме которого содержится 45 гуманизированный неперестроенный локус TCR β . В различных вариантах осуществления замещения выполнены в эндогенных локусах. В различных вариантах осуществления способ включает последовательную стратегию гуманизации, при которой конструкт,

содержащий дополнительные сегменты вариабельного участка, внедряют в ЭС-клетки на каждом последующем этапе гуманизации, что в конечном итоге приводит к получению мыши, содержащей полный набор человеческих сегментов вариабельного участка (см., например, ФИГ. 4А и 4В).

- 5 В описании также предложен способ модификации вариабельного локуса гена TCR (например, локуса гена TCR α , TCR β , TCR δ и/или TCR γ) не относящегося к человеку животного так, чтобы обеспечить экспрессию гуманизированного белка TCR, описанного в настоящем документе. В одном варианте осуществления в изобретении предложен способ модификации вариабельного локуса гена TCR таким образом, чтобы 10 обеспечить экспрессию гуманизированного белка TCR на поверхности Т-клетки, который включает вставку, например замещение, у не относящегося к человеку животного эндогенного нечеловеческого вариабельного локуса гена TCR неперестроенным гуманизированным вариабельным локусом гена TCR. В одном варианте осуществления, в котором вариабельный локус гена TCR представляет собой 15 вариабельный локус гена TCR α , неперестроенный гуманизированный вариабельный локус гена TCR содержит по меньшей мере один человеческий сегмент V α и по меньшей мере один человеческий сегмент J α . В одном варианте осуществления, в котором вариабельный локус гена TCR представляет собой вариабельный локус гена TCR β , неперестроенный гуманизированный вариабельный локус гена TCR содержит по 20 меньшей мере один человеческий сегмент V β , по меньшей мере один человеческий сегмент D β и по меньшей мере один человеческий сегмент J β . В различных аспектах неперестроенный гуманизированный вариабельный локус гена TCR функционально связан с соответствующим эндогенным нечеловеческим константным участком TCR.

Таким образом, также предложены нуклеотидные конструкты для создания

- 25 генетически модифицированных животных, содержащих гуманизированные гены вариабельного участка TCR. В одном аспекте нуклеотидный конструкт содержит: гомологичные плечи на 5'- и 3'-концах, фрагмент ДНК, содержащий человеческий (-ие) сегмент (-ы) гена вариабельного участка TCR, и кассету селекции, flankированную сайтами рекомбинации. В одном варианте осуществления человеческий фрагмент ДНК 30 представляет собой фрагмент гена TCR α , и он содержит по меньшей мере один человеческий сегмент вариабельного участка TCR α . В другом варианте осуществления человеческий фрагмент ДНК представляет собой фрагмент TCR β , и он содержит по меньшей мере один человеческий сегмент гена вариабельного участка TCR β . В одном аспекте по меньшей мере одно гомологичное плечо представляет собой нечеловеческое 35 гомологичное плечо, и оно гомологично нечеловеческому локусу TCR (например, нечеловеческому локусу TCR α или TCR β).

- В различных аспектах изобретения последовательность (-и), кодирующая (-ие) химерные человеческие/нечеловеческие полипептиды МНС I и МНС II, расположена (-ы) в эндогенном нечеловеческом локусе МНС (например, мышном локусе H-2K и/ 40 или H-2E). В одном варианте осуществления это приводит к размещению, например замещению, эндогенного (-ых) гена (-ов) МНС или его (их) участка (-ов) последовательностью (-ями) нуклеиновых кислот, кодирующей (-ими) человеческие или гуманизированные полипептиды МНС I. Так как последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие полипептиды МНС I, МНС II α и МНС β , расположены вблизи 45 друг друга на хромосоме, для достижения наилучшего результата в отношении гуманизации обоих МНС I и МНС II у одного животного локусы нацеливания МНС I и МНС II следует проводить последовательно. Таким образом, также в настоящем документе предложены способы создания генетически модифицированного не

относящегося к человеку животного, содержащего последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие химерные человеческие/нечеловеческие полипептиды МНС I, МНС II α и МНС II β, как описано в настоящем документе.

Таким образом, предложен нуклеотидный конструкт для создания генетически

- 5 модифицированных животных, содержащих химерный человеческий/нечеловеческий МНС. В одном аспекте нуклеотидный конструкт содержит: гомологичные плечи на 5'- и 3'-концах, человеческий фрагмент ДНК, содержащий человеческие последовательности гена МНС (например, человеческие последовательности гена HLA-A2 или HLA-DR), и кассету селекции, фланкированную сайтами рекомбинации. В одном варианте
- 10 осуществления человеческий фрагмент ДНК представляет собой геномный фрагмент, который содержит как интроны, так и экзоны человеческого гена МНС (например, человеческого гена HLA-A2 или HLA-DR2). В одном варианте осуществления нечеловеческие гомологичные плечи гомологичны нечеловеческому локусу МНС (например, локусу МНС I или МНС II).

- 15 В одном варианте осуществления нечеловеческие гомологичные плечи на 5'- и 3'- концах содержат геномную последовательность на 5'- и 3'-концах соответственно эндогенного нечеловеческого (например, мышного) локуса гена МНС класса I или МНС класса II (например, в направлении 5' от первой лидерной последовательности и 3' от экзона α3 мышного гена МНС I или ближе к 5'-концу от мышного гена Н-2Ab1 и ближе к 3' концу от мышного гена Н-2Ea). В одном варианте осуществления эндогенный локус МНС класса I выбирают из мышного Н-2K, Н-2D и Н-2L. В конкретном варианте осуществления эндогенный локус МНС класса I представляет собой мышний Н-2K. В одном варианте осуществления эндогенный локус МНС II выбирают из мышного Н-2E и Н-2A. В одном варианте осуществления созданный
- 20 конструкт МНС II позволяет осуществлять замещение обоих мышных генов Н-2E и Н-2A. В одном варианте осуществления у мыши не экспрессируются функциональные эндогенные полипептиды МНС из ее эндогенного локуса Н-2D. В некоторых вариантах осуществления мышь конструируют таким образом, что у нее отсутствует весь
- 25 эндогенный локус Н-2D или его участок. В другом варианте осуществления у мыши не экспрессируются какие-либо функциональные эндогенные полипептиды МНС I и МНС II на клеточной поверхности. В одном варианте осуществления единственные МНС I и МНС II, экспрессируемые у мыши на клеточной поверхности, представляют собой химерные человеческие/мышные МНС I и МНС II.

В описании также предложены способы получения созданного методами генной

- 35 инженерии не относящегося к человеку животного (например, созданного методами генной инженерии грызуна, например мыши или крысы), в геноме которого содержится локус β2-микроглобулина, кодирующий человеческий или гуманизированный полипептид β2-микроглобулин. В одном аспекте способы приводят к получению созданного методами генной инженерии грызуна, например мыши, в геноме которого
- 40 содержится в эндогенном локусе β2-микроглобулина нуклеотидная последовательность, кодирующая человеческий или гуманизированный полипептид β2-микроглобулин. В некоторых примерах у мыши не экспрессируется функциональный мышний β2-микроглобулин из эндогенного мышного локуса β2-микроглобулина. В некоторых аспектах в способах применяется нацеливающий конструкт, например, полученный по
- 45 технологии VELOCIGENE®, причем конструкт внедряют в ЭС-клетки, а нацеленные ЭС-клеточные клони внедряют в мышный эмбрион, например, по технологии VELOCIMOUSE®, как описано в настоящем документе.

Также предложен нуклеотидный конструкт, используемый для получения созданных

методами генной инженерии не относящихся к человеку животных. Нуклеотидный конструкт может содержать: гомологичные плечи на 5'- и 3'-концах, фрагмент ДНК, содержащий человеческие последовательности β 2-микроглобулина, и кассету селекции, фланкированную сайтами рекомбинации. В одном варианте осуществления человеческий

5 фрагмент ДНК представляет собой геномный фрагмент, который содержит как интроны, так и экзоны человеческого гена β 2-микроглобулина. В одном варианте осуществления нечеловеческие гомологичные плечи гомологичны нечеловеческому локусу β 2-микроглобулина. Геномный фрагмент может содержать экзоны 2, 3 и 4 человеческого гена β 2-микроглобулина. В одном примере геномный фрагмент содержит (от 5' к 3'):

10 экзон 2, инtron, экзон 3, инtron и экзон 4 человеческой последовательности β 2-микроглобулина. Кассета селекции может быть расположена в любом месте в конструкте за пределами кодирующего региона β 2-микроглобулина, например, она может быть расположена в направлении 3' от экзона 4 человеческого β 2-микроглобулина.

Нечеловеческие гомологичные плечи на 5'- и 3'-концах могут содержать геномную

15 последовательность на 5'- и 3'-концах эндогенного нечеловеческого гена β 2-микроглобулина соответственно. В другом варианте осуществления нечеловеческие гомологичные плечи на 5'- и 3'-концах содержат геномную последовательность на 5'-конце экзона 2 и на 3'-конце экзона 4 эндогенного нечеловеческого гена соответственно.

Другой аспект изобретения относится к способу модификации локуса β 2-

20 микроглобулина не относящегося к человеку животного (например, грызуна, например мыши или крысы) так, чтобы обеспечить экспрессию человеческого или гуманизированного полипептида β 2-микроглобулина, описанного в настоящем документе. Один способ модификации локуса β 2-микроглобулина не относящегося к человеку животного, например мыши, так, чтобы обеспечить экспрессию человеческого

25 или гуманизированного полипептида β 2-микроглобулина, включает замещение в эндогенном локусе β 2-микроглобулина нуклеотидной последовательности, кодирующей мышний β 2-микроглобулин, нуклеотидной последовательностью, кодирующей человеческий или гуманизированный полипептид β 2-микроглобулин. В одном варианте осуществления такого способа не относящееся к человеку животное, например мышь,

30 не экспрессирует функциональный полипептид β 2-микроглобулин из эндогенного нечеловеческого, например мышного, локуса β 2-микроглобулина. В некоторых конкретных вариантах осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая человеческий или гуманизированный полипептид β 2-микроглобулин, содержит

35 нуклеотидную последовательность, представленную в экзонах 2-4 человеческого гена β 2-микроглобулина. В других вариантах осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая человеческий или гуманизированный полипептид β 2-микроглобулин, содержит нуклеотидные последовательности, представленные в экзонах 2, 3 и 4 человеческого гена β 2-микроглобулина.

Различные примеры осуществления гуманизированных локусов, описанных в 40 настоящем документе, представлены на ФИГ. 2-5.

После завершения нацеливания на ген ЭС-клетки или генетически модифицированных не относящихся к человеку животных подвергают скринингу для подтверждения успешного введения интересующей экзогенной нуклеотидной последовательности или экспрессии экзогенного полипептида. Специалистам в данной области известно

45 множество способов, включая (без ограничений) саузерн-блоттинг, ПЦР длинных фрагментов, количественную ПЦР (например, ПНР в реальном времени с использованием TAQMAN®), флуоресцентную гибридизацию *in situ*, нозерн-блоттинг, проточную цитометрию, вестерн-блоттинг, иммуноцитохимические способы,

имmunогистохимические способы и т.д. В одном примере не относящихся к человеку животных (например, мышей), несущих интересующую генетическую модификацию, идентифицируют путем скрининга на потерю мышиного аллеля и/или приобретение человеческого аллеля с помощью модифицированного анализа аллелей, описанного в

5 публикации Valenzuela et al. (2003) High-throughput engineering of the mouse genome coupled with high-resolution expression analysis, Nature Biotech. 21(6):652-659. Специалистам в данной области известны другие анализы, выявляющие специфическую нуклеотидную или аминокислотную последовательность у генетически модифицированных животных.

В некоторых вариантах осуществления животных получают путем скрещивания.

10 В одном не имеющем ограничительного характера аспекте, например, не относящееся к человеку животное, содержащее химерный человеческий/нечеловеческий CD8, описанный в настоящем документе, и гуманизированный МНС I и/или β2-микроглобулин, может быть получено путем скрещивания животного, содержащего химерный локус CD8 (например, химерный локус CD8α и/или β), как описано в
15 настоящем документе, с животным, содержащим гуманизированный локус МНС I и/или β2-микроглобулина. Животное также может быть получено путем внедрения в ЭС-клетки животного, содержащего гуманизированный локус МНС I и/или β2-микроглобулина, нуклеотидной последовательности, кодирующей химерный CD8 (например, химерный CD8α и/или β), например, для замещения в эндогенном локусе
20 CD8 (например, химерном локусе CD8α и/или β); или внедрения в ЭС-клетки животного, содержащего химерный локус CD8 (например, химерный локус CD8α и/или β), нуклеотидной (-ых) последовательности (-ей), кодирующей (-их) гуманизированный МНС I и/или β2-микроглобулин.

25 В некоторых вариантах осуществления животное, содержащее химерный локус CD8, может быть сначала скрещено с животным, содержащим гуманизированный вариабельный локус гена TCR, для получения животного, содержащего гуманизированные локусы CD8 и вариабельного участка TCR, которое после этого может быть скрещено с животным, содержащим гуманизированные локусы МНС I и/или β2-микроглобулина, для получения животного, содержащего гуманизированные
30 локусы МНС I, вариабельного гена TCR и/или β2-микроглобулина. Альтернативно животное, содержащее гуманизированные локусы МНС I и/или β2-микроглобулина, может быть сначала скрещено с животным, содержащим гуманизированный вариабельный локус гена TCR, для получения животного, содержащего гуманизированные локусы МНС I и вариабельного участка TCR, которое после этого
35 может быть скрещено с животным, содержащим химерный локус CD8, для получения животного, содержащего гуманизированные локусы МНС I, вариабельного гена TCR и/или β2-микроглобулина соответственно.

40 В одном аспекте не относящееся к человеку животное, содержащее химерный человеческий/нечеловеческий CD4 и гуманизированный МНС II, может быть получено путем скрещивания животного, содержащего химерный локус CD4, так, как описано в настоящем документе, с животным, содержащим гуманизированный локус МНС II. Животное также может быть получено путем внедрения в ЭС-клетки животного, содержащего гуманизированный локус МНС II, нуклеотидной последовательности, кодирующей химерный CD4, например, для замещения в эндогенном локусе CD4; или
45 внедрения в ЭС-клетки животного, содержащего химерный локус CD4, нуклеотидной последовательности, кодирующей гуманизированный МНС II.

В некоторых вариантах осуществления животное, содержащее химерный локус CD4, может быть сначала скрещено с животным, содержащим гуманизированный

вариабельный локус гена TCR, для получения животного, содержащего гуманизированные локусы CD4 и вариабельного участка TCR, которое после этого может быть скрещено с животным, содержащим гуманизированный локус МНС II, для получения животного, содержащего гуманизированные локусы CD4, МНС II и 5 вариабельного гена TCR. Альтернативно животное, содержащее гуманизированный локус МНС II, может быть сначала скрещено с животным, содержащим гуманизированный вариабельный локус гена TCR, для получения животного, содержащего гуманизированные локусы МНС II и вариабельного участка TCR, которое после этого может быть скрещено с животным, содержащим химерный локус CD4, для 10 получения животного, содержащего гуманизированные локусы МНС II, вариабельного гена TCR и/или β2-микроглобулина соответственно.

В некоторых вариантах осуществления не относящееся к человеку животное, содержащее химерный человеческий/нечеловеческий CD8, описанный в настоящем документе, и гуманизированный МНС I и/или β2-микроглобулин, скрещивают с 15 животным, содержащим химерный локус CD4, описанный в настоящем документе, и животным, содержащим гуманизированный локус МНС II, для получения не относящегося к человеку животного, содержащего химерные полипептиды CD4 и CD8 и гуманизированные молекулы МНС I (и/или β2-микроглобулина) и МНС II. В некоторых вариантах осуществления животное, содержащее химерные человеческие/ 20 нечеловеческие полипептиды CD4 и CD8 и гуманизированные молекулы МНС I и МНС II, скрещивают с животным, содержащим гуманизированный вариабельный домен TCR, для получения животного, содержащего по существу гуманизированную Т-клеточную иммунную систему, например химерные человеческие/нечеловеческие полипептиды CD4 и CD8, гуманизированные молекулы МНС I (и/или β2-микроглобулина) и МНС II 25 и гуманизированные вариабельные домены TCR.

Любое генетически модифицированное не относящееся к человеку животное (например, мышь), описанное в настоящем документе, может содержать одну или две копии генов, кодирующих химерный человеческий/нечеловеческий CD8 (например, CD8α и/или CD8β); химерный человеческий/нечеловеческий CD4; человеческий или 30 гуманизированный МНС I; человеческий или гуманизированный β2-микроглобулин; человеческий или гуманизированный МНС II (например, МНС IIα и/или МНС IIβ) и человеческий или гуманизированный TCR (например, TCRα и/или TCRβ).

Соответственно, животное может быть гетерозиготным или гомозиготным по любому или всем из этих генов.

35 Использование генетически модифицированных не относящихся к человеку животных, которые Формируют по существу гуманизированные Т-клеточные иммунные ответы

Генетически модифицированные не относящиеся к человеку животные, например грызуны, например мыши или крысы, содержащие гуманизированные CD4 и МНС II и/или гуманизированные CD8 и МНС I (и β2-микроглобулин), представляют пептиды 40 Т-клеткам (Т-клеткам CD4+ или CD8+ соответственно) так, как это происходит у человека, поскольку по существу все из компонентов комплекса являются человеческими или гуманизированными. Генетически модифицированные не относящиеся к человеку животные изобретения могут использоваться для изучения функции человеческой иммунной системы у гуманизированного животного; для выявления антигенов и 45 эпитопов антигенов, которые вызывают иммунный ответ (например, эпитопов Т-клеток, например уникальных человеческих раковых эпитопов), например, с целью использования для разработки вакцины; для выявления Т-клеток с высокой аффинностью к человеческим патогенам или раковым антигенам (т.е. Т-клеток, которые

связываются с антигеном в связи с человеческим комплексом МНС I с высокой авидностью), например, для использования в адаптивной Т-клеточной терапии; для оценки потенциальных вакцин и других стратегий вакцинации; для изучения человеческих аутоиммунных реакций; для изучения человеческих инфекционных заболеваний и иным образом для разработки улучшенных терапевтических стратегий на основании экспрессии человеческих МНС и CD4/CD8.

Таким образом, в различных вариантах осуществления созданные методами генной инженерии животные настоящего изобретения используются, среди прочего, для оценки способности антигена инициировать иммунный ответ у человека и для создания разнообразия антигенов и выявления конкретного антигена, который можно использовать для разработки вакцины для человека.

В одном аспекте предложен способ определения того, будет ли пептид провоцировать клеточный иммунный ответ у человека, включающий воздействие на генетически модифицированное не относящееся к человеку животное, описанное в настоящем документе, пептида, что позволяет сформировать у не относящегося к человеку животного иммунный ответ, и обнаружение у не относящегося к человеку животного клетки (например, Т-клетки CD8+ или CD4+, содержащей человеческий CD8 или CD4 соответственно), которая связывается с последовательностью пептида, представленной химерной человеческой/нечеловеческой молекулой МНС I или II, как описано в настоящем документе. В одном варианте осуществления не относящееся к человеку животное после воздействия содержит рестрикционный по МНС класса I цитотоксический Т-лимфоцит (CTL) CD8+, который связывается с пептидом. В другом варианте осуществления не относящееся к человеку животное после воздействия содержит рестрикционную по МНС класса II цитотоксическую Т-клетку CD4+, которая связывается с пептидом.

В одном аспекте предложен способ выявления человеческого Т-клеточного эпитопа, включающий воздействие на не относящееся к человеку животное, описанное в настоящем документе, антигена, содержащего гипотетический Т-клеточный эпитоп, что позволяет не относящемуся к человеку животному формировать иммунный ответ, выделение из не относящегося к человеку животного рестрикционной по МНС класса I или МНС класса II Т-клетки, которая связывается с эпитопом, и выявление эпитопа, связанного с указанной Т-клеткой.

В одном аспекте предложен способ выявления антигена, который формирует Т-клеточный ответ у человека, включающий воздействие гипотетического антигена на мышь, описанную в настоящем документе, что позволяет формировать у мыши иммунный ответ, и выявление антигена, связанного с рестрикционной по HLA класса I или класса II молекулой.

В одном аспекте предложен способ определения того, содержит ли гипотетический антиген эпитоп, который при воздействии на человеческую иммунную систему будет формировать рестрикционный по HLA класса I или класса II иммунный ответ, включающий воздействие на мышь, описанную в настоящем документе, гипотетического антигена и измерение антиген-специфичного рестрикционного по HLA класса I или HLA класса II иммунного ответа у мыши.

Кроме того, созданные методами генной инженерии не относящиеся к человеку животные, описанные в настоящем документе, могут использоваться для выявления Т-клеточных рецепторов, например Т-клеточных рецепторов с высокой авидностью, которые распознают интересующий антиген, например опухолевый антиген или антиген другого заболевания. Способ может включать: воздействие на не относящееся к человеку

животное, описанное в настоящем документе, антигена, что позволяет формировать у не относящегося к человеку животного иммунный ответ на антиген, выделение из не относящегося к человеку животного Т-клетки, содержащей Т-клеточный рецептор, который связывается с антигеном, представленным человеческим или гуманизированным МНС I или МНС II, и определение последовательности указанного Т-клеточного рецептора.

Не относящиеся к человеку животные, экспрессирующие разнообразный набор функциональных человеческих сегментов гена TCR V(D)J, могут использоваться для изучения заболеваний у человека. Соответственно, в одном варианте осуществления созданные методами генной инженерии не относящиеся к человеку животные, описанные в настоящем документе, могут экспрессировать набор TCR, по существу аналогичный набору TCR, экспрессируемому у человека, например, набор TCR не относящегося к человеку животного, описанного в настоящем документе, может быть получен из по меньшей мере приблизительно 50%, по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере 10 приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 75%, по меньшей мере 15 приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 97% или по меньшей мере приблизительно 99% всех функциональных 20 человеческих сегментов гена TCR α , TCR β , TCR γ и/или TCR δ . В некоторых вариантах осуществления у не относящегося к человеку животного, описанного в настоящем 25 документе, экспрессируется набор TCR, полученный из:

(i) по меньшей мере приблизительно 50%, по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 75%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере 30 приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 97% или по меньшей мере приблизительно 99% всех функциональных 25 человеческих сегментов гена TCR α ;

(ii) по меньшей мере приблизительно 50%, по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 75%, по 35 меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 97% или по меньшей мере приблизительно 99% всех функциональных 40 человеческих сегментов гена TCR α ;

(iii) по меньшей мере приблизительно 50%, по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 75%, по 45 меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 97% или по меньшей мере приблизительно 99% всех функциональных человеческих сегментов гена TCR β ;

(iv) по меньшей мере приблизительно 50%, по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 75%, по 50 меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 97% или по меньшей мере приблизительно 99% всех функциональных 45 человеческих сегментов гена TCR β ; и/или

(v) по меньшей мере приблизительно 50%, по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 75%, по 55 меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере

мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 97% или по меньшей мере приблизительно 99% всех функциональных человеческих сегментов гена TCR J β .

В одном варианте осуществления у мыши продуцируется набор Т-клеток, содержащий

- 5 все или по существу все функциональные человеческие сегменты гена TCR V α и содержащий все или по существу все функциональные человеческие сегменты гена TCR V β . В одном варианте осуществления у мыши, предложенной в настоящем документе, человеческие гены TCR V α и/или V β используются с частотой, аналогичной частоте использования человеческих генов TCR V α и/или V β соответственно человеческими Т-
- 10 клетками у человека. Способы обнаружения сегментов гена, экспрессируемых в наборе TCR не относящегося к человеку животного, включают, например, способы проточной цитометрии и/или секвенирования (например, ПЦР в реальном времени, секвенирование следующего поколения и т.д.).

В одном варианте осуществления предложен способ определения Т-клеточной

- 15 активации гипотетическим терапевтическим средством для человека, включающий воздействие на генетически модифицированное животное, описанное в настоящем документе, гипотетического терапевтического средства для человека (или, например, воздействие на клетку, экспрессирующую человеческий или гуманизированный МНС II или МНС I, такого животного пептидной последовательности гипотетического
- 20 терапевтического средства), воздействие на клетку генетически модифицированного животного, у которого экспрессируется человеческий или гуманизированный комплекс МНС/пептид Т-клетки, содержащей химерный человеческий/нечеловеческий (например, человеческий/мышиный) CD4 или CD8, способный связываться с клеткой генетически модифицированного животного, и измерение активации Т-клетки, индуцированной
- 25 пептидпредставляющей клеткой генетически модифицированного животного.

Помимо возможности выявления антигенов и эпитопов антигена из человеческих патогенов или новообразований, генетически модифицированные животные изобретения могут использоваться для выявления аутоантигенов, связанных с аутоиммунными заболеваниями у человека, например сахарным диабетом I типа, рассеянным склерозом и т.д. Также генетически модифицированные животные изобретения могут использоваться для изучения различных аспектов аутоиммунных заболеваний у человека и могут применяться в качестве моделей аутоиммунных заболеваний.

В различных вариантах осуществления генетически модифицированные не относящиеся к человеку животные изобретения продуцируют Т-клетки с

- 35 гуманизированными молекулами TCR на их поверхности и в результате смогут распознавать пептиды, представленные им комплексами МНС, так же, как это происходит у человека. Генетически модифицированные не относящиеся к человеку животные, описанные в настоящем документе, могут использоваться для изучения развития и функционирования человеческих Т-клеток и процессов иммунологической толерантности; для тестирования потенциальных вакцин для человека; для создания TCR с определенной специфичностью для генной терапии TCR; для создания библиотек TCR к антигенам, ассоциированным с заболеваниями (например, опухолеассоциированным антигенам (ТАА)); и т.д.
- 40

В данной области наблюдается растущий интерес к Т-клеточной терапии, так как

- 45 Т-клетки (например, цитотоксические Т-клетки) могут быть направлены на атаку и уничтожение интересующего антигена, например вирусного антигена, бактериального антигена, опухолевого антигена и т.д., или представляющей его клетки. Начальные исследования в области Т-клеточной терапии рака были направлены на выделение

инфильтирующих опухоль лимфоцитов (TIL; популяции лимфоцитов в опухолевой массе, которые предположительно содержат Т-клетки, реагирующие на опухолевые антигены) из массы опухолевых клеток, выращивание их *in vitro* с использованием Т-клеточных факторов роста и перенос их обратно пациенту в рамках процесса, который

- 5 называется адоптивным Т-клеточным переносом. См., например, публикации Restifo et al. (2012) Adoptive immunotherapy for cancer: harnessing the T cell response, Nature Reviews 12:269-81; Linnermann et al. (2011) T-Cell Receptor Gene Therapy: Critical Parameters for Clinical Success, J. Invest. Dermatol. 131:1806-16. Однако успех этих видов терапии до настоящего времени был достигнут только при меланоме и почечноклеточной
- 10 карциноме; и адоптивный перенос TIL специфически не направлен на конкретные опухолеассоциированные антигены (TAA). Linnermann et al., выше.

Были предприняты попытки по проведению генной терапии TCR, при которой Т-клетки либо отбирали, либо программировали на нацеливание на интересующий антиген, например TAA. Текущая генная терапия TCR основана на выявлении

- 15 последовательностей TCR, которые направлены на конкретные антигены, например опухолеассоциированные антигены. Например, Rosenberg и коллеги опубликовали несколько исследований, в которых они трансдуцировали лимфоциты периферической крови, полученные от пациента с меланомой, генами, кодирующими цепи α и β TCR, специфичного к эпитопам ассоциированного с меланомой антигена MART-1, и
- 20 использовали полученные выращенные лимфоциты для адоптивной Т-клеточной терапии. Johnson et al. (2009) Gene therapy with human and mouse T-cell receptors mediates cancer regression and targets normal tissues expressing cognate antigen, Blood 114:535-46; Morgan et al. (2006) Cancer Regression in Patients After Transfer of Genetically Engineered Lymphocytes, Science 314:126-29. TCR, специфичные к MART-1, выделяли у пациентов,
- 25 у которых наблюдалась регрессия опухоли после терапии TIL. Однако выявление таких TCR, в особенности TCR с высокой авидностью (которые с наибольшей вероятностью можно использовать в терапевтических целях), осложняется тем, что большинство опухолевых антигенов являются аутоантigenами, и TCR, нацеливающиеся на эти антигены, часто либо удаляются, либо обладают субоптимальной аффинностью,
- 30 главным образом в связи с иммунологической толерантностью.

В различных вариантах осуществления в настоящем изобретении эта проблема решается путем обеспечения созданных методами генной инженерии не относящихся к человеку животных, содержащих в своем геноме неперестроенный человеческий вариабельный локус гена TCR. Не относящееся к человеку животное, описанное в

- 35 настоящем документе, способно продуцировать Т-клетки с разнообразным набором гуманизированных Т-клеточных рецепторов. Таким образом, не относящиеся к человеку животные, описанные в настоящем документе, могут являться источником разнородного набора гуманизированных Т-клеточных рецепторов, например гуманизированных Т-клеточных рецепторов с высокой аффинностью, предназначенных для использования
- 40 в адоптивном Т-клеточном переносе.

Таким образом, в одном варианте осуществления в настоящем изобретении предложен способ создания Т-клеточного рецептора к человеческому антигену, включающий иммунизацию не относящегося к человеку животного (например, грызуна, например мыши или крысы), описанного в настоящем документе, интересующим антигеном, что

- 45 позволяет формировать у животного иммунный ответ, выделение из животного активированной Т-клетки со специфичностью к интересующему антигену и определение последовательности нуклеиновых кислот Т-клеточного рецептора, экспрессированного антиген-специфичной Т-клеткой.

В одном варианте осуществления в изобретении предложен способ продуцирования человеческого Т-клеточного рецептора, специфичного к интересующему антигену (например, ассоциированному с заболеванием антигену), включающий иммунизацию не относящегося к человеку животного, описанного в настоящем документе,

- 5 что позволяет формировать у животного иммунный ответ; выделение из животного Т-клетки, реагирующей на интересующий антиген; определение последовательности нуклеиновых кислот человеческого вариабельного участка TCR, экспрессированного Т-клеткой; клонирование человеческого вариабельного участка TCR в нуклеотидный конструкт, содержащий последовательность нуклеиновых кислот
- 10 человеческого константного участка TCR, так, что человеческий вариабельный участок TCR функционально связан с человеческим константным участком TCR; и экспрессирование из конструкта человеческого Т-клеточного рецептора, специфичного к интересующему антигену. В одном варианте осуществления этапы выделения Т-клетки, определения последовательности нуклеиновых кислот человеческого
- 15 вариабельного участка TCR, экспрессированного Т-клеткой, клонирования человеческого вариабельного участка TCR в нуклеотидный конструкт, содержащий последовательность нуклеиновых кислот человеческого константного участка TCR, и экспрессии человеческого Т-клеточного рецептора выполняют с использованием стандартных техник, известных специалистам в данной области.

20 В одном варианте осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая Т-клеточный рецептор, специфичный к интересующему антигену, экспрессируется в клетке. В одном варианте осуществления клетку, экспрессирующую TCR, выбирают из клетки CHO, COS, 293, HeLa, PERC.6TM и т.д.

Интересующий антиген может представлять собой антиген, который вызывает заболевание или состояние или ассоциирован с ним, например опухолеассоциированный антиген; антиген вирусного, бактериального или другого патогенного происхождения и т.д. В данной области известно множество опухолеассоциированных антигенов. Подборка опухолеассоциированных антигенов представлена в базе данных пептидов (archive.cancerimmunity.org/peptidedatabase/Tcellepitopes.htm) журнала Cancer Immunity (журнал Института исследований рака). В некоторых вариантах осуществления изобретения интересующий антиген представляет собой человеческий антиген, например человеческий опухолеассоциированный антиген. В некоторых вариантах осуществления антиген представляет собой внутриклеточный антиген, специфичный к определенному типу клетки, а Т-клеточный рецептор используется для уничтожения клетки, экспрессирующей антиген.

40 В одном варианте осуществления в настоящем документе предложен способ выявления Т-клетки со специфичностью к интересующему антигену, например опухолеассоциированному антигену, включающий иммунизацию не относящегося к человеку животного, описанного в настоящем документе, интересующим антигеном, что позволяет формировать у животного иммунный ответ, и выделение из не относящегося к человеку животного Т-клетки со специфичностью к указанному антигену.

45 В настоящем изобретении предложены новые способы адоптивной Т-клеточной терапии. Таким образом, в настоящем документе предложен способ лечения или облегчения тяжести заболевания или состояния (например, рака) у субъекта (например, млекопитающего субъекта, например субъекта-человека), включающий иммунизацию не относящегося к человеку животного, описанного в настоящем документе, антигеном, ассоциированным с заболеванием или состоянием, что позволяет формировать у

животного иммунный ответ, выделение из животного популяции антиген-специфичных Т-клеток и инфузию выделенных антиген-специфичных Т-клеток субъекту. В одном варианте осуществления в изобретении предложен способ лечения или облегчения тяжести заболевания или состояния у субъекта-человека, включающий иммунизацию

5 не относящегося к человеку животного, описанного в настоящем документе, интересующим антигеном (например, антигеном, ассоциированным с заболеванием или состоянием, например опухолеассоциированным антигеном), что позволяет формировать у животного иммунный ответ, выделение из животного популяции антиген-специфичных Т-клеток, определение последовательности нуклеиновых кислот Т-

10 клеточного рецептора (например, первой и/или второй последовательности нуклеиновых кислот, кодирующей человеческий перестроенный ген вариабельного участка TCR α и/или TCR β); третьей и/или четвертой последовательности нуклеиновых кислот, кодирующей человеческий перестроенный ген вариабельного участка TCR δ или ген вариабельного участка TCR γ , экспрессируемый антиген-специфичными Т-клетками,

15 клонирование последовательности нуклеиновых кислот Т-клеточного рецептора, например первой, второй, третьей и/или четвертой последовательности нуклеиновых кислот, соответственно кодирующей человеческий перестроенный ген вариабельного участка TCR α человеческий перестроенный ген вариабельного участка TCR β , ген вариабельного участка TCR δ или ген вариабельного участка TCR γ , в экспрессионный

20 вектор (например, ретровирусный вектор), например, необязательно при этом первую, вторую, третью и/или четвертую последовательность нуклеиновых кислот, соответственно кодирующую человеческий перестроенный ген вариабельного участка TCR α , человеческий перестроенный ген вариабельного участка TCR β , ген вариабельного участка TCR δ или ген вариабельного участка TCR γ , соответственно клонируют в

25 пределах рамки считывания с человеческим константным геном TCR α , человеческим константным геном TCR β , константным геном TCR δ или константным геном TCR γ , внедряя вектор в Т-клетки, полученные от субъекта таким образом, что Т-клетки экспрессируют антиген-специфичный Т-клеточный рецептор, и инфузию Т-клеток субъекту. В одном варианте осуществления последовательность нуклеиновых кислот

30 Т-клеточного рецептора дополнительно гуманизируют перед внедрением в Т-клетки, полученные от субъекта, например последовательность, кодирующую человеческий константный участок, модифицируют таким образом, чтобы она имела большее сходство с человеческим константным участком TCR (например, нечеловеческий константный участок замещают человеческим константным участком). В некоторых вариантах

35 осуществления заболевание или состояние представляет собой рак. В некоторых вариантах осуществления антиген-специфичную Т-клеточную популяцию выращивают перед инфузией субъекту. В некоторых вариантах осуществления популяцию иммунных клеток субъекта подвергают иммуноистощению перед инфузией антиген-специфичных Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления антиген-специфичный TCR

40 представляет собой TCR с высокой авидностью, например TCR с высокой авидностью к опухолеассоциированному антигену. В некоторых вариантах осуществления Т-клетка представляет собой цитотоксическую Т-клетку. В других вариантах осуществления заболевание или состояние вызвано вирусом или бактерией.

В другом варианте осуществления заболевание или состояние представляет собой

45 аутоиммунное заболевание. Клетки TREG представляют собой субпопуляцию Т-клеток, которая сохраняет толерантность к аутоантигенам и предотвращает патологическую аутореактивность. Таким образом, в настоящем документе также предложены способы лечения аутоиммунного заболевания, которые основаны на создании антиген-

специфичных клеток TREG у не относящегося к человеку животного изобретения, описанного в настоящем документе.

Также в настоящем документе предложен способ лечения или облегчения тяжести заболевания или состояния (например, рака) у субъекта, включающий внедрение клеток, пораженных заболеванием или состоянием (например, раковых клеток), от субъекта не относящемуся к человеку животному, что позволяет формировать у животного иммунный ответ на клетки, выделение из животного популяции Т-клеток, реагирующих на клетки, определение последовательности нуклеиновых кислот вариабельного домена Т-клеточного рецептора, экспрессируемого Т-клетками, клонирование вариабельного домена Т-клеточного рецептора, кодирующего последовательность, в вектор (например, находящийся в пределах рамки считывания и функционально связанный с человеческим константным геном TCR), внедрение вектора в Т-клетки, полученные от субъекта, и инфильтрацию Т-клеток субъекта, несущих Т-клеточный receptor, субъекту.

Кроме того, в настоящем документе предложено использование не относящегося к

человеку животного, описанного в настоящем документе, для получения последовательностей нуклеиновых кислот, кодирующих человеческие вариабельные домены TCR (например, вариабельные домены TCR α и/или β). В одном варианте осуществления предложен способ получения последовательности нуклеиновых кислот, кодирующей человеческий вариабельный домен TCR, включающий иммунизацию не относящегося к человеку животного, описанного в настоящем документе, интересующим антигеном, что позволяет формировать у животного иммунный ответ на интересующий антиген, и получение в результате последовательности нуклеиновых кислот, кодирующей человеческий вариабельный домен TCR, который связывается с интересующим антигеном. В одном варианте осуществления способ дополнительно включает получение последовательности нуклеиновых кислот, кодирующей человеческий вариабельный домен TCR, который функционально связан с нечеловеческой константной областью TCR, выделение Т-клетки из не относящегося к человеку животного, описанного в настоящем документе, и получение в результате последовательности нуклеиновых кислот, кодирующей вариабельный домен TCR, связанный с нечеловеческим константным участком TCR, а также клонирование последовательности (-ей) нуклеиновых кислот, кодирующей (-их) вариабельный домен TCR (например, первой, второй, третьей или четвертой последовательности нуклеиновых кислот соответственно, кодирующей человеческий перестроенный ген вариабельного участка TCRα, человеческий перестроенный ген вариабельного участка TCRβ, ген вариабельного участка TCRδ или ген вариабельного участка TCRγ) в пределах рамки считывания с соответствующим человеческим геном константного участка (например, человеческим геном константного участка TCRα, человеческим геном константного участка TCRβ, человеческим геном константного участка TCRδ или геном вариабельного участка TCRγ соответственно).

Таким образом, в настоящем документе предложены последовательности нуклеиновых кислот вариабельного участка TCR, такие как перестроенные вариабельные последовательности нуклеиновых кислот TCR, например перестроенные последовательности нуклеиновых кислот вариабельного участка TCRα и/или TCRβ, производимые не относящимися к человеку животными, описанными в настоящем документе, и кодируемые соответственно, например, человеческой перестроенной последовательностью гена Va/Jα и человеческой перестроенной последовательностью гена VβDβJβ. Также предложены аминокислотные последовательности вариабельного участка TCR, кодируемые такими перестроенными последовательностями нуклеиновых

кислот вариабельного участка TCR. Такие перестроенные последовательности нуклеиновых кислот вариабельного участка TCR (последовательности нуклеиновых кислот вариабельного участка TCR α и/или TCR β), полученные от не относящихся к

человеку животных, описанных в настоящем документе, могут быть клонированы в 5 функциональной взаимосвязи с человеческим константным участком TCR (константный участок TCR α и/или TCR β) и использованы в различных областях применения, описанных в настоящем документе, например, в качестве терапевтических средств для человека, у людей.

Кроме того, в настоящем документе предложено использование не относящегося к

человеку животного, описанного в настоящем документе, для получения 10 терапевтического средства для человека, включающее иммунизацию не относящегося к человеку животного интересующим антигеном (например, опухолеассоциированным антигеном), что позволяет формировать иммунный ответ у не относящегося к человеку животного, получение от животного Т-клеток, реагирующих на интересующий антиген, 15 получение из Т-клеток последовательности (-ей) нуклеиновых кислот, кодирующей (-их) гуманизированный белок TCR или человеческий вариабельный домен TCR, который связывается с интересующим антигеном, и использование последовательности (-ей) нуклеиновых кислот, кодирующей (-их) гуманизированный белок TCR или человеческий вариабельный домен TCR, для создания терапевтического средства для человека.

20 Таким образом, также предложен способ получения терапевтического средства для человека, включающий иммунизацию не относящегося к человеку животного, описанного в настоящем документе, интересующим антигеном, что позволяет формировать иммунный ответ у не относящегося к человеку животного, получение от животного Т-клеток, реагирующих на интересующий антиген, получение из Т-клеток 25 последовательности (-ей) нуклеиновых кислот, кодирующей (-их) гуманизированный Т-клеточный рецептор, который связывается с интересующим антигеном, и использование гуманизированного (или полностью человеческого) Т-клеточного рецептора в терапевтическом средстве для человека.

В одном варианте осуществления терапевтическое средство для человека представляет собой 30 Т-клетку (например, человеческую Т-клетку, например Т-клетку, полученную от субъекта-человека), включающую интересующую последовательность нуклеиновых кислот (например, в которую трансфицирована, трансдуцирована или иным образом внедрена интересующая нуклеотидная последовательность) таким образом, что Т-клетка экспрессирует гуманизированный белок TCR с аффинностью к интересующему 35 антигену. В одном аспекте субъект, у которого применяется терапевтическое средство, нуждается в терапии конкретного заболевания или состояния, а антиген ассоциирован с заболеванием или состоянием. В одном аспекте Т-клетка представляет собой цитотоксическую Т-клетку, антиген представляет собой опухолеассоциированный антиген, а заболевание или состояние представляет собой рак. В одном аспекте Т-клетка 40 получена от субъекта.

В другом варианте осуществления терапевтическое средство для человека представляет собой Т-клеточный рецептор. В одном варианте осуществления терапевтический рецептор представляет собой растворимый Т-клеточный рецептор. Для создания растворимых Т-клеточных рецепторов или вариабельных участков TCR 45 для использования в качестве терапевтических агентов были приложены значительные усилия. Создание растворимых Т-клеточных рецепторов зависит от получения перестроенных вариабельных участков TCR. Одним из подходов является создание одноцепочечных TCR, содержащих TCR α и TCR β , и аналогично структуре

иммуноглобулина scFv их сливание между собой посредством линкера (см., например, международную заявку № WO 2011/044186). Полученный scTv, если он аналогичен scFv, будет представлять собой термостабильную и растворимую форму связывающего белка TCR α/β . Альтернативные подходы включали создание растворимого TCR,

- 5 имеющего константные домены TCR β (см., например, публикацию Chung et al., (1994) Functional three-domain single-chain T-cell receptors, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 91:12654-58); а также обеспечение ненативной дисульфидной связи между константными доменами TCR (рассмотрено в публикации Boulter and Jakobsen (2005) Stable, soluble, high-affinity, engineered T cell receptors: novel antibody-like proteins for specific targeting of peptide antigens,
- 10 Clinical and Experimental Immunology 142:454-60; см. также патент США №7,569,664). Описаны другие структуры растворимых Т-клеточных рецепторов. Не относящиеся к человеку животные, описанные в настоящем документе, могут использоваться для определения последовательности Т-клеточного рецептора, который связывается с высокой аффинностью с интересующим антигеном, с последующим созданием
- 15 растворимого Т-клеточного рецептора на основе последовательности.

Растворимый Т-клеточный рецептор, полученный из последовательности Т-клеточного рецептора, экспрессируемого не относящимся к человеку животным, может использоваться для блокировки функции интересующего белка, например вирусного, бактериального или опухолеассоциированного белка. Альтернативно растворимый Т-клеточный рецептор может быть слит с функциональной группой, которая уничтожает инфицированную или раковую клетку, например, цитотоксическими молекулами (например, химиотерапевтическим препаратом), токсином, радионуклидом, пролекарством, антителом и т.д. Растворимый Т-клеточный рецептор также может быть слит с иммуномодулирующей молекулой, например цитокином и т.д. Растворимый Т-клеточный рецептор также может быть слит с иммуноингибирующей молекулой, например, молекулой, которая предотвращает уничтожение Т-клеткой других клеток, несущих антиген, распознаваемый Т-клеткой. Такие растворимые Т-клеточные рецепторы, слитые с иммуноингибирующими молекулами, могут использоваться, например, при блокировке аутоиммунного процесса. Различные примеры иммуноингибирующих молекул, которые могут быть слиты с растворимым Т-клеточным рецептором, рассматриваются в публикации Ravetch and Lanier (2000) Immune Inhibitory Receptors, Science 290:84-89, включенной в настоящий документ путем ссылки.

В настоящем изобретении также предложены способы изучения иммунологического ответа в связи с человеческим TCR, включая перестройку человеческого TCR, развитие Т-клетки, активацию Т-клетки, иммунологическую толерантность и т.д.

Также предложены способы тестирования потенциальных вакцин. В одном варианте осуществления в настоящем документе предложен способ определения того, будет ли вакцина активировать иммунологический ответ (например, пролиферацию Т-клеток, высвобождение цитокинов и т.д.) и приводить к образованию эффектора, а также Т-клеток памяти (например, центральных и эффекторных Т-клеток памяти).

В одном аспекте предложен препарат *in vitro*, который содержит Т-клетку, которая несет на своей поверхности химерный белок CD8, и вторую клетку, которая связывается с химерным CD8. В одном варианте осуществления вторая клетка представляет собой клетку, экспрессирующую полипептид МНС I, например химерный человеческий/нечеловеческий белок МНС I. В одном варианте осуществления химерный CD8 на поверхности первой клетки взаимодействует с химерным МНС I на поверхности второй клетки. В одном варианте осуществления химерный белок CD8 сохраняет способность к взаимодействию с эндогенными цитоплазматическими молекулами, например

эндогенными цитоплазматическими сигнальными молекулами (например, эндогенным Lck и т.д.).

В одном аспекте предложен препарат *in vitro*, который содержит Т-клетку, которая несет на своей поверхности химерный белок CD4, и вторую клетку, которая связывается с химерным CD4. В одном варианте осуществления вторая клетка представляет собой клетку, например АПК, экспрессирующую полипептид МНС I, например химерный

человеческий/нечеловеческий белок МНС II. В одном варианте осуществления химерный CD4 на поверхности первой клетки взаимодействует с химерным МНС II на поверхности второй клетки. В одном варианте осуществления химерный белок CD4

сохраняет способность к взаимодействию с эндогенными цитоплазматическими молекулами, например эндогенными цитоплазматическими сигнальными молекулами (например, эндогенным Lck и т.д.).

Другие области применения генетически модифицированных животных, описанных в настоящем документе, т.е. животных, содержащих человеческий или гуманизированный

Т-клеточный корецептор (например, химерный человеческий/нечеловеческий CD4 или CD8), необязательно дополнительно содержащих человеческий или гуманизированный белок МНС II или I, будут очевидны из настоящего описания.

ПРИМЕРЫ

Следующие примеры приведены для того, чтобы предоставить обычным

специалистам в данной области описание того, как получать и использовать способы и композиции изобретения. Примеры не предназначены для ограничения объема того, что авторы рассматривают в качестве их изобретения. Были приложены усилия для обеспечения точности использованных чисел (например, количеств, температуры и т.д.), но следует учитывать некоторые погрешности и отклонения в экспериментах.

Примеры не включают подробные описания стандартных способов, которые хорошо известны обычным специалистам в данной области (методики молекулярного клонирования и т.д.). При отсутствии особых указаний части представляют собой массовые части, молекулярная масса представляет собой средневесовую молекулярную массу, температура указана в градусах по шкале Цельсия, а давление является

атмосферным или близким к атмосферному.

Пример 1. Создание мышей с гуманизированным МНС

Различные этапы конструирования мыши, содержащей гуманизированные локусы МНС I и МНС II с соответствующими и дополнительными делециями эндогенных локусов МНС I и МНС II (HLA-A2/H-2K, HLA-DR2/H-2E, H-2A-del, H-2D-del), показаны на ФИГ. 3А. Подробное описание этапов приведено ниже.

Пример 1.1. Создание и определение характеристик мышей с гуманизированным МНС I

Создание мышей с гуманизированным МНС I было описано ранее в публикации патента США №20130111617, включенной в настоящий документ путем ссылки. Вкратце,

мышиный ген H-2K был гуманизирован в одну стадию посредством конструирования уникального нацеливающего вектора из ДНК человеческой и мышиной бактериальной искусственной хромосомы (BAC) по технологии VELOCIGENE® (см., например, патент США №6,586,251 и публикацию Valenzuela et al. (2003) High-throughput engineering of the mouse genome coupled with high-resolution expression analysis, Nat. Biotech. Nat. Biotech. 21

(6): 652-659). ДНК из мышного клона BAC RP23-173k21 (Invitrogen) модифицировали путем гомологичной рекомбинации с замещением геномной ДНК, кодирующей домены α1, α2 и α3 мышного гена H-2K, человеческой геномной ДНК, кодирующей субъединицы α1, α2 и α3 человеческого гена HLA-A (ФИГ. 2А).

В частности, геномную последовательность, кодирующую мышиные субъединицы $\alpha 1$, $\alpha 2$ и $\alpha 3$ гена H-2K, замещали человеческой геномной ДНК, кодирующей домены $\alpha 1$, $\alpha 2$ и $\alpha 3$ человеческого гена HLA-A*0201, путем одиночного нацеливания с использованием нацеливающего вектора, содержащего гигромициновую кассету,

5 фланкированную сайтами loxP, гомологичное плечо на 5'конце, содержащее последовательность 5' мышиного локуса H-2K, включающую нетранслируемую область (UTR) 5', и гомологичное плечо на 3'-конце, содержащее геномную последовательность 3' мышью кодирующей последовательности H-2K $\alpha 3$.

Конечный конструкт для нацеливания на эндогенный локус гена H-2K включал (от

10 5' к 3'): (1) гомологичное плечо на 5'-конце, содержащее ~ 200 п.н. мышью геномной последовательности 5' эндогенного гена H-2K, включая 5'UTR; (2) ~ 1339 п.н. человеческой геномной последовательности, включая лидерную последовательность HLA-A*0201, лидерную последовательность/ $\alpha 1$ инtron HLA-A*0201, экзон $\alpha 1$ HLA-A*0201, инtron $\alpha 1\text{-}\alpha 2$ HLA-A*0201, экзон $\alpha 2$ HLA-A*0201, ~ 316 п.н. 5'-конца интрана 15 $\alpha 2\text{-}\alpha 3$; (3) сайт 5' loxP; (4) гигромициновую кассету; (5) сайт 3' loxP; (6) ~ 580 п.н. человеческой геномной последовательности, включающей ~ 304 п.н. 3'-конца интрана $\alpha 2\text{-}\alpha 3$, экзон $\alpha 3$ HLA-A*0201; и (7) гомологичное плечо на 3'-конце, содержащее ~ 200 п.н. мышью геномной последовательности, включая инtron между 20 последовательностями, кодирующими мышью H-2K $\alpha 3$ и трансмембранный домен.

20 Последовательность из 149 нуклеотидов в участке соединения мышью/человеческой последовательностей на 5'-конце нацеливающего вектора представлена в SEQ ID NO: 90, а последовательность из 159 нуклеотидов в участке соединения человеческой/мышью последовательностей на 3'-конце нацеливающего вектора представлена в 25 SEQ ID NO: 91. Гомологичная рекомбинация с этим нацеливающим вектором позволила создать модифицированный мышью локус H-2K, содержащий человеческую геномную ДНК, кодирующую домены $\alpha 1$, $\alpha 2$ и $\alpha 3$ гена HLA-A*0201, функционально связанные с последовательностями, кодирующими трансмембранный и цитоплазматический домены эндогенного мышью H-2K, что при трансляции приводит к образованию химерного человеческого/мышью белка МНС класса I. Кассета селекции,

30 присутствующая в нацеливающем конструкте, может быть впоследствии удалена различными способами, известными в данной области.

Нацеленную ДНК ВАС использовали для электропорации мышью ЭС-клеток F1H4 с созданием модифицированных ЭС-клеток для получения мышей, у которых экспрессируется химерный белок МНС класса I на поверхности ядросодержащих клеток 35 (например, Т- и В-лимфоцитов, макрофагов, нейтрофилов) (см., например, этап 1 в схеме, показанной на ФИГ. 3А). ЭС-клетки, содержащие вставку человеческих последовательностей HLA, выявляли путем количественного анализа TAQMANTM (Valenzuela et al. (2003), выше).

Для создания мышей, экспрессирующих химерный МНС I, нацеленные ЭС-клетки, 40 описанные в настоящем документе, использовали в качестве донорских ЭС-клеток и внедряли в мышью эмбрион на стадии 8 клеток по способу VELOCIMOUSE® (см., например, патент США №7,294,754 и публикацию 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). Мышей VELOCIMICE® (мыши поколения 45 F0, полностью происходящие из донорской ЭС-клетки), независимо несущих химерный ген МНС класса I, определяют путем генотипирования с помощью анализа на модификацию аллеля (Valenzuela et al., выше), в котором обнаруживают присутствие уникальных последовательностей человеческого гена HLA-A*0201. Гетерозиготных

мышей, полученных этим способом, разводили до достижения гомозиготности. Экспрессию химерного HLA-A2/H-2K подтверждали с помощью проточной цитометрии с использованием антител, специфичных к HLA-A и H-2K.

Описанные выше нацеленные ЭС-клетки, содержащие химерный HLA-A2/H-2K,

5 использовали на дополнительных этапах конструирования, описанных в примерах 1.2-1.3, для создания мышей, содержащих гуманизированные локусы МНС I и МНС II и не содержащих эндогенные локусы МНС I и МНС II (см. ФИГ. 3А).

Пример 1.2. Создание мышиных ЭС-клеток, содержащих делеции локусов МНС I и МНС II

10 Делеция эндогенных локусов МНС II описана в публикации заявки на патент США №20130111616, включенной в настоящий документ путем ссылки. Вкратце, нацеливающий вектор для внедрения делеции эндогенных генов МНС класса II H-2Ab1, H-2Aa, H-2Eb1, H-2Eb2 и H-2Ea был получен с использованием генно-инженерной технологии VELOCIGENE® (см., например, патент США №6,586,251 и публикацию 15 Valenzuela et al., выше). ДНК искусственной бактериальной хромосомы (ВАС) RP23-458i22 (Invitrogen) была модифицирована с удалением эндогенных генов МНС класса II H-2Ab1, H-2Aa, H-2Eb1, H-2Eb2 и H-2Ea.

20 В частности, нижележащее и вышележащее гомологичные плечи были получены с помощью ПЦР мышиной ДНК ВАС из местоположений 5' от гена H-2Ab1 и 3' от гена H-2Ea соответственно. Эти гомологичные плечи использовали для создания кассеты, которая удалила ~ 79 т.п.н. RP23-458i22, содержащих гены H-2Ab1, H-2Aa, H-2Eb1, H-2Eb2 и H-2Ea локуса МНС класса II путем бактериальной гомологичной рекомбинации (BHR). Данную область заместили неомициновой кассетой, фланкированной сайтами lox2372. Конечный нацеливающий вектор включал (от 5' к 3') гомологичное плечо 26 т.п.н., содержащее мышнюю геномную последовательность ближе к 5'-концу от гена H-2Ab1 эндогенного локуса МНС класса II, сайт lox2372 5', неомициновую кассету, сайт lox2372 3' и гомологичное плечо 63 т.п.н., содержащее мышнюю геномную последовательность ближе к 3'-концу от гена H-2Ea эндогенного локуса МНС класса II.

30 Нацеливающий вектор ДНК ВАС (описанный выше) использовали для электропорации мышиных ЭС-клеток, содержащих гуманизированный локус МНС I (из примера 1.1 выше; см., например, этап 2 на ФИГ. 3А), для создания модифицированных ЭС-клеток, содержащих делецию эндогенного локуса МНС класса II (удалены как H-2A, так и H-2E). Положительные ЭС-клетки, содержащие удаленный 35 эндогенный локус МНС класса II, идентифицировали посредством количественного анализа ПЦР с использованием зондов TAQMANTM (Lie and Petropoulos (1998) Curr. Opin. Biotechnology 9:43-48). Область ближе к 5'-концу от удаленного локуса подтверждали посредством ПЦР с использованием праймеров 5111U F (CAGAACGCCAGGCTGTAAAC; SEQ ID NO: 1) и 5111U R (GGAGAGCAGGGTCAGTCAAC; SEQ ID NO: 2) и зонда 5111U P (CACCGCCACTCACAGCTCCTTACA; SEQ ID NO: 3), а область ближе к 3'-концу от удаленного локуса подтверждали с использованием праймеров 511ID F (GTGGGCACCATCTCATCATTC; SEQ ID NO: 4) и 511ID R (CTTCCTTCCAGGGTGTGACTC; SEQ ID NO: 5) и зонда 511ID P (AGGCCTGCGATCAGGTGGCACCT; SEQ ID NO: 6). Присутствие неомициновой кассеты 40 из нацеливающего вектора подтверждали с использованием NEOF (GGTGGAGAGGCTATTCCGC; SEQ ID NO: 7) и NEOR (GAACACGGCGGCATCAG; SEQ ID NO: 8) и зонда NEOP (TGGGCACAAACAGACAATCGGCTG; SEQ ID NO: 9).

Нуклеотидная последовательность, проходящая через точку делеции ближе к 5'-концу

(SEQ ID NO: 10), включала нижеследующее, что обозначает эндогенную мышиную последовательность ближе к 5'-концу от точки делеции (находящейся в скобках ниже), непрерывно связанную с последовательностью кассеты, находящейся в точке делеции: (TTTGTAAACA AAGTCTACCC AGAGACAGAT GACAGACTTC AGCTCCAATG

- 5 CTGATTGGTT CCTCACTTGG GACCAACCCT) ACCGGTATAA CTTCGTATAA GGTATCSTAT ACGAAGTTAT ATGCATGGCC TCCCGGCCGG. Нуклеотидная последовательность, проходящая через точку делеции ближе к 3'-концу (SEQ ID NO: 11), включала нижеследующее, что обозначает последовательность кассеты, смежную с эндогенной мышью последовательностью ближе к 3'-концу от точки делеции
- 10 (находящейся в скобках ниже): CGACCTGCAG CGGGCGCGCC ATAACCTTCGT ATAAGGTATC CTATACGAAG TTATCTCGAG (CACAGGCATT TGGGTGGGCA GGGATGGACG GTGACTGGGA CAATCGGGAT GGAAGAGCAT AGAATGGGAG TTAGGGAAGA).

После создания ЭС-клеток, содержащих как гуманизацию МНС I, так и делецию

- 15 эндогенного МНС II, описанную выше, фланкированную сайтами loxP, неомициновую кассету удаляли с использованием CRE (см., например, этап 3 на ФИГ. 3А). В частности, плазмиду, кодирующую рекомбиназу Cre, электропорировали в ЭС-клетки для удаления неомициновой кассеты. Неомициновая кассета также может быть удалена с использованием других способов, известных в данной области.

- 20 При удалении мышного локуса H-2D BHR использовали для модификации мышного клона BAC bMQ-218H21 (Sanger Institute), заместив 3756 п.н. гена H-2D (от старт-кодона ATG до 3 п.н. ближе к 3'-концу от стоп-кодона TGA, экзоны 1-8 мышного H-2D) 6085 п.н. кассеты, содержащей (от 5' к 3'): ген LacZ в пределах рамки считывания с сайтом loxp 5', промотор UbC, ген неомицина и сайт loxp 3'.

- 25 Нацеливающий вектор ДНК BAC (описанный выше) использовали для электропорации мышиных ЭС-клеток, содержащих гуманизированный локус МНС I и делецию мышного МНС II, описанных выше (см., например, этап 4 на ФИГ. 3А). Положительные ЭС-клетки, содержащие удаленный эндогенный локус H-2D, выявляли посредством анализа количественной ПЦР, как описано выше. В таблице 2 приведены
- 30 праймеры и зонды, используемые для анализа количественной ПЦР.

Таблица 2. Праймеры и зонды анализа на потерю аллеля TAQMANTM для обнаружения удаленного локуса H-2D

Название (местоположение)	Прямой праймер	Обратный праймер	Зонд
35 5152 mTU (ближе к 5'-концу)	CGAGGAGCCCCGGTA CA (SEQ ID NO: 12)	AAGCGCACGAACCTCC TTGTT (SEQ ID NO: 13)	CTCTGTCGGCTATGT GG (SEQ ID NO: 14)
40 45 5152 mTD (ближе к 3'-концу)	GGACTCCCAGAACATCT CCTGAGA (SEQ ID NO: 15)	GAGTCATGAACCATC ACTGTGAAGA (SEQ ID NO: 16)	TGGTGGGTTGCTGGA A (SEQ ID NO: 17)

Пример 1.3. Внедрение химерного человеческого/мышиного локуса МНС II

Для создания вектора, содержащего гуманизированный HLA-DR2/H-2E, сначала мышиный ген H-2Ea модифицировали в соответствии с описанием в патенте США №8,847,005, выданном 30 сентября 2014 г. и включенном в настоящий документ путем ссылки, для создания вектора, содержащего последовательность, кодирующую химерный белок H-2Ea/HLA-DRA1*01.

Что касается мышьного гена H-2Eb, синтезированную человеческую цепь β HLA-DR2 (DRB1*1501) использовали для создания вектора, содержащего экзоны и интроны DRβ1*02(1501), и внедряли путем замены с помощью бактериальной гомологичной рекомбинации в вектор, содержащий химерный белок H-2Ea/HLA-DRA1*01. Ген H-2Eb1 модифицировали по существу так, как описано в публикации патента США №20130185820 и патенте США №8,847,005, каждый из которых включен в настоящий документ путем ссылки. Использовали гигромициновую кассету селекции.

Полученный большой нацеливающий вектор (LTVEC) HLA-DR2/H-2E показан на ФИГ. 2В и 3В. Различные участки соединения нуклеотидных последовательностей полученных LTVEC (например, участки соединения мышьной/человеческой последовательностей, участки соединения человеческой/мышьной последовательностей или участки соединения мышьной или человеческой последовательности с кассетами селекции) приведены ниже в таблице 3 и перечислены в перечне последовательностей; их местоположения показаны на принципиальной схеме на ФИГ. 3В. В таблице 3 ниже, за исключением последовательностей, отмеченных звездочками (*, см. легенду таблицы), мышьные последовательности указаны обычным шрифтом; человеческие последовательности указаны в скобках; последовательности Lox указаны курсивом; а сайты рестрикции, внедренные в ходе этапов клонирования, и другие векторные последовательности (например, сайты множественного клонирования и т.д.) указаны жирным шрифтом.

Таблица 3. Участки соединения нуклеотидных последовательностей химерного локуса HLA-DR2/H-2E

SEQ ID NO:	Нуклеотидная последовательность
18	CTGTTTCTTC CCTAACTCCC ATTCTATGCT CTTCCATCCC GA CCGC GG(CCCA ATCTCTCTCC ACTACTCCT GCCTACATGT ATGTAGGT)
19	(CAAGGTTTCC TCCTATGATG CTTGTGTGAA ACTCGG) GGCC GGCC AGCATTAAAC AGTACAGGGTA TGGGAGCACA GCTCAC
20*	(GAAAGCAGTC TTCCCAGCCT TCACACTCAG AGGTACAAAT) CCCCATTTTC ATATTAGCGA TTTTAATTAA TTCTAGCCTC
21*	TCTTCCCTAA CTCCCATTCT ATGCTCTTCC ATCCCGA CCG CGG (CCCAATC TCTCTCCACT ACTTCCTGCC TACATGTATG)
22	GAGTTCCCTCCATCACTTCACTGGTAGCACAGCTGTAAGTGTCCAGCCTG (TCCTGGGCTGCAGGTGGTGGCGTTGCGGGTGGGGCCGGTTAAGGTTCCA)

23	(TCCCCACATCCTATTAAATTGCTCCATGTTCTCATCTCCATCAGCACAG) CTCGAG ATAACTTCGTATAATGATGCTATACGAAGTTAT ATGCATGGCC
24	ATACGAAGTTAT GCTAGTAAC TATAACGGTCCTAAGGTAGCGAGTGGCTT ACAGGTAGGTGCGTGAAGCTCTACAAGCACAGTTGCCCTGGGAAGCA

Последовательности, отмеченные звездочкой, представляют собой последовательности участка соединения C57BL/6-BALB/c, где последовательности C57BL/6 приведены в скобках. В ходе клонирования химерного гена H-2Ea экзон 1 и остальную часть интрана 1 аллеля C57BL/6 H-2Ea замещали эквивалентной областью 10 2616 п.н., начиная от аллеля BALB/c H-2Ea. Это выполнялось в связи с тем, что экзон 1 аллеля C57BL/6 H-2Ea содержит делению, которая делает ген нефункциональным, тогда как экзон 1 аллеля BALB/c H-2Ea является функциональным. Более подробное описание см. в патенте США №8,847,005, включенном в настоящий документ путем ссылки.

Нацеленную ДНК ВАС, описанную выше, использовали для электропорации мышиных ЭС-клеток, содержащих гуманизированный МНС I (HLA-A2), а также делецию МНС II и H-2D, для получения модифицированных ЭС-клеток с целью создания мышей, которые экспрессируют химерные гены МНС I и МНС II и у которых отсутствует 15 функциональные эндогенные мышиные локусы H-2E, H-2A, H-2K и H-2D (см., например, этап 5 на ФИГ. 3А). ЭС-клетки, содержащие вставку человеческих последовательностей HLA, выявляли путем количественной ПЦР (TAQMAN™) с использованием праймеров и зондов из таблицы 4.

Таблица 4. Последовательности праймеров и зондов TAQMANTM для обнаружения гуманизации локусов МНС I и МНС II

Название (местоположение)	Прямой праймер	Обратный праймер	Зонд
Кассета Hyg	TGCGGCCGATCTTAG CC (SEQ ID NO: 25)	TTGACCGATTCCCTTG CGG (SEQ ID NO: 26)	ACGAGCGGGTCGG CCCATTC (SEQ ID NO: 27)
7092 hTUP1 (экзон 2 DRB1*1501)	CCCCACAGCACGTTT CCT (SEQ ID NO: 28)	CGTCCCATTGAAGAA ATGACACT (SEQ ID NO: 29)	TGGCAGCCTAAGAG G (SEQ ID NO: 30)
7092 hTUP2 (экзон 2 DRB1*1501)	CCCCACAGCACGTTT CCT (SEQ ID NO: 31)	ACCCGCTCCGTCCCA TT (SEQ ID NO: 32)	AGCCTAAGAGGGAG TGTC (SEQ ID NO: 33)

	7092 hTDP1 (экзон 3 DRB1*1501)	AGACCCCTGGTGATGC TGGAA (SEQ ID NO: 34)	CGCTTGGGTGCTCCA CTT (SEQ ID NO: 35)	TCGAAGTGGAGAGG TTTA (SEQ ID NO: 36)
5	7092 hTDP2 (экзон 3 DRB1*1501)	TGGAATGGAGTGAG CAGCTT (SEQ ID NO: 37)	GCACGGTCCCCCTTCT TAGTG (SEQ ID NO: 38)	TGACTTCCTAAATT CTC (SEQ ID NO: 39)
10	hDRAIU (экзон 2 DRA)	CTGGCGGCTTGAAGA ATTGG (SEQ ID NO: 40)	CATGATTTCCAGGTT GGCTTGTC (SEQ ID NO: 41)	CGATTGCCAGCTTT GAGGCTCAAGG (SEQ ID NO: 42)
15	1751jxn ² (анализ на потерю аллеля, удалена только последовательность, присутствующая в H-2A и H-2E)	CCTCACTTGGGACCA ACCCTA (SEQ ID NO: 43)	TTGTCCCAGTCACCG TCCAT (SEQ ID NO: 44)	TGCATCTCGAGCAC GGCATTTGG (SEQ ID NO: 45)
20				

25 ¹ Все последовательности, кроме этой, используются в анализе на приобретение аллеля.

Кассету селекции можно удалить способами, известными специалистам в данной области. Например, ЭС-клетки, несущие химерный человеческий/мышиный локус МНС класса I, могут быть трансфицированы конструктором, который экспрессирует Cre, для удаления фланкированной loxP кассеты селекции, внедренной путем вставки нацеливающего конструкта (см., например, этап 6 на ФИГ. 3А). Кассета селекции может быть необязательно удалена посредством выведения мышей, которые экспрессируют рекомбиназу Cre. Необязательно кассета селекции у мышей может быть сохранена.

Нацеленные ЭС-клетки, содержащие все из модификаций, описанных в настоящем документе (HLA-A2/H-2K, HLA-DR2/H-2E, H-2A-del, H-2D-del на ФИГ. 3А), проверяли с помощью количественного анализа TAQMAN®, описанного выше, с использованием наборов праймер/зонд, описанных в настоящем документе, для отдельных модификаций. Дополнительный набор праймер/зонд использовали для определения того, что в ходе этапа делеции кассеты не был создан инвертированный клон из-за наличия сайтов lox в противоположной ориентации.

Нацеленные ЭС-клетки, описанные выше, использовали в качестве донорских ЭС-клеток и внедряли в мышиный эмбрион на стадии 8 клеток по способу VELOCIMOUSE® (см., например, патент США №7,294,754 и публикацию Poueymirou et al. (2007), выше). Мышей VELOCIMICE® (мыши поколения F0, полностью происходящие из донорской 45 ЭС-клетки), независимо несущих химерный ген МНС класса I и МНС класса II, определяли путем генотипирования с помощью анализа на модификацию аллеля (Valenzuela et al, выше), в котором обнаруживают присутствие уникальных последовательностей человеческого гена. Схематически генотип локусов МНС у

полученных мышей представлен на ФИГ. 3С (** обозначает ген H-2L, который отсутствует во всех мышиных штаммах). Экспрессию обоих химерных человеческих/ мышиных белков МНС I и МНС II подтверждают с использованием антител, специфичных к человеческим HLA-DR2 и HLA-A2. Гетерозиготных мышей разводили до достижения гомозиготности.

5 Пример 1.4. Создание мышей с гуманизированным β 2-микроглобулином

Создание мышей с β 2-микроглобулином описано в публикации заявки на патент

США №20130111617, включенной в настоящий документ путем ссылки. Вкратце,

мышиный ген β 2-микроглобулина (β 2m) гуманизировали за один этап посредством

10 конструирования уникального нацеливающего вектора из ДНК человеческой и мышиной бактериальных искусственных хромосом (BAC) по технологии VELOCIGENE® (см., например, патент США №6,586,251 и публикацию Valenzuela et al., выше).

В частности, нацеливающий вектор был создан путем бактериальной гомологичной рекомбинации, включающей вышележащее и нижележащее гомологичные плечи

15 мышиного β 2m из клона BAC 89C24 из библиотеки RPCI-23 (Invitrogen). Мышиные гомологичные плечи были разработаны таким образом, чтобы ограничивать человеческий фрагмент ДНК β 2m 2,8 т.п.н., проходящий от экзона 2 до приблизительно 267 нуклеотидов ближе к 3'-концу от некодирующего экзона 4 (ФИГ. 2С). Кассету селекции лекарственными средствами (неомицином),flenkированную сайтами

20 распознавания рекомбиназы (например, сайтами loxP), внедряли в нацеливающий вектор, чтобы обеспечить возможность последующей селекции. Конечный нацеливающий вектор линеаризовывали и электропорировали в мышнюю линию ЭС-клеток F1H4 (Valenzuela et al., выше).

Нацеленные ЭС-клеточные клонны с удаленной кассетой селекции лекарственными

25 средствами (путем внедрения рекомбиназы Cre) внедряли в мышний эмбрион на стадии 8 клеток по способу VELOCIMOUSE® (см., например, патент США №7,294,754 и публикацию Poueymirou et al., выше). Мышей VelociMice® (мыши F0, полученные полностью из донорской ЭС-клетки), несущих гуманизированный ген β 2m, выявляли путем скрининга для определения утраты мышиного аллеля и приобретения

30 человеческого аллеля с использованием анализа на модификацию аллеля (см. Valenzuela et al., выше). Гетерозиготных мышей разводили до достижения гомозиготности. Экспрессию человеческого β 2-микроглобулина подтверждали посредством проточной цитометрии с использованием антител, специфичных к человеческому β 2-микроглобулину.

35 Пример 2. Создание мышей с гуманизированным Т-клеточным рецептором

Мышей, содержащих делецию эндогенных вариабельных локусов TCR (α или β) и замещение эндогенных сегментов V и J или V, D и J, получают с использованием генно-инженерной технологии VELOCIGENE® (см., например, патент США №6,586,251 и публикацию Valenzuela, D.M., et al. (2003), выше), причем человеческие

40 последовательности, полученные из библиотек BAC с помощью бактериальной гомологичной рекомбинации, используют для создания больших нацеливающих векторов (LTVEC), содержащих геномные фрагменты человеческих вариабельных локусов TCR, flankированных нацеливающими плечами, для нацеливания LTVEC на эндогенные мышиные вариабельные локусы TCR в мышиных ЭС-клетках. Подробное

45 описание гуманизации альфа- и бета-локусов TCR приведено в патенте США №9,113,616, включенному в настоящий документ путем ссылки. LTVEC повторно линеаризовывали и электропорировали в линию мышиных ЭС-клеток в соответствии с публикацией Valenzuela et al. ЭС-клетки подвергали селекции на основании резистентности к

гигромицину или неомицину и скринингу на потерю аллеля или приобретение аллеля.

Нацеленные ЭС-клеточные клоны внедряли в мышиные эмбрионы на стадии 8 клеток (или ранее) по способу VELOCIMOUSE® (Poueymirou, W.T. et al. (2007), выше). Мышей VELOCIMICE® (мыши F0, полученные полностью из донорской ЭС-клетки), несущих гуманизированные локусы TCR, выявляют путем скрининга на потерю эндогенного вариабельного аллеля TCR и приобретение человеческого аллеля с использованием анализа на модификацию аллеля (см. Valenzuela et al., выше). Детенышей F0 5 генотипировали и разводили до достижения гомозиготности. Мышей, гомозиготных по гуманизированным вариабельным локусам TCR α и/или TCR β , получают так, как описано в настоящем документе.

Пример 2.1. Гуманизация альфа-локуса TCR

1,5 м.п.н. ДНК в мышином локусе TCR α , соответствующих 110 V и 60 J мышним сегментам, замещали 1 м.п.н. ДНК, соответствующих 54 V- и 61 J-сегментам человеческого TCR α , с использованием стратегии последовательной гуманизации, 15 изображенной на ФИГ. 4А и описанной в патенте США №9,113,616. Соединительные последовательности нуклеиновых кислот различных нацеливающих векторов, используемых для стратегии последовательной гуманизации локуса TCR α , приведены в таблице 5 и включены в перечень последовательностей.

20

25

30

35

40

45

Таблица 5. Соединительные последовательности нуклеиновых кислот для различных нацеливающих векторов для локуса TCR α

№ MAID	SEQ ID NO	Описание
1626	46	Соединительная последовательность нуклеиновых кислот между 3'-концом мышиной последовательности, расположенной ближе к 5'-концу от вариабельного локуса TCR α , и 5'-концом кассеты <i>loxP-Ub-Hyg-loxP</i> .
	47	Соединительная последовательность нуклеиновых кислот между 3'-концом кассеты <i>loxP-Ub-Hyg-lox</i> и 5'-концом вставки человеческих TCRV α 40-TCRV α 41-TCRJ α 1, включая сайт <i>AsiSI</i> .
1767	48	Соединительная последовательность нуклеиновых кислот между 3'-концом вставки человеческих TCRV α 40-TCRV α 41-TCRJ α 1 и 5'-концом мышиной последовательности, расположенной ближе к 3'-концу от человеческого вариабельного локуса TCR α , включая сайт <i>NotI</i> .
	49	Соединительная последовательность нуклеиновых кислот между 3'-концом мышиной последовательности, расположенной ближе к 5'-концу от вариабельного локуса TCR α , и 5'-концом кассеты <i>loxP-Ub-Neo-loxP</i> .
1979	50	Соединительная последовательность нуклеиновых кислот между 3'-концом кассеты <i>loxP-Ub-Neo-loxP</i> и 5'-концом вставки человеческих TCRV α 35-TCRV α 39, включая сайт <i>AsiSI</i> .
	51	Соединительная последовательность нуклеиновых кислот между 3'-концом мышиной последовательности, расположенной ближе к 5'-концу от вариабельного локуса TCR α , и 5'-концом кассеты <i>frt-Pgk-Hyg-frt</i> .
	52	Соединительная последовательность нуклеиновых кислот между 3'-концом кассеты <i>frt-Pgk-Hyg-frt</i> и 5'-концом вставки человеческих TCRV α 22-TCRV α 34, включая сайт <i>AsiSI</i> .

№ MAID	SEQ ID NO	Описание
5 1769	53	Соединительная последовательность нуклеиновых кислот между 3'-концом мышиной последовательности, расположенной ближе к 5'-концу от вариабельного локуса TCRα, и 5'-концом кассеты loxP-Ub-Neo-loxP.
	54	Соединительная последовательность нуклеиновых кислот между 3'-концом кассеты loxP-Ub-Neo-loxP и 5'-концом вставки человеческих TCRVα13-2–TCRVα21, включая сайт AsiSI.
10 1770	55	Соединительная последовательность нуклеиновых кислот между 3'-концом мышиной последовательности, расположенной ближе к 5'-концу от вариабельного локуса TCRα, и 5'-концом кассеты loxP-Ub-Hyg-loxP.
	56	Соединительная последовательность нуклеиновых кислот между 3'-концом кассеты loxP-Ub-Hyg-lox и 5'-концом вставки человеческих TCRVα6–TCRVα8-5, включая сайт AsiSI.
15 1771	57	Соединительная последовательность нуклеиновых кислот между 3'-концом мышиной последовательности, расположенной ближе к 5'-концу, и вариабельным локусом TCRα от 5'-конца кассеты loxP-Ub-Neo-loxP.
	58	Соединительная последовательность нуклеиновых кислот между 3'-концом кассеты loxP-Ub-Neo-loxP и 5'-концом вставки человеческих TCRVα1-1–TCRVα5, включая сайт AsiSI.

Человеческие сегменты вариабельного участка TCRα пронумерованы так же, как в базе данных IMGT. По меньшей мере 100 п.н. в каждом участке соединения (приблизительно 50 п.н. с каждого конца) включены в перечень последовательностей.

Сначала ДНК из мышного клона BAC RP23-6A14 (Invitrogen) модифицировали путем гомологичной рекомбинации и использовали в качестве нацеливающего вектора для замещения области TCRAJ1-TCRAJ28 эндогенного мышного локуса TCRα кассетой Ub-гигромицин с последующим сайтом loxP. ДНК из мышного клона BAC RP23-117i19 (Invitrogen) модифицировали путем гомологичной рекомбинации и использовали в качестве нацеливающего вектора для замещения области ~ 15 т.п.н., окружающей (и включающей) TCRAV1 эндогенного мышного локуса TCRα и δ, кассетой PGK-неомицин с последующим сайтом loxP. ЭС-клетки, несущие дважды нацеленную хромосому (т.е. один эндогенный мышний локус TCRα нацеливали обоими из этих нацеливающих векторов), идентифицировали путем кариотипирования и способов скрининга (например, TAQMAN™), известных в данной области. Модифицированные ЭС-клетки обрабатывали рекомбиназой CRE, таким образом опосредуя делецию области между двумя сайтами loxP (т.е. области, состоящей из эндогенного мышного локуса TCRα от TCRAV1 до

TCRAJ1) и оставляя только один сайт loxP, неомициновую кассету и мышиные константный и энхансерный участки. Эта стратегия приводила к созданию удаленного мышиного локуса TCR α/δ (MAID 1540, ФИГ. 4А, вторая схема).

Первый человеческий нацеливающий вектор с TCRα содержал 191 660 п.н.

- 5 человеческой ДНК из клонов BAC CTD2216p1 и CTD2285m07 (Invitrogen), которые содержали первые два последовательных человеческих сегмента гена V TCRα (TRAV40 и 41) и 61 сегмент гена J (50 функциональных) TCRα. BAC модифицировали путем гомологичной рекомбинации с включением 403 п.н. сайта Not1 ближе к 3'-концу от сегмента гена J1 TCRα для лигирования мышиного гомологичного плеча 3' и сайта 10 AsiSI 5' для лигирования мышиного гомологичного плеча 5'. Два разных гомологичных плеча использовали для лигирования с этим человеческим фрагментом: гомологичное плечо 3' содержало эндогенные мышиные последовательности TCRα из клона BAC RP23-6A14, а гомологичное плечо 5' содержало эндогенную последовательность TCRα ближе к 5'-концу от мышиного TCRαV из мышиного клона BAC RP23-117i19. Этую 15 мышнюю-человеческую химерную BAC использовали в качестве нацеливающего вектора (MAID 1626) для выполнения начальной вставки человеческих сегментов гена TCRα и кассеты loxP-ub-hygromycin-loxP ближе к 5'-концу в мышиных локусах TCRα. Соединительные последовательности нуклеиновых кислот (SEQ ID NO: 46-48) для нацеливающего вектора MAID 1626 описаны в таблице 5.

- 20 Впоследствии был получен ряд человеческих нацеливающих векторов, в которых использовалось то же мышнее плечо 5', которое включало эндогенную последовательность TCRα ближе к 5'-концу от мышиного TCRαV, из мышиного клона BAC RP23-117i19 с чередующимися кассетами селекции loxP-неомицин-loxP и loxP-гигромицин-loxP (или frt-гигромицин-frt в случае MAID 1979). Конкретные конструкты 25 описаны в патенте США №9,113,616 и показаны на ФИГ. 4А, а соединительные последовательности для каждой вставки включены в таблицу 5 и перечень последовательностей. Конечный локус TCRα содержал кассету loxP-ub-неомицин-loxP 5' и всего 54 человеческих сегмента гена TCRαV (45 функциональных) и 61 человеческий сегмент гена TCRαJ, функционально связанных с мышними константными генами и 30 энхансерами TCRα. Соединительные последовательности нуклеиновых кислот (SEQ ID NO: 57 и 58) для нацеливающего вектора MAID 1771 описаны в таблице 5.

На любом из последовательных этапов гуманизации кассеты селекции удаляли путем делеции рекомбиназой CRe или Flp. Кроме того, человеческий локус TCRδ может быть повторно внедрен в последовательность TCR альфа.

- 35 Пример 2.2. Гуманизация вариабельного локуса TCRβ
0,6 м.п.н. ДНК в мышном локусе TCRβ, соответствующих мышним сегментам 33 V, 2 D и 14 J, замещали 0,6 м.п.н. ДНК, соответствующих сегментам 67 V, 2 D и 14 J человеческого TCRβ, с использованием стратегии последовательной гуманизации, изображенной на ФИГ. 4В и подробно описанной в патенте США №9,113,616.
- 40 Соединительные последовательности нуклеиновых кислот различных нацеливающих векторов, используемых для стратегии последовательной гуманизации локуса TCRβ, приведены в таблице 6 и включены в перечень последовательностей.

Таблица 6. Соединительные последовательности нуклеиновых кислот для различных нацеливающих векторов для локуса TCR β

№ MAID	SEQ ID NO	Описание
1625	59	Соединительная последовательность нуклеиновых кислот между 3'-концом мышиной последовательности, расположенной ближе к 5'-концу от вариабельного локуса TCR β (рядом с мышиными генами трипсиногена, расположенными ближе к 5'-концу), и 5'-концом кассеты <i>frt</i> -Ub-Neo- <i>frt</i> .
	60	Соединительная последовательность нуклеиновых кислот между 3'-концом кассеты <i>frt</i> -Ub-Neo- <i>frt</i> и 5'-концом вставки человеческого TCRV β 18-TCRV β 29-1.
	61	Соединительная последовательность нуклеиновых кислот между 3'-концом вставки человеческих TCRV β 18-TCRV β 29-1 и 5'-концом мышиной последовательности, расположенной ближе к 3'-концу от мышных сегментов TCRV β (рядом с мышными генами трипсиногена, расположенными ближе к 3'-концу).
1715	62	Соединительная последовательность нуклеиновых кислот между 3'-концом нижележащих мышных генов трипсиногена и 5'-концом вставки человеческих TCRD β 1-TCRJ β 1-1-TCRJ β 1-6, включая сайт I _{ceu} I.

30

35

40

45

№ MAID	SEQ ID NO	Описание
5	63	Соединительная последовательность нуклеиновых кислот между 3'-концом вставки человеческих TCRD β 1-TCRJ β 1-1-TCRJ β 1-6 и 5'-концом кассеты loxP-Ub-Hyg-loxP.
10	64	Соединительная последовательность нуклеиновых кислот между 3'-концом кассеты loxP-Ub-Hyg-lox и 5'-концом мышиной последовательности рядом с мышевым геном С β 1.
15	65	Соединительная последовательность нуклеиновых кислот между 3'-концом мышиной последовательности рядом с мышевым геном С β 1 и 5'-концом вставки человеческих TCRD β 2-TCRJ β 2-1-TCRJ β 2-7, включая сайт NotI.
20	66	Соединительная последовательность нуклеиновых кислот между 3'-концом вставки человеческих TCRD β 2-TCRJ β 2-1-TCRJ β 2-7 и 5'-концом мышиной последовательности, расположенной ближе к 3'-концу от человеческого вариабельного локуса TCR β (рядом с мышевым последовательностью С β 2).
25	67	Соединительная последовательность нуклеиновых кислот между 3'-концом мышиной последовательности, расположенной ближе к 5'-концу от вариабельного локуса TCR β (рядом с мышевыми генами трипсиногена, расположенными ближе к 5'-концу), и 5'-концом кассеты frt-Ub-Hyg-frt.
30	1791	Соединительная последовательность нуклеиновых кислот между 3'-концом кассеты frt-Ub-Hyg-frt и 5'-концом вставки человеческих TCRV β 6-5-TCRV β 17.
35	1792	Соединительная последовательность нуклеиновых кислот между 3'-концом мышиной последовательности, расположенной ближе к 5'-концу от вариабельного локуса TCR β (рядом с мышевыми генами трипсиногена, расположенными ближе к 5'-концу), и 5'-концом кассеты frt-Ub-Neo-frt.
40	70	Соединительная последовательность нуклеиновых кислот между 3'-концом кассеты frt-Ub-Hyg-frt и 5'-концом вставки человеческих TCRV β 1-TCRV β 12-2.
45		

№ MAID	SEQ ID NO	Описание
5	71	Соединительная последовательность нуклеиновых кислот между 3'-концом мышиной последовательности рядом с мышевым геном Сβ2 и 5'-концом человеческой последовательности экзона 2 TCRBV30.
10	6192 72	Соединительная последовательность нуклеиновых кислот между 3'-концом человеческой последовательности экзона 1 TCRBV30 и 5'-концом мышиной последовательности, расположенной ближе к 3'-концу от локуса TCRβ.

Человеческие сегменты вариабельного участка TCRβ пронумерованы так же, как в базе данных IMGT. По меньшей мере 100 п.н. в каждом участке соединения (приблизительно 50 п.н. с каждого конца) включены в перечень последовательностей.

В частности, ДНК из мышевого клона BAC RP23-153p19 (Invitrogen) модифицировали путем гомологичной рекомбинации и использовали в качестве нацеливающего вектора для замещения области 17 т.п.н. (включая TCRBV30), прилегающей ближе к 5'-концу к кластеру гена трипсиногена (TRY) 3' в эндогенном мышевом локусе TCRβ, кассетой PGK-неомицин с последующим сайтом loxP. ДНК из мышевого клона BAC RP23-461h15 (Invitrogen) модифицировали путем гомологичной рекомбинации и использовали в качестве нацеливающего вектора для замещения области 8355 п.н. (включая TCRBV2 и TCRBV3) ближе к 3'-концу к кластеру гена трипсиногена (TRY) 5' в эндогенном мышевом локусе TCRβ, кассетой Ub-гигромицин с последующим сайтом loxP. ЭС-клетки, несущие дважды нацеленную хромосому (т.е. один эндогенный мышевый локус TCRβ, нацеленный обоими нацеливающими векторами), идентифицировали с помощью кариотипирования и способов скрининга (например, TAQMAN™), известных в данной области. Модифицированные ЭС-клетки обрабатывали рекомбиназой CRE, опосредуя делецию области между сайтами loxP 5' и 3' (состоящими из эндогенного мышевого локуса TCRβ от TCRBV2 до TCRBV30) и оставляя только один сайт loxP, гигромициновую кассету и мышевы TCRBD, TCRBJ, константную и энхансерную последовательности. Один мышевый TCRVβ был оставлен ближе к 5'-концу от кластера 5' генов трипсиногена, и один мышевый TCRVβ был оставлен ближе к 3'-концу от мышевого Еβ, как показано на Фиг. 4В.

Первый человеческий нацеливающий вектор с TCRβ содержал 125 781 п.н. человеческой ДНК из клона BAC CTD2559j2 (Invitrogen), который содержал первые 14 последовательных человеческих сегмента гена TCRβV (TRBV18-TRBV29-1); соединительные последовательности нуклеиновых кислот (SEQ ID NO: 59-61) для нацеливающего вектора MAID 1625 описаны в таблице 6.

Для замещения мышевых сегментов TCRβ D и J человеческими сегментами TCRβ D и J ДНК из мышевого клона BAC RP23-302p18 (Invitrogen) и из человеческого клона BAC RP11-701D14 (Invitrogen) модифицировали путем гомологичной рекомбинации и использовали в качестве нацеливающего вектора (MAID 1715) в ЭС-клетках, которые содержали небольшой локус TCRβV, описанный выше (т.е. MAID 1625). В результате этой модификации были замещены ~ 18540 п.н. (от 100 п.н. ближе к 3'-концу от poly A генов трипсиногена 3' до 100 п.н. ближе к 3'-концу от сегментов J в кластере D2, который включал мышевый TCRBD1-J1, мышевый константный 1 и мышевый TCRBD2-J2) в

эндогенном мышином локусе TCR β , при этом ~ 25 425 п.н. последовательности содержали человеческий TCRBD1-J1, кассету loxP Ub-гигромицин-loxP, мышиный константный 1, человеческий TCRBD2-J2. ЭС-клетки, несущие дважды нацеленную хромосому (т.е. один эндогенный мышиный локус TCR β , нацеленный обоими

5 нацеливающими векторами), идентифицировали с помощью кариотипирования и способов скрининга (например, TAQMANTM), известных в данной области.

Модифицированные ЭС-клетки обрабатывали рекомбиназой CRE, таким образом опосредуя делецию гигромициновой кассеты и оставляя только один сайт loxP ближе к 3'-концу от человеческих сегментов J в кластере D1J. Соединительные

10 последовательности нуклеиновых кислот (SEQ ID NO: 62-66) для нацеливающего вектора MAID 1715 описаны в таблице 6.

Впоследствии получили ряд человеческих нацеливающих векторов, в которых использовалось то же мышье плечо 5', которое содержало эндогенную последовательность TCR β , окружающую мышиные гены трипсиногена, расположенные 15 ближе к 5'-концу, из мышного клона BAC RP23-461h15 с чередующимися кассетами селекции. Конкретные конструкты описаны в патенте США №9,113,616 и показаны на ФИГ. 4В, а соединительные последовательности для каждой вставки включены в таблицу 6 и перечень последовательностей.

В конечном счете был создан человеческий небольшой локус TCR β , содержащий 20 всего 66 человеческих сегментов TCRPV (47 функциональных) и человеческих сегментов TCR β D и J (MAID 1792), функционально связанных с мышными константными генами и энхансерами TCR β . Соединительные последовательности нуклеиновых кислот (SEQ ID NO: 69 и 70) для нацеливающего вектора MAID 1792 описаны в таблице 6.

Мыший TCRBV31 расположен приблизительно на 9,4 т.п.н. ближе к 3'-концу от 25 TCRBV2 (вторая последовательность константного участка TCRB) и находится в противоположной ориентации по отношению к другим сегментам TCRBV. Эквивалентный человеческий сегмент V представляет собой TCRBV30, который находится в аналогичном положении в человеческом локусе TCRB. Для гуманизации TCRBV31 мышний клон BAC, содержащий мышний TCRBV31, модифицировали 30 путем бактериальной гомологичной рекомбинации с получением LTVEC MAID 6192. Весь кодирующий регион, начинающийся со старт-кодона в экзоне 1, инtron, 3' UTR и рекомбинационные сигнальные последовательности (RSS) TCRBV31 замещали гомологичными человеческими последовательностями TCRBV30. На ФИГ. 4В показана кассета селекции, расположенная в интроне между экзоном 1 и экзоном 2 гена 35 hTCRBV30.

Соединительные последовательности нуклеиновых кислот (SEQ ID NO: 71 и 72) для нацеливающего вектора MAID 6192 описаны в таблице 6. ДНК MAID 6192 электропорировали в ЭС-клетки MAID 1792, и клетки подвергали скринингу на потерю мышного аллеля TCRB31 и приобретение человеческого аллеля TCRB30.

40 Аналогичная генно-инженерная стратегия используется для необязательной делеции оставшегося 5' мышного сегмента V TCR β .

На любом из вышеуказанных этапов кассеты селекции удаляли путем делеции рекомбиназой Cre или Flp.

Мышей, гомозиготных по гуманизированному вариабельному локусу TCR α , 45 скрещивали с мышами, гомозиготными по гуманизированному вариабельному локусу TCR β , с получением потомства, содержащего гуманизированные вариабельные локусы TCR α и TCR β . Потомство разводили до достижения гомозиготности по гуманизированным локусам TCR α и TCR β .

Подтверждали, что у мышей, содержащих гуманизированные вариабельные локусы TCR α и TCR β , протекает нормальное развитие Т-клеток, и они содержат Т-клеточные рецепторы, которые экспрессируют вариабельные домены, полученные из множества вариабельных сегментов гена.

⁵ Пример 3. Гуманизация локусов Т-клеточного корецептора

Гуманизация локусов CD4 и CD8 (локусы как CD8 альфа, так и CD8 бета) подробно описана в публикации заявки на патент США №20140245466, полностью включенной в настоящий документ путем ссылки.

Пример 3.1. Гуманизация локуса CD4

¹⁰ В частности, мышиный локус CD4 гуманизировали за один этап путем конструирования уникального нацеливающего вектора из ДНК человеческой и мышиной бактериальных искусственных хромосом (BAC) по технологии VELOCIGENE® (см., например, патент США №6,586,251 и публикацию Valenzuela et al. (2003), выше). Для получения нацеливающего вектора выполняли ряд бактериальных гомологичных ¹⁵ рекомбинаций (BHR) с использованием ДНК искусственной бактериальной хромосомы (BAC), а также другие этапы генной инженерии, как подробно описано в публикации заявки на патент США №20140245466.

Нацеливающий вектор, содержащий человеческий CD4, линеаризовывали с помощью NotI и электропорировали в мышиные ЭС-клетки F1H4. Нацеленные ЭС-клетки, несущие ²⁰ гуманизированный локус CD4, выявляли путем генотипирования с использованием анализа на модификацию аллеля (Valenzuela et al.), который обнаруживал присутствие неомициновой кассеты и человеческого гена CD4, а также одной копии мышного гена CD4.

Конечный гуманизированный локус CD4, полученный в результате успешного ²⁵ встраивания гуманизированного нацеливающего вектора CD4 в ЭС-клетки, показан на ФИГ. 5А. Последовательность участка соединения человеческого интрана 3 с кассетой lox-neo (5'-конец кассеты) представлена в SEQ ID NO: 75, а последовательность участка соединения кассеты lox-neo (3' конец кассеты) с человеческим интроном 3 представлена в SEQ ID NO: 76; обе последовательности также перечислены в таблице ³⁰ 7. Полная последовательность нуклеиновых кислот гуманизированной части CD4, включая кассету pgk-neo, показанную на Фиг. 5А, представлена в SEQ ID NO: 77. Кассета pgk-neo охватывает остатки 307-2176 в SEQ ID NO: 77, два сайта lox расположены в пределах остатков 267-300 и 2182-2215, а человеческая последовательность охватывает остатки 1-234 и 2222-18263. Аминокислотная последовательность полностью ³⁵ гуманизированного белка CD4 представлена в SEQ ID NO: 78, причем человеческая последовательность охватывает аминокислоты 27-319 (представлены в SEQ ID NO: 79).

Таблица 7. Соединительные последовательности нацеливающего вектора, содержащего химерный CD4

Соединение	Последовательность	SEQ ID NO
Мышиный/ человеческий участок соединения ближе к 5'-концу	AGGGGAAACCCGCAAAGGATGGGACATAGGGAGA CAGCTGTTAACATCTGAAACATGACCTCTTTCTG TGCAGCACAACTCCTAGCTGTCACTCAAGGG(AAGA AAGTGGTGCTGGCAAAAAGGGGATACAGTGGAA CTGACCTGTACAGCTTCCCAGAAGAAGAGCATACA ATTCCACTGGAAAAACTCCAACCAGAT)	73
Человеческий/ мышиный участок соединения ближе к 3'-концу	(CTGGTCACCTGGATGAAGTGAGGGAGGGCCCTCTG GGTTTGGGCTGGTTTGAAC TGAGACATCCATGAG CCAGCCTGGGCTGGCTTCACTGAAGATC)ATCTAT GTCGGGTGCGGAGAAAGAGGTAATGAAATGGCA CATGCTATGTACAAACTCTATTGCTGAGCAGCACCC AGTCCTGAGCTGGCTCTGAATTGAGGGTGAAATTCA CACATTCTCCCCAACATCTATAATCTGG	74
Человеческая последовательность/ сайт lox 5'	(TATGGAGTGAAAGCCTTGGTGTCTGAGATCTGGT CTTAGTTAAACTCTGGGATC)GGCGCGCCGAATTCT GCAGCCCCGGCTCGAGATAACTCGTATAATGTATGCT ATACGAAGTTATATGCATCCGGGTAGGGGAGGCGCTTT TCCC	75
Сайт lox 3'/ человеческий	AGTATTGTTTGCCAAGTTCTAATTCCATCAGACCTCGA CCTGCAGCCCTAGATAACTCGTATAATGTATGCTATAC GAAGTTATCCTAGG(CCAGAGGGCTGGGTTGACAGA AACTCAGTGGCATTCTTATCCAGAGTTCTACAC C)	76

Человеческие последовательности приведены в скобках, а последовательность, содержащая сайт рестриктазы (PI-Sce I), указана жирным шрифтом. Последовательности кассеты селекции указаны курсивом.

Фланкированную сайтами loxP кассету резистентности к неомицину удаляли путем электропорации плазмида, экспрессирующей рекомбиназу Cre, в ЭС-клетки, содержащие гуманизированный локус CD4.

Нацеленные ЭС-клетки, несущие гуманизированный локус CD4 без маркера резистентности, выявляли путем генотипирования, которое обнаруживало отсутствие неомициновой кассеты, присутствие одной копии человеческого гена CD4 и одной

копии мышного гена CD4.

Нацеленные ЭС-клетки, описанные выше, использовали в качестве донорских ЭС-клеток и внедряли в мышный эмбрион на стадии 8 клеток по способу VELOCIMOUSE® (см., например, патент США №7,294,754 и публикацию Poueymirou et al. (2007), выше).

- 5 Мышей VELOCDV1ICE® (мыши поколения F0, полностью происходящие из донорской ЭС-клетки), независимо несущих химерный ген CD4, выявляли путем генотипирования с помощью анализа на модификацию аллеля (Valenzuela et al., выше), в котором обнаруживают присутствие уникальных последовательностей человеческого гена CD4. Экспрессию гуманизированных белков CD4 на поверхности Т-клеток обнаруживали с 10 использованием антител против человеческого CD4. Мышей, гетерозиготных по гуманизированному белку CD4, описанных в настоящем документе, разводили до достижения гомозиготности.

Пример 3.2. Гуманизация локусов CD8

Гены CD8 α и CD8 β колокализуют в геноме, например, на мышиной хромосоме 6

- 15 они расположены на расстоянии приблизительно 37 т.п.н. друг от друга. В связи с плотным сцеплением выполняют последовательное нацеливание путем сначала внедрения одного гена, например, CD8 β , с последующим внедрением второго гена, например, CD8 α . Конкретные подробные этапы гуманизации описаны в публикации заявки на патент США №20140245466, включенной в настоящий документ путем ссылки.

- 20 Вкратце, мышный локус CD8 β гуманизировали за один этап путем конструирования уникального нацеливающего вектора из ДНК мышной бактериальной искусственной хромосомы по технологии VELOCIGENE®. ДНК из BAC RP23-431M6 модифицировали путем BHR с получением большого нацеливающего вектора (LTVEC) (MAID 1737), содержащего замещение мышных экзонов 2-3, кодирующих эктодомен CD8 (от участка 25 соединения 5' в инtronе 1 до участка соединения 3' в инtronе 3), гомологичными человеческими последовательностями (ФИГ. 5В). Кассету loxp-Ub-Hyg вставляли на участке соединения 3' в инtronе 3. Нуклеотидные последовательности в различных участках соединения полученного вектора перечислены в таблице 8 и представлены в перечне последовательностей. Полная аминокислотная последовательность 30 гуманизированного белка CD8 β представлена в SEQ ID NO: 83; причем человеческие последовательности охватывают аминокислоты 15-165 (представлены в SEQ ID NO: 84).

Таблица 8. Соединительные последовательности нацеливающего вектора, содержащего химерный CD8 β

35

Соединение	Последовательность	SEQ ID NO
40 Мышьяя/человеческая в инtronе 1	TGTTTGCCTGTGACATGAACTCATTGTGACACAAA CCACTGTGCTAGGGGGGATCCACTAGTAACGGC CGCCAGTGTGCTGGAATTGCC (TCGCAAGGG CCAGGCATATAAGTACACAATAACAAATGGCAG CTCTCTCC)	45 80

5 Человеческая/5'-конец сайта lox в инtronе 3	(CCCCTCCTTCCCTCCCCAGGCACTTCCAAGTGTC AACTCTAGAGCCTAT) CGCGGCCGCACCGGTATA ACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTAT	81
10 3'-конец сайта lox/мышиная в инtronе 3	ATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTATGTCG ACGTAGCCTATTCTAGATCCAAAATGATGACA ACAAAAGGTACCTTGTG	82

Человеческие последовательности приведены в скобках, сайты lox указаны курсивом, а сайты рестриктаз, сайты множественного клонирования и полученные из вектора последовательности указаны жирным шрифтом.

Нацеливающий вектор электропорировали в мышиные ЭС-клетки F1H4. Нацеленные ЭС-клетки, несущие гуманизированный локус CD8 β , выявляли путем генотипирования с использованием анализа на модификацию аллеля (Valenzuela et al.), который обнаруживал присутствие человеческого гена CD8 β .

Мышиный локус CD8 α гуманизировали за один этап путем конструирования уникального нацеливающего вектора из ДНК мышой бактериальной искусственной хромосомы по технологии VELOCIGENE®. ДНК из BAC RP23-431M6 модифицировали путем BHR с получением большого нацеливающего вектора (LTVEC) (MAID 1738), содержащего замещение мышиных экзонов 1-2, кодирующих эктодомен CD8 α (от участка соединения 5' в кодоне 27 Ala в мышном экзоне 1 до участка соединения 3' в мышном инtronе 2), гомологичными человеческими последовательностями (от участка соединения 5' в человеческом экзоне 2 до участка соединения 3' в инtronе 3 (Фиг. 5A)).

Это обеспечивает сохранение мышьей лидерной последовательности в начале экзона 1. Кассету lox2372-Ub-Neo вставляли на участке соединения 3' человеческой/мышиной последовательностей. Нуклеотидные последовательности в различных участках соединения полученного вектора перечислены в таблице 9 и представлены в перечне последовательностей. Полные аминокислотные последовательности гуманизированного полипептида CD8 α представлены SEQ ID NO: 88, причем человеческая последовательность охватывает аминокислоты 28-179 (представлены в SEQ ID NO: 89).

Таблица 9. Соединительные последовательности нацеливающего вектора, содержащего химерный CD8 α

35 Соединение	Последовательность	SEQ ID NO

	Мышиная/человеческая в экзоне 1 (мышиная) и экзоне 2 (человеческая)	TGAACCTGCTGCTGGGTGAGTCGATTATCCTGGG GAGTGGAGAAGCT(AGGCCGAGCCAGTTCCGGGTGTC GCCGCTGGATCGGACCTGGAACCTGGG)	85
5	Человеческая/5'-конец сайта lox 2372	(ATGCCAGGGACAGCCCTGATACTGTAGGTAGAGTCA AGGGCTGTCCAAGT) ACCGGTATAACTTCGTATAAGGT ATCCTATACGAAGTTAT	86
10	3'-конец сайта lox 2372/мышиная	ATAACTTCGTATAAGGTATCCTATACGAAGTTATCTCGAC CTGATCTTGGAGGGAGACCTGGACCAGGGAGACGTGC TGGGGGCAGGGTT	87
15			

Человеческие последовательности приведены в скобках, сайты lox указаны курсивом, а сайты рестриктаз, сайты множественного клонирования и полученные из вектора последовательности указаны жирным шрифтом.

Нацеливающий вектор, содержащий гуманизированный CD8 α , описанный выше,

20 электропорировали в мышиные ЭС-клетки, которые содержали гуманизированный локус CD8b, для получения модифицированных ЭС-клеток, которые содержат гуманизированные локусы CD8b и CD8a (Фиг. 5В). Нацеленные ЭС-клетки, несущие гуманизированные локусы CD8a и CD8b, выявляли путем генотипирования с использованием анализа на модификацию аллеля (Valenzuela et al.).

25 Нацеленные ЭС-клетки, описанные выше, использовали в качестве донорских ЭС-клеток и внедряли в мышний эмбрион на стадии 8 клеток по способу VELOCIMOUSE® (см., например, патент США №7,294,754 и публикацию Poueymirou et al., выше). Мышей VELOCIMICE® (мыши поколения F0, полностью происходящие из донорской ЭС-клетки), независимо несущих химерный ген CD8b и химерный ген CD8a, выявляли путем генотипирования с помощью анализа на модификацию аллеля (Valenzuela et al., выше), в котором обнаруживают присутствие уникальных последовательностей человеческих генов CD8b и CD8a.

30 Кассеты селекции в локусах CD8 α и CD8 β можно удалить способами, известными специалистам в данной области. Мышей, гетерозиготных по гуманизированным локусам CD8 α и CD8 β , как описано в настоящем документе, разводили до достижения гомозиготности. Экспрессию гуманизированных белков CD8 α и CD8 β на поверхности Т-клеток обнаруживали с использованием антител против человеческого CD8.

35 Пример 4. Создание мышей, содержащих гуманизированные компоненты клеточной иммунной системы Для создания мышей, содержащих гуманизированные компоненты клеточной иммунной системы, мыши, гомозиготные по гуманизации различных компонентов, например МНС I, МНС II α и β , TCR α и β , CD4, CD8 α и β , а также Р2М, могут быть скрещены между собой в любой комбинации с получением мышей, у которых различные компоненты Т-клеточного иммунного ответа являются гуманизированными. Например, мышь, содержащая гуманизированный МНС I, может быть скрещена с мышью, содержащей гуманизированный Р2М, для получения мыши, экспрессирующей гуманизированный МНС I/Р2М. Мышей, гомозиготных по гуманизации различных компонентов, например МНС I, МНС II α и β , TCR α и β , CD4, CD8 α и β , а также Р2М, скрещивают друг с другом способами, известными в данной области, для получения

мыши, содержащей все девять гуманизации (мыши «ТМ I/II В С4/8»). Мышей разводят до достижения гомозиготности способами, известными в данной области. Альтернативно нацеливающие векторы, содержащие каждый гуманизированный ген, могут быть внедрены посредством последовательного нацеливания в ту же ЭС-клетку для получения ЭС-клетки, содержащей все девять гуманизации, и полученную ЭС-клетку внедряют в мышний эмбрион на стадии 8 клеток по способу VELOCBVIOUS®, описанному в примерах 1-3 выше.

Пример 5. Определение характеристик мышей, содержащих гуманизированные компоненты клеточной иммунной системы

10 Определяли характеристики мышей, гомозиготных по гуманизированным МНС I, МНС II α и β , TCR α и β , CD4, CD8 α и β и по гуманизированному Р2М. В частности, собирали селезенку и тимусы мышей и получали суспензии одиночных клеток. Суспензии центрифугировали при 1200 об./мин в течение 5 мин при 4°C для осаждения клеток, и клетки из каждой ткани лизировали 4 мл лизирующего буферного раствора ACK (GIBCO) 15 для лизирования эритроцитов. Клетки фильтровали через клеточный фильтр, центрифугировали до осаждения, ресуспендировали в среде и подсчитывали.

Экспрессию на клеточной поверхности CD19, CD3, CD4 и CD8 α , показанную на ФИГ. 6А-С и ФИГ. 9А-С, анализировали с помощью цитометрии посредством сортировки клеток с активацией флуоресценции (FACS) с использованием антител, конъюгированных 20 с флуорохромом: против мышного CD3 (17A2, BD), против мышного CD19 (1D3, BD), против мышного F4/80 (BM8, Biolegend), против мышного CD8 α (53-6.7, BD), против мышного CD4 (RM4-5, eBioscience), против человеческого CD8 α (SK1, BD) и против человеческого CD4 (RPA-T4, BD). Экспрессию на клеточной поверхности мышного H2Db, человеческих молекул HLA (HLA-A2, B2m и HLA-DR) и мышиных 25 молекул МНС I A^IE , показанных на ФИГ. 7А-Ф и 10А-Ф, анализировали с помощью FACS с использованием антител, конъюгированных с флуорохромом: против мышного CD 19 (6D5, Biolegend), против мышного F4/80 (BM8, Biolegend), против мышного H2Db (KH95, Biolegend), против человеческого HLA-A2 (BB7.2, BD), против человеческого HLA-DR (G46-6, BD), против человеческого B2-микроглобулина (2M2, 30 Biolegend) и против мышного I A^IE (M5/114.15.2, eBioscience). Экспрессию на клеточной поверхности мышного и человеческого CD4 и CD8, изображенных на ФИГ. 7Г и ФИГ. 10Г, анализировали с помощью FACS с использованием антител, конъюгированных с флуорохромом: против мышного CD3 (17A2, Biolegend), против мышного CD4 (GK1.5, 35 eBiosciences), против мышного CD8 α (53-6.7, BD 2), против мышного CD80 (H35-17.2, eBioscience), против человеческого CD4 (OKT4, eBioscience), против человеческого CD8 α (RPA-T8, BD 6), против человеческого CD8 β (2ST8.5H7, BD). Экспрессию на клеточной поверхности FoxP3 и CD25, показанных на ФИГ. 8 или ФИГ. 11, анализировали с помощью FACS с использованием антител против FoxP3 (FJK-16s, eBioscience) и против 40 CD25 (PC61, Biolegend). Экспрессию на клеточной поверхности CD44 и CD62L, показанных на ФИГ. 9Д-9Е, анализировали с использованием антител против CD44 (IM7, BD) и против CD62L (MEL-14, Biolegend).

Всю проточную цитометрию выполняли с использованием BD Fortessa. Данные анализировали с использованием FlowJo.

45 Экспрессия в тимусе показана на ФИГ. 6А-С, 7А-Г и 8. Абсолютные количества тимоцитов и клеток CD3+ и общее развитие Т-клеток тимуса были сопоставимы у контрольных мышей и гуманизированных мышей ТМ I/II В С4/8 (данные не показаны). На ФИГ. 6А показано, что пропорция В-клеток и Т-клеток в тимусах мышей, имеющих гуманизированную клеточную иммунную систему (ТМ I/II В С4/8), аналогична

пропорции, обнаруженной у контрольных мышей. Частота появления и количество клеток F4/80 в тимусах мышей ТМ I/II В С4/8 были сопоставимы с таковыми у контрольных мышей (ФИГ. 6В, данные не показаны). Кроме того, гуманизированные CD4 и CD8 экспрессируются на клетках тимуса мыши, гуманизированной по всем девятым генам клеточного иммунитета (ТМ I/II В С4/8), аналогично экспрессии мышиных CD4 и CD8 у негуманизированных контрольных мышей (ФИГ. 6С). Гуманизированный β2M экспрессируется на поверхности В-клеток и макрофагов у гуманизированных мышей ТМ I/II В С4/8, тогда как в В-клетках и макрофагах контрольных мышей его экспрессия отсутствует (ФИГ. 7А и 7В). Аналогичным образом, гуманизированные МНС I и II присутствуют на поверхности как В-клеток, так и макрофагов гуманизированных мышей ТМ I/II В С4/8 (ФИГ. 7С и 7Д), а мышиные молекулы МНС класса I и II не были обнаружены (ФИГ. 7Е и 7F). Гуманизированные CD4, CD8 α и CD8 β экспрессируются на поверхности клеток тимуса CD3+, полученных из гуманизированных мышей ТМ I/II В С4/8, но отсутствуют в клетках тимуса CD3+ контрольных мышей (ФИГ. 7G).

Гуманизированные мыши ТМ I/II В CD4/8 экспрессируют Т-клетки (Treg) (ФИГ. 8), NK-клетки (CD335 $^{+}$ CD3 $^{-}$) и моноциты (CD11b $^{+}$) (данные не показаны).

Экспрессия в селезенке показана на ФИГ. 9А-Д и 10А-10G. Селезенки мышей, гуманизированные по компонентам клеточной иммунной системы (ТМ I/II В CD4/8), содержали сопоставимые абсолютные количества клеток CD3+ и практически нормальную пропорцию В- и Т-клеток (ФИГ. 9А и данные не показаны). Частота появления и количество клеток F4/80 в селезенках мышей ТМ I/II В С4/8 были сопоставимы с таковыми у контрольных мышей (ФИГ. 9В и данные не показаны). Мыши, гуманизированные по компонентам клеточной иммунной системы (ТМ I/II В CD4/8), экспрессировали гуманизированные CD4 и CD8 α на клетках CD3+ селезенки (ФИГ. 9С). Гуманизированные мыши ТМ I/II В CD4/8 содержали эффекторные Т-клетки памяти CD4 $^{+}$ и CD8 $^{+}$ (CD44 $^{+}$ CD62L $^{-}$) и центральные Т-клетки памяти CD8 $^{+}$ (CD44 $^{+}$ CD62L $^{+}$) (ФИГ. 9D и 9E).

Как показано на ФИГ. 10А и 10В, гуманизированный β2M экспрессируется на поверхности В-клеток и макрофагов в селезенке гуманизированных мышей ТМ I/II В С4/В, тогда как на В-клетках и макрофагах в селезенке контрольных мышей его экспрессия и экспрессия мышиных молекул МНС отсутствует. Аналогичным образом, гуманизированные МНС I и II присутствуют на поверхности как В-клеток, так и макрофагов в селезенке гуманизированных мышей ТМ I/II В С4/В (ФИГ. 10С и 10D), тогда как мышиные молекулы МНС класса I и II не были обнаружены (ФИГ. 10Е и 10F). Гуманизированные CD4, CD8 α и CD8 β экспрессируются на поверхности клеток селезенки CD3+, полученных из гуманизированных мышей ТМ I/II В С4/8, но отсутствуют в клетках селезенки CD3+ контрольных мышей (ФИГ. 10G). Мыши ТМ I/II В С4/8 имеют практически нормальную экспрессию регуляторных Т-клеток селезенки по сравнению с контрольными мышами (ФИГ. 11) и экспрессируют селезеночные NK-клетки (CD335 $^{+}$ CD3 $^{-}$) и моноциты (CD11b $^{+}$).

Пример 6. Оценка представления и активации Т-клеток человеческим пептидом

Для определения того, формируют ли мыши, содержащие гуманизированные компоненты клеточной иммунной системы, гуманизированные Т-клеточные иммунные ответы, протестировали способность спленоцитов от мышей, гуманизированных по компонентам клеточной иммунной системы (ТМ I/II В CD4/8), представлять MAGE-A3, пептид, представляемый исключительно человеческим HLA-A2, и реагировать на него.

MAGE-A3, пептид, представляемый исключительно человеческим HLA-A2,

синтезируют (Celtek Biosciences), разводят в фосфатно-солевом буфере (PBS) и смешивают в равных объемах с полным адьювантом Фрейнда (CFA; Chondrex, Inc.) таким образом, что 200 мкг MAGE-A3 содержится в 200 мкл эмульсии. 50 мкл эмульсии вводят в 4 зоны на каждом животном. Две зоны находятся в заднем паху и 2 зоны

находятся рядом с каждым плечом мышей, гомозиготных по гуманизированным МНС I, МНС II α и β , TCR α и β , CD4, CD8 α и β , а также β 2M (TM I/II В CD4/8), или контрольных мышей, которые экспрессируют эндогенные МНС I, МНС II α и β , TCR α и β , CD4, CD8 α и β , а также β 2M.

Получают и разделяют суспензии селезенок от иммунизированных мышей.

Эритроциты лизируют в лизирующем буферном растворе ACK (Life Technologies), а спленоциты суспендируют в полной среде RPMI. 2×10^5 выделенных спленоцитов при отсутствии или в присутствии 10 мкг/мл или 1 мкг/мл разведенного пептида MAGE-A3 тестируют в каждой лунке планшетов PVDF (Millipore), покрытых 5 мкг/мл мышного захватного антитела ИФН- γ (BD Biosciences) в анализе ELISPOT. После 16-20 часов инкубации с пептидом планшеты промывали и инкубировали с биотинилированным детекторным антителом (BD Biosciences), промывали, обрабатывали конъюгатом стрептавидин-пероксидаза хрена (HRP) (MabTech), промывали, проявляли субстратом TMB (Mabtech) и подсчитывали с помощью считывателя AID Elispot.

Несмотря на то что для одного генотипа показана только одна мышь, исследовали несколько мышей каждого генотипа, и все образцы анализировали в трех повторностях с указанием стандартного отклонения в виде планок погрешности. Как показано на ФИГ. 12, только образцы от мышей, гомозиготных по каждому из гуманизированных МНС I, МНС II α и β , TCR α и β , CD4, CD8 α и β , а также β 2M (TM I/II В CD4/8), реагировали секрецией ИФН- γ на обработку HLA-A2-специфичным пептидом MAGE-A3, что указывает на активацию Т-клеток от этих мышей после представления MAGE-A3 гуманизированным HLA-A2.

Пример 7. Оценка Т-клеточной функции с использованием модели инфекции LCMV

Чтобы определить, могут ли мыши, содержащие гуманизированные компоненты клеточной иммунной системы, формировать нормальный ответ на инфекцию, исследовали способность гуманизированных мышей уничтожать вирус лимфоцитарного хориоменингита (LCMV). LCMV представляет собой вирус, действующий на мышей, причем развитие инфекции зависит от вирусного штамма. Воздействие штамма Армстронга приводит к острой инфекции, при которой мыши быстро формируют Т-клеточный ответ на вирус и уничтожают инфекцию приблизительно в течение недели. С другой стороны, вирус Clone 13 не может быть уничтожен, Т-клетки становятся «истощенными» (экспрессируя маркеры, ассоциированные с Т-клеточным истощением, например, PD1, Lag3, Tim3) и развивается хроническая инфекция. Показано, что инфицирование мышей, истощенных по CD8 или дефицитных по МНС класса I, штаммом Армстронга приводит к сохранению высоких титров вируса (J. Virol. 68:8056-63 (1994)). Поскольку вирусная инфекция зависит от активности Т-клеток, LCMV представляет собой идеальную модель для исследования Т-клеточной функции.

Для определения того, обладают ли мыши, содержащие гуманизированные компоненты клеточной иммунной системы, например МНС I, МНС II α и β , TCR α и β , CD4, CD8 α и β , а также β 2M, нормальной Т-клеточной функцией, контрольных и гуманизированных (TM I/II В C4/8) мышей инфицировали 2×10^5 БОЕ вируса штамма Армстронга интраперитонеально (и/п) в день 0. В дни 3, 6, 9 и 12 собирали органы и измеряли титры вируса. Как показано на ФИГ. 13А, как контрольные, так и гуманизированные мыши обладали способностью к уничтожению инфекции Армстронга.

Как контрольных, так и гуманизированных мышей также инфицировали $4,5 \times 10^5$ БОЕ вируса Clone 13 внутривенно (в/в) в день 0, а в день 21 собирали органы и измеряли титры вируса. Как показано на ФИГ. 13В, хроническая инфекция LCMV могла развиваться в обеих линиях мышей. Также измеряли способность гуманизированных мышей экспрессировать маркеры PD1, Lag3 и Tim3 Т-клеточного истощения. Кровь собирали у неинфицированных мышей и инфицированных гуманизированных мышей через 3 недели после инфицирования и метили, используя проточную цитометрию, антителами против PD1, конъюгированными с PE-Cy7 (BIOLEGEND), антителами Lag3, конъюгированными с PerCpCy5.5 (BIOLEGEND), и антителами Tim3, конъюгированными с PE (R&D Systems). Данные на ФИГ. 13С представляют собой результаты количественного определения меченых клеток, положительных в отношении указанных рецепторов. Как гуманизированные (ТМ I/II В С4/8), так и контрольные мыши В6 экспрессировали все три маркера Т-клеточного истощения через 3 недели после инфицирования хроническим штаммом Clone 13 LCMV.

Для оценки появления Т-клеток памяти у мышей, гуманизированных по компонентам клеточной иммунной системы, 5 контрольных и 4 гуманизированных мыши инфицировали 2×10^5 БОЕ штамма Армстронга, а в день 17 суперинфицировали $4,5 \times 10^5$ БОЕ штамма Clone 13 (по 2 каждого из гуманизированных и контрольных мышей должно инфицировали в качестве дополнительного контроля). В день 31 после первичного инфицирования собирали органы и анализировали титры вируса. Как показано на ФИГ. 14, у 5/5 контрольных мышей и 3/4 гуманизированных мышей, которые перенесли острую инфекцию LCMV, впоследствии не развивалась хроническая инфекция, что указывает на появление у этих животных интактных Т-клеток памяти.

Для анализа природы клеточных ответов контрольных и гуманизированных мышей инфицировали в день 0 2×10^5 БОЕ вируса штамма Армстронга. В день 10 (ФИГ. 15А-В) или в указанные временные отметки после инфицирования (ФИГ. 15С-Д) специфичность клеточного ответа анализировали с использованием трех рестриктированных по HLA-A2 пептидов, которые, как известно, активируют человеческие Т-клетки CD8+ (GPC10-18, N69-77 или Z49-58), см. публикацию Botten et al. (2007) J. Virol. 81:2307-17, или gp33, представляющий собой иммунодоминантный пептид LCMV, распознаваемый мышами на основе H-2D^b. В частности, Т-клетки CD8+ выделяли из собранных селезенок и активировали пептидами. Клетки CD8+, производящие интерферон- γ (ИФН γ), измеряли посредством ELISpot (ФИГ. 15А-В) или посредством мечения для определения внутриклеточного ИФН γ (ФИГ. 15С-Д).

Т-клетки CD8+, выделенные из контрольных животных, специфически активируются пептидом gp33 (ФИГ. 15А), а Т-клетки CD8+, выделенные из гуманизированных животных, активируются рестриктированными по HLA-A2 пептидами (ФИГ. 15В). Временная динамика активации Т-клеток CD8+, отслеживаемая по их способности экспрессировать ИФН γ после стимуляции пептидами, показывает, что как у контрольных, так и у гуманизированных мышей Т-клетки CD8+ растут в течение первых двух недель после инфицирования и перестают обнаруживаться после уничтожения вируса (ФИГ. 15С-Д). Хотя реакция пептида gp33 оказалась сильнее у контрольных животных, следует отметить, что gp33 является известным иммунодоминантным эпипотопом LCMV, тогда как иммунодоминантный рестриктированный по HLA-A2 эпипотоп LCMV не выявлен. В заключение: животные, содержащие гуманизированную или по существу гуманизированную Т-клеточную иммунную систему, способны обрабатывать экспрессируемый LCMV белок, представляя его на гуманизированных молекулах МНС

и активируя Т-клетки посредством гуманизированного Т-клеточного рецептора.

Эквиваленты

Специалисты в данной области смогут определить или с помощью лишь стандартных экспериментов смогут установить множество эквивалентов конкретных вариантов 5 осуществления изобретения, описанных в настоящем документе. Подразумевается, что такие эквиваленты охвачены следующей формулой изобретения.

Все содержание всех непатентных документов, патентных заявок и патентов, упоминаемых в настоящей заявке, полностью включено в настоящий документ путем ссылки.

10 ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> Regeneron Pharmaceuticals, Inc.

<120> ОПОСРЕДОВАННЫЕ ГУМАНИЗИРОВАННЫМИ Т-КЛЕТКАМИ ИММУННЫЕ ОТВЕТЫ У НЕ ОТНОСЯЩИХСЯ

<130> 10145W001

<150> 62/143,687

15 <151> 2015-04-06

<150> 62/158,804

<151> 2015-05-08

<150> 62/186,935

20 <151> 2015-06-30

<160> 91

<170> PatentIn, версия 3.5

<210> 1

<211> 19

<212> ДНК

25 <213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетический

<400> 1

cagaacgcca ggctgttaac

19

30 <210> 2

<211> 20

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

35 <223> синтетический

<400> 2

ggagagcagg gtcagtcaac

20

<210> 3

<211> 24

40 <212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетический

<400> 3

45 caccgcact cacagctccct taca

24

<210> 4

<211> 22

<212> ДНК

	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> синтетический	
	<400> 4	
5	gtgggcacca tcttcatcat tc	22
	<210> 5	
	<211> 22	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
10	<220>	
	<223> синтетический	
	<400> 5	
	cttccttcc agggtgtgac tc	22
	<210> 6	
15	<211> 23	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> синтетический	
20	<400> 6	
	aggcctgcga tcaggtggca cct	23
	<210> 7	
	<211> 19	
	<212> ДНК	
25	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> синтетический	
	<400> 7	
	ggtggagagg ctattcggc	19
30	<210> 8	
	<211> 17	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
35	<223> синтетический	
	<400> 8	
	gaacacggcg gcatcag	17
	<210> 9	
	<211> 23	
40	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> синтетический	
	<400> 9	
45	tgggcacaaac agacaatcgg ctg	23
	<210> 10	
	<211> 140	
	<212> ДНК	

<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	синтетический	
<400>	10	
<i>5</i>	tttgtaaaca aagtctaccc agagacagat gacagacttc agctccaatg ctgattggtt cctcaacttgg gaccaaccct accggataaa cttcgatataa ggtatcctat acgaaggat atgcatggcc tccgcgccgg	60 120 140
	<210> 11	
	<211> 140	
<i>10</i>	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> синтетический	
	<400> 11	
<i>15</i>	cgacacctgcag ccggcgcgcc ataacttcgt ataaggatc cttatcgaag ttatctcgag cacaggcatt tgggtgggca gggatggacg gtgactggga caatcggat ggaagagcat agaatgggag ttagggaga	60 120 140
	<210> 12	
	<211> 17	
<i>20</i>	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> синтетический	
	<400> 12	
<i>25</i>	cgaggagccc cggtaca	17
	<210> 13	
	<211> 20	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
<i>30</i>	<220>	
	<223> синтетический	
	<400> 13	
	aagcgcacsga actccttgg	20
	<210> 14	
<i>35</i>	<211> 17	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> синтетический	
<i>40</i>	<400> 14	
	ctctgtcggc tatgtgg	17
	<210> 15	
	<211> 22	
	<212> ДНК	
<i>45</i>	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> синтетический	
	<400> 15	

	ggactcccaag aatctcctga ga	22
	<210> 16	
	<211> 25	
	<212> ДНК	
5	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> синтетический	
	<400> 16	
	gagtcatgaa ccatcaactgt gaaga	25
10	<210> 17	
	<211> 16	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
15	<223> синтетический	
	<400> 17	
	tggtgggttg ctggaa	16
	<210> 18	
	<211> 90	
20	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> синтетический	
	<400> 18	
25	ctgtttcttc cctaactccc attctatgct cttccatccc gaccgcggcc caatctctct	60
	ccactacttc ctgcctacat gtatgttaggt	90
	<210> 19	
	<211> 80	
	<212> ДНК	
30	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> синтетический	
	<400> 19	
	caagggtttcc tccttatgatg cttgtgtgaa actcgcccccc ggccagcatt taacagtaca	60
35	gggatgggag cacagctcac	80
	<210> 20	
	<211> 80	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
40	<220>	
	<223> синтетический	
	<400> 20	
	gaaagcagtc ttcccagcct tcacactcag aggtacaaat ccccatttc atattagcga	60
	tttaattta ttcttagcctc	80
45	<210> 21	
	<211> 80	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	

<220>		
<223> синтетический		
<400> 21		
tcttcctaa ctcccattct atgctttcc atccccaccg cggcccaatc tctctccact	60	
<i>5</i> acttcctgcc tacatgtatg	80	
<210> 22		
<211> 100		
<212> ДНК		
<213> Искусственная последовательность		
<i>10</i> <220>		
<223> синтетический		
<400> 22		
gagttcctcc atcacttcac tggtagcac agctgtaact gtccagcctg tcctggctg	60	
caggtggtgg gcgttgcggg tggggccggtaaaggttcca	100	
<i>15</i> <210> 23		
<211> 100		
<212> ДНК		
<213> Искусственная последовательность		
<220>		
<i>20</i> <223> синтетический		
<400> 23		
tcccacatcc tatttaatt tgctccatgt tctcatctcc atcagcacag ctgcagataa	60	
cttcgtataa tgtatgctat acgaagttat atgcattggcc	100	
<210> 24		
<i>25</i> <211> 100		
<212> ДНК		
<213> Искусственная последовательность		
<220>		
<223> синтетический		
<i>30</i> <400> 24		
atacgaagtt atgcttagtaa ctataacggc cctaaggtag cgagtggctt acaggttaggt	60	
gcgtgaagct tctacaagca cagttccccctggaaagca	100	
<210> 25		
<211> 17		
<i>35</i> <212> ДНК		
<213> Искусственная последовательность		
<220>		
<223> синтетический		
<400> 25		
<i>40</i> tgcggccgat cttagcc	17	
<210> 26		
<211> 18		
<212> ДНК		
<213> Искусственная последовательность		
<i>45</i> <220>		
<223> синтетический		
<400> 26		
ttgaccgatt ctttgcgg	18	

	<210>	27	
	<211>	21	
	<212>	ДНК	
	<213>	Искусственная последовательность	
5	<220>		
	<223>	синтетический	
	<400>	27	
	acgagcgggt tcggccatt c		21
	<210>	28	
10	<211>	18	
	<212>	ДНК	
	<213>	Искусственная последовательность	
	<220>		
	<223>	синтетический	
15	<400>	28	
	ccccacacsa cgtttcct		18
	<210>	29	
	<211>	23	
	<212>	ДНК	
20	<213>	Искусственная последовательность	
	<220>		
	<223>	синтетический	
	<400>	29	
	cgtcccatcg aagaaatgac act		23
25	<210>	30	
	<211>	15	
	<212>	ДНК	
	<213>	Искусственная последовательность	
	<220>		
30	<223>	синтетический	
	<400>	30	
	tggcagccta agagg		15
	<210>	31	
	<211>	18	
35	<212>	ДНК	
	<213>	Искусственная последовательность	
	<220>		
	<223>	синтетический	
	<400>	31	
40	ccccacacsa cgtttcct		18
	<210>	32	
	<211>	17	
	<212>	ДНК	
	<213>	Искусственная последовательность	
45	<220>		
	<223>	синтетический	
	<400>	32	
	accgcgtccg tcccat		17

	<210>	33	
	<211>	18	
	<212>	ДНК	
	<213>	Искусственная последовательность	
5	<220>		
	<223>	синтетический	
	<400>	33	
	agcctaagaa	ggagtgtc	18
	<210>	34	
10	<211>	20	
	<212>	ДНК	
	<213>	Искусственная последовательность	
	<220>		
	<223>	синтетический	
15	<400>	34	
	agaccctgg	gatgctggaa	20
	<210>	35	
	<211>	18	
	<212>	ДНК	
20	<213>	Искусственная последовательность	
	<220>		
	<223>	синтетический	
	<400>	35	
	cgttgggt	ctccactt	18
25	<210>	36	
	<211>	18	
	<212>	ДНК	
	<213>	Искусственная последовательность	
	<220>		
30	<223>	синтетический	
	<400>	36	
	tgcgttgt	gaggttta	18
	<210>	37	
	<211>	21	
35	<212>	ДНК	
	<213>	Искусственная последовательность	
	<220>		
	<223>	синтетический	
	<400>	37	
40	tggatggag	tgaggcgtt t	21
	<210>	38	
	<211>	20	
	<212>	ДНК	
	<213>	Искусственная последовательность	
45	<220>		
	<223>	синтетический	
	<400>	38	
	gcacggccc	cttcttagtg	20

	<210>	39	
	<211>	18	
	<212>	ДНК	
	<213>	Искусственная последовательность	
5	<220>		
	<223>	синтетический	
	<400>	39	
	tgacttccta aatttctc		18
	<210>	40	
10	<211>	21	
	<212>	ДНК	
	<213>	Искусственная последовательность	
	<220>		
	<223>	синтетический	
15	<400>	40	
	ctggcggtt gaagaatttg g		21
	<210>	41	
	<211>	24	
	<212>	ДНК	
20	<213>	Искусственная последовательность	
	<220>		
	<223>	синтетический	
	<400>	41	
	catgattcc aggttggctt tgtc		24
25	<210>	42	
	<211>	26	
	<212>	ДНК	
	<213>	Искусственная последовательность	
	<220>		
30	<223>	синтетический	
	<400>	42	
	cgatttgcca gctttgaggc tcaagg		26
	<210>	43	
	<211>	21	
35	<212>	ДНК	
	<213>	Искусственная последовательность	
	<220>		
	<223>	синтетический	
	<400>	43	
40	cctcacttgg gaccaaccct a		21
	<210>	44	
	<211>	20	
	<212>	ДНК	
	<213>	Искусственная последовательность	
45	<220>		
	<223>	синтетический	
	<400>	44	
	ttgtcccaagt caccgtccat		20

	<210>	45	
	<211>	24	
	<212>	ДНК	
	<213>	Искусственная последовательность	
5	<220>		
	<223>	синтетический	
	<400>	45	
	tgcatctcga	gcacaggcat	ttgg
			24
	<210>	46	
10	<211>	100	
	<212>	ДНК	
	<213>	Искусственная последовательность	
	<220>		
	<223>	синтетический	
15	<400>	46	
	atggagtagt	cagaacacac	tcttcagaag
	ggactcctga	tttcaaaggg	ggtaccggc
	ccccccctcga	ggtcgacata	acttcgtata
		gcatacatta	100
	<210>	47	
	<211>	108	
20	<212>	ДНК	
	<213>	Искусственная последовательность	
	<220>		
	<223>	синтетический	
	<400>	47	
25	ggccatgcat	ataacttcgt	atagcataca
	ttatacgaag	ttataccggt	gcgatcgcc
	gcttcctct	tctaaccact	aattaaaaaa
	ggattgtaag	taatgttt	
	<210>	48	60
	<211>	145	
	<212>	ДНК	
30	<213>	Искусственная последовательность	
	<220>		
	<223>	синтетический	
	<400>	48	
	agacagaccc	ctaaacacct	ccaaattaaa
	agcggcaaag	agataagggtt	ggagctccac
35	cgcggcggcg	gccgccaccg	cggtgagct
	cgggtttcc	cgaggtttcc	ggtacttaac
	agatttagtg	gtgagggact	aacagagcac
	ctctc		145
	<210>	49	
	<211>	100	
	<212>	ДНК	
40	<213>	Искусственная последовательность	
	<220>		
	<223>	синтетический	
	<400>	49	
	atggagtagt	cagaacacac	tcttcagaag
	ggactcctga	tttcaaaggg	ggtaccggc
45	ccccccctcga	ggtcgacata	acttcgtata
	gcatacatta		100
	<210>	50	
	<211>	109	
	<212>	ДНК	

<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	синтетический	
<400>	50	
5	ggccatgcat ataacttcgt atagcataca ttatacgaag ttataccggc gcgatcgctc	60
	aagcatgcaa gggtaacata tgttatgaga ttatatttc tttatctca	109
	<210> 51	
	<211> 100	
	<212> ДНК	
10	<213> Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	синтетический	
<400>	51	
	atggagtagt cagaacacac tcttcagaag ggactcctga tttcaaaggg gggtaccggg	60
15	ccccccctcg agaagttcct attccgaagt tcctatttc	100
	<210> 52	
	<211> 108	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
20	<220>	
<223>	синтетический	
<400>	52	
	gttcctattc cgaagttcct attctctaga aagtatacgg acttcctagg gcgatcgctc	60
	ctctccaggc tcgaatttagt attacagttg aggcacgttg tcctcccg	108
25	<210> 53	
<211>	100	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
30	<223> синтетический	
<400>	53	
	atggagtagt cagaacacac tcttcagaag ggactcctga tttcaaaggg ggtaccgggc	60
	ccccccctcg ggtcgacata acttcgtata gcatacatta	100
	<210> 54	
35	<211> 108	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	синтетический	
40	<400> 54	
	ggccatgcat ataacttcgt atagcataca ttatacgaag ttataccggc gcgatcgccg	60
	cctccatttc ctcatagga aacatgaagt gaatggggct gtgtgtgt	108
	<210> 55	
	<211> 100	
45	<212> ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	синтетический	

<400>	55		
atggagtagt cagaacacac tcttcagaag ggactcctga tttcaaaggg ggtaccgggc	60		
ccccccctcga ggtcgacata acttcgtata gcatacatta	100		
<210>	56		
<i>5</i>	<211> 108		
<212> ДНК			
<213> Искусственная последовательность			
<220>			
<223> синтетический			
<i>10</i>	<400> 56		
ggccatgcat ataacttcgt atagcataca ttatacgaag ttataccgggt gcgatcgctg	60		
ggagcacgtt ccattattat aacaacttac tgaacacaag agggcagt	108		
<210>	57		
<211> 100			
<i>15</i>	<212> ДНК		
<213> Искусственная последовательность			
<220>			
<223> синтетический			
<400> 57			
<i>20</i>	atggagtagt cagaacacac tcttcagaag ggactcctga tttcaaaggg ggtaccgggc	60	
ccccccctcga ggtcgacata acttcgtata gcatacatta	100		
<210>	58		
<211> 108			
<212> ДНК			
<i>25</i>	<213> Искусственная последовательность		
<220>			
<223> синтетический			
<400> 58			
ggccatgcat ataacttcgt atagcataca ttatacgaag ttataccgggt gcgatcgctt	60		
<i>30</i>	taaggtgagg aggaggcaa taccctctt ccaccgcatt ctcaatcc	108	
<210>	59		
<211> 100			
<212> ДНК			
<213> Искусственная последовательность			
<i>35</i>	<220>		
<223> синтетический			
<400> 59			
gggggggtgg ggtggaggag gagggtacag catctcctct ctttcctctc tggtaccgaa	60		
gttcctattt cgaagttcctt attctctaga aagtata>tagga	100		
<i>40</i>	<210> 60		
<211> 108			
<212> ДНК			
<213> Искусственная последовательность			
<220>			
<i>45</i>	<223> синтетический		
<400> 60			
gaagttccta ttctcttagaa agtataggaa cttccttaggg tttcaccgggt gcgatcgctg	60		
gaatatacta aaaaccactt aatttatatat ttgaaaggggt ggtatgtta	108		

<210>	61	
<211>	108	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<i>5</i>	<220>	
	<223>	синтетический
	<400>	61
	ctctctcccta cccagctcct ctcacacsgag cctgaaggcc ctgccaaggt ggccgcgcctt	60
	tcaaattgtt gttgagttca aagtgggcaa cagaaaaggg ggtgtgag	108
<i>10</i>	<210>	62
	<211>	130
	<212>	ДНК
	<213>	Искусственная последовательность
	<220>	
<i>15</i>	<223>	синтетический
	<400>	62
	aataaaatagt aaatttctgt agaattcataa tgaggtcttag accccccgggc tcgataacta	60
	taacggtcct aaggtagcga aatggcgctgt aatcaagccc agctttcat gctgcatttt	120
	tatcttcttt	130
<i>20</i>	<210>	63
	<211>	100
	<212>	ДНК
	<213>	Искусственная последовательность
	<220>	
<i>25</i>	<223>	синтетический
	<400>	63
	ttgactcggg ggtgcctggg tttgactgca atgatcagtt gctgggaagg accggataaa	60
	cttcgtataaa tgtatgctat acgaagttat atgcattggcc	100
	<210>	64
<i>30</i>	<211>	100
	<212>	ДНК
	<213>	Искусственная последовательность
	<220>	
	<223>	синтетический
<i>35</i>	<400>	64
	ccggcgcgcc ataacttcgt ataatgtatg ctatacgaag ttatgtcgac ataaggtaag	60
	acagagtgcgt cccttcccat ctggAACCCCT ctacctttct	100
	<210>	65
	<211>	107
<i>40</i>	<212>	ДНК
	<213>	Искусственная последовательность
	<220>	
	<223>	синтетический
	<400>	65
<i>45</i>	gttgatgaat cataaaagaa gagatattca agaaaaggat ggccacactg cggccgcaga	60
	ggttattcaag gaaaatgcag actttcactg taagagggat gaggggc	107
	<210>	66
	<211>	100

<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	синтетический	
<i>5</i>	<400> 66	
	tccccggagt cggagggtgg accggagctg gaggagctgc cgccgtggcg gccgatgcca	60
	tttcattacc tcttctccg caccggacat agataaagct	100
	<210> 67	
	<211> 100	
<i>10</i>	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> синтетический	
	<400> 67	
<i>15</i>	gggggggtgg ggtggaggag gagggtacag catctcctct ctttcctctc tggtaccgaa	60
	gttcctattc cgaagttcct attctctaga aagtata>tagga	100
	<210> 68	
	<211> 108	
	<212> ДНК	
<i>20</i>	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> синтетический	
	<400> 68	
	gaagttccta ttctctaga aa agtata>tagaa ctcccttaggg tttcaccgggt gcgatcgca	60
<i>25</i>	agcaattaac tgcccctggt ccagttgcct cctctgataa tgcattgt	108
	<210> 69	
	<211> 100	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
<i>30</i>	<220>	
	<223> синтетический	
	<400> 69	
	gggggggtgg ggtggaggag gagggtacag catctcctct ctttcctctc tggtaccgaa	60
	gttcctattc cgaagttcct attctctaga aagtata>tagga	100
<i>35</i>	<210> 70	
	<211> 108	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
<i>40</i>	<223> синтетический	
	<400> 70	
	gaagttccta ttctctaga aa agtata>tagaa ctcccttaggg tttcaccgggt gcgatcgct	60
	tatcttagtag acttaattaa ggatcgatcc ggccgcgcaa tagtcatg	108
	<210> 71	
<i>45</i>	<211> 100	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	

<223>	синтетический	
<400>	71	
	gtttccaga cttcaacttg actatcagcc agaaattcag tggcaaaccc ccaccaggc	60
	cctaagtcaa ggcccctggg gagtatggtt agggctcagg	100
5	<210> 72	
	<211> 100	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
10	<223> синтетический	
	<400> 72	
	caccaccaa agaaagtgcc caggagaagg gcaaggagag agcagagcat agttcaagat	60
	ggtctttgtc taggcttgc tactctgcac ttgtacttcc	100
	<210> 73	
15	<211> 202	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> синтетический	
20	<400> 73	
	agggaaaacc cgcaaaggat gggacatagg gagacagctg ttaacatctg aaacatgacc	60
	ttctttctg tgcagcacaa ctccatgtc tcactcaagg gaagaaagtg gtgctggca	120
	aaaaagggga tacagtggaa ctgacctgta cagcttcca gaagaagagc atacaattcc	180
	actggaaaaa ctccaaccag at	202
25	<210> 74	
	<211> 240	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
30	<223> синтетический	
	<400> 74	
	ctggtcacct ggtatggatg agggaggggcc ctctgggtt gggctgggtt ttgaacttag	60
	acatccatga gccagcctgg ggctggcttc actgaagatc atctatgtcg ggtgcggaga	120
	aagaggtaat gaaatggcac atgctatgtt caaaactctat tgctgagcag caccctgtcc	180
35	ttagctggct ctgaatttggat ggtgaaattc acacattctc ccccaacatc tataatctgg	240
	<210> 75	
	<211> 151	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
40	<220>	
	<223> синтетический	
	<400> 75	
	tatggagtga aagcctttgg tgcgtggat ctggcttttag ttaaactctg ggatcggcgc	60
	gccgaattcc tgcagccccgg gctcgagata acttcgtata atgtatgcta tacgaagttt	120
45	tatgcattcg ggttagggggat gcgctttcc c	151
	<210> 76	
	<211> 151	
	<212> ДНК	

<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	синтетический	
<400>	76	
5	agtattgtt tgccaaagttc taattccatc agacctcgac ctgcagccct agataacttc gtataatgtt tgctatacga agttatccta ggccagaggg cttgggttga cagaaactca gtggcattct tatccagagt ttctctacac с	60 120 151
<210>	77	
<211>	18263	
10	<212> ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	синтетический	
<220>		
15	<221> прочие приложения	
<222>	(2957)..(2957)	
<223>	n = A, T, C или G	
<220>		
<221>	прочие приложения	
20	<222> (3193)..(3193)	
<223>	n = A, T, C или G	
<400>	77	
	aagaaagtgg tgctgggcaa aaaaggggat acagtggAAC tgacctgtac agcttcccag aagaagagca tacaattcca ctggaaaaac tccaccaga taaagattct gggaaatcag	60 120
25	ggctcccttct taactaaagg taggggtgcc tggctccccca tccaggaggaaaacacact atggagtgaa agccttttgt gtctgagatc tggcttttagt taaactctgg gatcggcgcg ccgaattcct gcagcccggg ctcgagataa cttcgtataa tgtatgctat acgaagttat atgcattccgg gttagggagg cgctttccc aaggcagtttgg catggcatgcg cttagcagc cccgctggc acttggcgct acacaagtgg cctctggcct cgacacacatt ccacatccac	180 240 300 360 420
30	cggtaggcgc caaccggctc cgttcttgg tggcccttc ggcacacatt ctactcctcc cctagtcagg aagtcccccc ccgcggcgc gctcgcgtcg tgcaggacgt gacaaatgg atagcacgt ctcactagtc tcgtgcagat ggacagcacc gctgagcaat ggaagcgggt aggccttgg ggcagccggc aatagcagct ttgctccttc gcttctggg ctcagaggct gggaaggggt gggtccgggg gcgggctcag gggcgggctc agggcgggg cgggcggcc	480 540 600 660 720
35	aaggtcctcc ggaggccccgg cattctgcac gcttcaaaag cgacacgtctg ccgcgtctt ctcctcttcc tcattctccgg gccttcgac ctgcagccaa ttgttgacaa ttaatcatcg gcatagtata tcggcatagt ataatacgac aaggtgagga actaaaccat gggatcggcc attgaacaag atggattgca cgcagggtct ccggccgctt gggtggagag gctattcggc tatgactgg cacaacagac aatcggctgc tctgatgccg ccgtgttccg gctgtcagcg	780 840 900 960 1020
40	caggggcgcc cgggttcttt tgtcaagacc gacctgtccg gtgcctgaa tgaactgcag gacgaggcag cgccgcatac gtggctggcc acgacgggcg ttccttcgc agctgtgctc gacgttgtca ctgaagcggg aaggactgg ctgctattgg gcgaagtgcc ggggcaggat ctcctgtcat ctcacccgtc tcctgccag aaagtatcca tcatggctga tgcaatgcgg cggtgcata cgcttgatcc ggctacctgc ccattcgacc accaagcgaa acatcgcatc	1080 1140 1200 1260 1320
45	gagcgagcac gtactcggat ggaagccggt cttgtcgatc aggatgtct ggacgaagag catcaggggc tcgcgccagc cgaactgttc gccaggctca aggcgcgc gccccgacggc gatgatctcg tcgtgaccca tggcgatgcc tgcttgcga atatcatggt ggaaaatggc cgctttctg gattcatcga ctgtggccgg ctgggtgtgg cgaccgcta tcaggacata	1380 1440 1500 1560

	gcgttggcta cccgtgatat tgctgaagag cttggcggcg aatgggctga ccgcttcctc	1620
	gtgcttacg gtatcgccgc tcccgattcg cagcgcacatcg ccttctatcg ccttcttgac	1680
	gagttttctt gaggggatcc gctgttaagtc tgcagaaatt gatgtatctat taaacaataa	1740
	agatgtccac taaaatggaa gtttttcctg tcataactttg ttaagaaggg tgagaacaga	1800
5	gtacctacat tttgaatggg aggattggag ctacgggggt ggggggtgggg tgggattaga	1860
	taaatgcctg ctctttactg aaggctctt actattgcct tatgataatg tttcatagtt	1920
	ggatatcata atttaaacaa gcaaaaccaa attaagggcc agctcattcc tcccactcat	1980
	gatctataga tctatagatc tctcggttgc tcattgttt tctcttgatt cccacttgt	2040
	ggttctaagt actgtggttt ccaaattgtgt cagttcata gcctgaagaa cgagatcagc	2100
10	agcctctgtt ccacatacac ttcatctca gtattgtttt gccaagttct aattccatca	2160
	gacctcgacc tgcagcccta gataacttcg tataatgtat gctatacgaa gttatcttag	2220
	gccagagggc ttgggttgc agaaactcag tggcattctt atccagagtt tctctacacc	2280
	aactgctgggt ggcccaggaa aaggtggat gtgaatttca atatttaat atttaatatt	2340
	catgaactta ttttagttag ttttagaaca atcactatca cttaaaaccc gtgatttctt	2400
15	gagtattgtt gctacagacc tatgtagata atactttgca cagtactca tatgtataat	2460
	cctagcactg tgggaggctg aggccggagg attgcttgc tccaggagtt caagaccagc	2520
	ctgaacaaca tagtgagact ctgtctctat gaaaaaaaaat atatatatat ttttttttgg	2580
	gacaaggtct agttctatca cccaggctcc agtgcagtgg tgtgatctcg gctcaactgca	2640
	atctccacct cccaggctca agtcatcatc ccacctcagc ctcccaagta gctgggacta	2700
20	cagggcatgca ccaccatgcc aggctaattt ttgtatTTT tatagagaca gggtttcacc	2760
	atgttggcca ggctggctc gaactcatga gctcaagtga tccactcacc ttggcctctc	2820
	agagtgctgg aattacaggt gtgtgtcact atgccttagcc aaaaaaaaaatt ttttaatta	2880
	aaaaaaaaaa ggccggctgt agtggctcac acctgtatac cagaactttg ggagtttgag	2940
	gtggcagat caccggnggt caggagttca agaccagtct ggccaacatg gtgaaacccg	3000
25	gtctctacta aaaatacaaa aattagccag gtgtgggggt gcagtcctgt acttccagct	3060
	actcaggagg ctgaggcagg agactcgctt gaacctggga ggcaaaggct gcagtgagct	3120
	gagattgcac cactgcactc cagcctgggt gacagagcaa gacttcatct caaaaaaaaaa	3180
	aaaaaaaaagctg canattttt attattatta tttagttatt tatttatttt tttgagacag	3240
	agtctcggtc tgtcgccag gctggagtgc ggtggcgtga tcttgctca ttgcaacctc	3300
30	cacctcccg gttcaagtga ttctcctgccc tcagcctccc gagtagctgg gactacaggc	3360
	gtatgccacc atgcctggct aattttttgt acttttagta gagacagagt ttcacggct	3420
	tagccaggct ggtcttgatc tcctgaccc tcgtattacc ctccttggcc tcccaaagtg	3480
	ctgggattac aggcgtgagt cactgtcccc ggcccagaat cattttttc tactttttt	3540
	ttttgagggc aaactctcga tctgttcccc aggctggagt gcagtggca tgatcttggc	3600
35	tcactgcaag ctctgcctcc caggttcaag caattctcct gcctcagcct cctgagtagc	3660
	tgggactaca ggcgtgtgcc accatccccg gctaatttgc gtatttttag tagagaccgg	3720
	ttttcatcat attggccagg ctggcttgc actcctgacc tcaagtgatt ctcccacctt	3780
	agcctcccaa agtgctggga ttacaggcat gagctactgc acttggcctt ttctcctgg	3840
	tttaaaacta ttatatgctc attacaaaat atttggtcaa tgaagaaaag aatatgaaag	3900
40	aaaatcaaataat gcatgcatac ttctatact cagagatatac ctctgctaac attttggat	3960
	attttcttcc aatctttttt ttttttttcc tttttgagac agggctctcac tctgctgccc	4020
	aggctggagt acagtggcat gaccacaaca catcacagcc tcaagtgatc ttcccacttc	4080
	agcctccca gtagctggga ctacagggtgc acgccaccat gttcacctaa ttttttactt	4140
	ttttagtggaga tgagacttca ccatgttgct caggctggtc ttgaattcct aggctcaagt	4200
45	gatctcccg ctttggcctc ccaaagtgtct gggattatag gtatgagcca ctgcatgtgg	4260
	cctattttct tccactgttg ttggcgtgg agaatattat atacataatt acgtaaatga	4320
	tatcatactg tatatacctt ttttcctact ctttcctaa gtttatcat aatgagacta	4380
	ccaattatta gactttttt ctttttttgc agacggagtc tcggctgtc accttaggctg	4440

	gagtgcataatg	gcgcgatctc	agctcgctgc	aacctctgcc	tcccagggttc	aagcaattct	4500
	gcctcagcct	cccgagtagc	tgggactaca	gacacgtgcc	accatgccc	gctaactttt	4560
	ttatTTTTT	attagagaca	gggttccacc	atgctagcag	gatggctctca	atctctcgac	4620
5	ttcgtgatca	gcccggttt	gcctccaaa	gtgctggag	tacaggtgt	agccaccgca	4680
	ctcggcctag	actaactatt	taaagtaatc	tggcaatgtt	taacgaatac	aaaactctaa	4740
	aacccttgg	cctaataata	gctattttgg	aaagtctact	tgacagaaat	aaaatttgta	4800
	atattcttt	ttgttgttt	tttgagacag	agtctcattt	ggacgcctag	gctggagtgc	4860
10	agtggcatga	tctcggtcaa	ctgcaacctc	cacccctgg	gttcaagtga	ttctcctgcc	4920
	tcagcctcct	gagcagctgg	gattacaggt	gtgcaccacc	atgtctggct	aatttttgc	4980
	tttttagtag	atggggtttc	accatgttga	ccagggtgg	ctggacttc	taccctcaag	5040
15	tgatctaccc	accttggcct	cccaaagtgc	tgggattaca	ggtgtgagcc	accacgcctg	5100
	accagtgaac	acttaataat	atctatggaa	aggtgttatt	ataagaattt	cttgtggggc	5160
	cgggcgtgg	ggctcacgccc	tgtaatccca	gcactttggg	aggctgtggc	aggcggatca	5220
	cgaggtcagg	agatcaagat	catccggct	aacacggta	aacccgtct	ctactaaaaaa	5280
20	taccaaaaaaa	ttagccaggc	gtgggtggcg	gcacttgtaa	tcccagctat	ccaggaggct	5340
	gagggcaggag	aattgcgtga	acccaggagg	cggaggtcgc	agtgagctga	gaccgtgcc	5400
	ttgcactcca	gcctgagtga	cagagtgaga	ctccatcaca	aaaaataaaat	aaataaataaa	5460
	ataaaatata	aataagtaaa	taaaggtcag	gagtgggtgc	tcacgcctgt	aatcccagca	5520
25	ctttgggagg	ccgaggtgga	cagatcatga	ggtcatgaga	tcaagaccat	cctggctaac	5580
	acagtgaaac	cctgcctcta	ctaaaaatac	aaaaagtcat	ccaggtgtgg	tggcacacac	5640
	ctatagtccc	agctacttgg	gaggctgagg	caggagaatc	acttgaaccc	aggaggcaga	5700
	ggttgcagtg	agctgagatc	gcccactac	actccagcct	aggcgacaga	gcaagactct	5760
30	gtctcaaat	aaataaataaa	ataaataaataa	aaataaataaa	ataaataaaaa	taaaaagcac	5820
	acacacacac	acacacacac	acacacaatg	caaaagaccc	accctactac	aactaacatt	5880
35	atatttaatg	gtgaaaaact	gaatttttc	tccctaagt	caggaataag	acaaagatgt	5940
	ctgctttac	tactcttatt	caacataata	ctgcaatccc	ttgccagtgc	aataaggcaa	6000
	aaaaaatgaa	ataaaaggaa	aactgatcag	aaagaaagaa	ataaaaactgt	tcctatttgt	6060
	ggatgacatg	attacataga	aaatctcaa	gaatctgtaa	gaaacttctt	agaattaata	6120
40	aatgaattca	tcaaggttgc	agaatataag	ataaacataa	aaaatctatt	gtatttctat	6180
	atattagcaa	ggaacatgt	tacacagaaa	ttaaaactac	aataccattt	ataattgctc	6240
	aaaaaggcca	ggcatggtgg	ctcacacctg	taattcctgc	actttggag	gccagggtgg	6300
	gaagattgct	taagcccagg	agttcaagac	cagccgggc	aacatagtga	gaccttgtct	6360
45	ctacaaaaag	taaaaaattt	gctgacatg	gccgggtgca	gtggctact	cctgttaaccc	6420
	caacacttt	ggaggctgag	gcggggcgat	catgaggtca	ggagatcgag	accatctgg	6480
	ctaacacgg	gaaaccctgt	ctctactaaa	aacacaaaaaa	attagctgga	tgtggtgcc	6540
	ggcgcctgt	gacccagcta	ctcggttgc	tgaggcagga	aatggcgtg	aacctggag	6600
	gcggagctt	cagttagct	agatttgcc	actgcactcc	agcctgggt	acacagttag	6660
	actacgtctc	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaat	tagctgagca	ttatggtgta	tgcctgttagt	6720
	cccagctact	ggggaggctg	aggtgggagg	attgctttag	ccctaggagg	gcaaggctgc	6780
50	agtgagccat	gatcacacca	ctgctttcca	gcctcggtag	gagagcaaga	cccttatctca	6840
	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	agaaaagaaa	agaaaagaaa	agaaaaagaa	agagagaaaag	6900
	aaataacttag	gtgttaatct	aaaaaacatg	cgtagggcca	ggtgcagtgg	ctcatgcctg	6960
	taatcccagc	actttgggaa	gttggggctg	gcggatcact	tgaagtccgg	agtttgagac	7020
	cagcctggcc	aacatgggt	aacccgtct	ctactaaaaaa	tgcaaaaatt	aggcaggtgt	7080
55	tgtggcgcat	gcctgatccc	agctacttt	gaggctgagg	caggagaatt	gcttcaaccc	7140
	gggaggcaga	ggttgcagt	agccaagact	gttccactgc	actccagcct	gggcaacaga	7200
	gtaagagtct	gtctccgaa	aaaaaaaaaa	agaaaaaaaga	aagcattgaa	ttgttatgcta	7260
	aaaactacac	gatgctgatt	aaagaagtca	aagaagatct	aatatatatgg	agagacatgc	7320

	tgtactcatg gattgatgga ttggaaagact caacataaga cagatatcaa ttttccccaa	7380
5	attaatatac aagttaatc caattcctat aaaaatacca gcaagattt ttgttagatat	7440
	aaacaagttg gccagggtgt a gtggcttaca cctgtaatcc tagcactttg ggaggctgag	7500
	gtgggaagat cgcttgagcc caggtgttca cgactgcagt gagctatgtat tgtgtcactg	7560
	cattccagct ggcactccag cctaagtgtac aaaggagac cctgtctcaa aaacaaaaac	7620
	aaaacaaaaa taatttgtct ctgaaaatc cctattaaga agaagaaaag aggctggca	7680
	cagtggctca ccgctgtat cccagcacgt tgggaggctg aggccaggctg atcacttcag	7740
	cccagaagtt tgagatcagc ctgggcaaca tgaggaaacc ccgctctac caaaaaaaaaa	7800
10	aaaaggtaca tacacacaca cacacacata cacaagtata tacacatata	7860
	tatacacata caggtgaata gatgtatata catctatttta ttgtgaatat acatctatac	7920
	acacacgtgt gtgtacacat atatttaaa tttatttta ttatttttatt tatttttgag	7980
	acagagtctt gctctgtcac ccaggctggg tgcacctgtat ttcccaacga cacaggaggc	8040
	tgaggtggga gaatcactga gccaggaggc cagaggttgc agtgagccaa gatgttgcct	8100
	ggttgcctgg gcaacagagc gagaccctat atcaaaaaaag aagaataata agaaaagaca	8160
15	gtttacagaa tataagaaaa tatattcaca atccacatac ttagcaaagg actggtatct	8220
	agaatatgtat aaacaactct caaaactcaa aaccaaaaaa atgaacaatt caattagaaa	8280
	acaggccgaa aaggacatac agtggcaaa taagcacatg aaaagttgtt caacatcatt	8340
	aatcatttagg gatatgtaca taaaaccac aataggctat cactaaacct atcagaatgg	8400
	ctaaatacaa aatttggaca ccaccaaattt ctgatgagga ttgtggagaaa ctgggtcatt	8460
20	cttccaatat tgggggagg ctAAAatggc aaagccactc tggaaaacag tttgatagtt	8520
	tcttataaaaa caaaacatgc ggccgggcgc ggtagctcac gcctgtatc ccagcacttt	8580
	gggaggccga ggccgggtgga tcacgaggc aggagatcga gaccatcctg gctaacacgg	8640
	tgaaaccctg tctctactaa aaataaaaaa aattagccgg gcgtgggtggc gggcgccctgt	8700
	agtcccagct actcgggagg ctgaggcagg agaatggtgtt gaaccggga ggcggagctt	8760
25	gcagtgagcc gagatcgcgc cattgcactc caacctggg gacggaggaa gactccgtct	8820
	caaaaaaaca aaaacaaaca aacaaaaaac atgcaacaat ccagcaatat tgcaccccta	8880
	ggcatttatac ctagagcaat gaagacttat gcccacacaa aaagctgcac acaaatgttc	8940
	atagcagctt tattcatgtt agccaacaat tagaaacaat ctagatgtcc ttcaactgg	9000
	aatgtgattac atccatacca cgaaataactt tttagcaata aaaaggatga atcatagttac	9060
30	acaccacaac ctggatgaat ctccaggaa ttatgttgag tggaaaaaag ccaatctcaa	9120
	aaggtaatat actgtattaa tccatttata taacattttttaaaaataactt attatagaaa	9180
	tggagaacag atgagtgtt gcccagggtt aaggggctca gggatgggaa ggggaagggg	9240
	tatggctaca aaaagcaaca accttatggc gcggaaaatg ttctgtattc tgattgtgtc	9300
	aatgtgagca tactgggtga gatatagtgc tacagtttttcaagtttta ccatcagagt	9360
35	aaactggata gagggcacat aggatttctc tgtattactt cttacaactg caagtgaatc	9420
	tacaattatac tcaaaataat aagttagtt taatgtctt cgtgggtggct cacatctgtat	9480
	atctcagctc tttgggaggc tgagacgggt ggtggcttgc agtccaggag ttggagacca	9540
	gcctggccaa catggcaaaa ccggctctta ctaaaaaatac aaaaatttgc tggcggtgg	9600
	ggcaagtgcc tgttagtccc gctactcggg aggctgaggc aggagaatttgc ttgaaccccg	9660
40	ggaggtggag gttgcagtga gcccggatca cgccactaca ctgttagctt ggcgcacagaa	9720
	tgaggcttctt tctcaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaaagc aggccaggcagg ggccaggaa	9780
	gcgtataatt tttgttagttc aaatgactaa cttaaaaatgtt gaagattggc caggcgcagt	9840
	ggctcacgcc ttaatccc gacttttttggg aggccaaaggc ggggtggatca cgaggtcagg	9900
	agattgagcc actctggcta acacagtgtaa accccgtctc tactaaaata caaaaaatttt	9960
45	gctggcggtg gtggcaccctg cctgttagttt cagctacttggggctgag gcaggagaat	10020
	cacttgaacc caggaggcga agttgcagcg agccggatc acactactgc actccagct	10080
	gggtgacaaa gtgagattct gtctcaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaagt	10140
	aagtttacct ttttttttaa attttttttc ttttccttcc ctactttgtg agataatttt	10200

	cttcttttaaaaagccaaggagcttacttc tgtaagtaaa gattatctta agacaactta gaaatgtata ttatttagtat tttctatttc attgtaagtt atttgtaaat attgggttttg gtgctaacct agaattccat caaattaatt gtcccctaattatgccat tatttttttgc tctaacattgtatccttatttacaatgtgt aagtattttt tttgttagcta aattatggtt tgcattttaaattattgtt ttaaggataa agtccagaa atgaaattaa ggatatgaac ttttgagca catcttgtca gcactgagta gtattattta aaactttgg ggggggcaat tttataattg aaaaatatat cattgtttta atttgcatattt cttdactgc ctatgagatt aaaacaatgc actacttcc aaaaattctt aagtcttttg tggatgtct tttgttctgt ttctatggat ctcatcttcc ttcagaacag ctcccccttcc caacttcttgc atttctaaca ataacagtat caccctcctt gttctcccaa tttctgaaac acagagtcat gtttttttct ctgcttcaat ccctgggttc ctatcgcat caattatgac cttdcccttgc tttgaaagtg ttttgggccc ggcatgtatgt ctgccaccta ttgttaatcctt agcactttgg gaggctgagg cggctggatg acttgacctg aggatttcga gaccagctg ggcaacaggg cgaaacactcg tctctacaaa aaataaaaaa gttagtcggg agtggtgca catgctgtt gttccagtt cttggggggc tgaggtggca ggatctttt agcccacgag gtagatgtt cagttagccg tgattgcgcc actgcacccc agccttaggtt acagagttag accctgtctc aaaaaaaaaa aaatgttcta gtttcttctt cttctttgtt cccatggaa tgccaccatc accagccaag gctcacatac ctcccacctg gattacagt agottccagg taatgggtc tgctactatgt ctcgctact tggatttccc ttccccctgc tgcaagcattt cttccaaag ccatgctttt cacatgccac atccttagccc attagactaa gcctagaagc ctctgcagga cgttccaccc ctcagcgcca ctgctcagtt tcccagtgga aacctctgca cccaggaggt ttccccacag cttgcctgtg ctgcctctt ggagcttttcc tcccttcctg taatgtcctt gctgctcccc gtctctagtc cattgcctat acctttttt tttttttttt ttagatggta gttctctct ctcatccagg ctggagtgca gtggcgcat ctggctcac tgcaacctt gttccctggg ttcaaggat ttcctgcct cagcctcccg agtaactggg attacaggcg tgcaaccacca ttcctggcta atttttgtat ttttagtaaa gactgggtt caccatgtt gccaggctgg tcttgaactc ctgcctcag gtatccacc tgccctggcc tcccagatgt ctgggattac aggcgtagc caccgcaccc gccacaggcc catacctttt ttaagtcctt attcaataacc agttgtccca tgaatttgc ccagactcac tcataatgtt agaccttca tattatctt ccatagctt ttcaaaagtat gggacagcat ggacaaggcag gcatgggtt tctttgaag agaagcaagg aggcagatgtt attttagggag gagggttata catttcattt tgaaccaatt gcgtttggg tgatggcagg atattaacat aaacttattt ctggaccat tgaaatgtg tgcctagaac tgaggagaga ggtcagggtt ggcagtaaca acttggccac aatctgcaga gctgactggg gatgaggtgg aatttagaat gtgttagaa acggggaaaga gaaccaaaga cagagtctgg gacaacaccc aaatgttagat gtcaagagcaa gagttcaaga cgaagaaaa cgaatcatat ttagaaatgg aggggaggaa caaaagaggc ggagcaaaagt gggccagaac cagagttaggc cacgtttta agaagttgg taaaggaaact gtgaaaggaa ttttagtt tttcagggtt agctggggaa ttaaagcagt gttagatcc agggcaaaaca gcaagtaggg caggaaccac tgaaggaaca aataaagggg gaggtgggt ccaggttgc ttgagtaggg aagttttttt aaaaagtgtg aaactgaagg tttgggggttgg attgggtgcc tgccgtctc tgaggaagct tggggcaact gtgtgctgag gctgtgaggt tttctggaa gggctcctgg acagtaagag ctgagcagtg gggaaagagga ctgtgtggc tggaaagagga gagaaaggag agttagtgc tgaactggta tccaggctcc cacaccaagg cagaaaggag gagaggaccc gggcatctca gggaggcaga ggcagttacca agcagggtga gaggcttttag ttttagccac ctttggccca ttcctccaaa tatacattt aagtaaaaaac aaaacaaaaac agaactgttt gctatgtaaa ttttagcttcaaa aagccctgt tctacagaga ttttggagct tccactgcac ccagaaaaatg cacagctaaa gagaaaactt cccttggtga tggttatttag attttacaag aagaggccaa aggagacaca tacttagcc aqaaactt tccagagata qcattgcata	10260 10320 10380 10440 10500 10560 10620 10680 10740 10800 10860 10920 10980 11040 11100 11160 11220 11280 11340 11400 11460 11520 11580 11640 11700 11760 11820 11880 11940 12000 12060 12120 12180 12240 12300 12360 12420 12480 12540 12600 12660 12720 12780 12840 12900 12960 13020 13080
--	---	--

	gcgaaatagc ctgaattatt tttatTTTTT aaaacattt ttctttctt ttttctttc	13140
	ttttcttt tttttttttt ttttgagac agagtctcac tctgtcaccc aggctggagt	13200
	gcagtggcgt gatcttggct cactgcaatc tccacccc gggtaaagc cattctcc	13260
5	cctcagcctc ccaagtagct gggattacag gcatgcgtca ctatgctctg gctaatttt	13320
	ttttcttt ttttttggt attttagta gagatgggt ttcaccatgt tggccaggct	13380
	ggtcttgaac tcctgaccc aagtgatcca ccgccttggc ctcccaaagt gctgggattt	13440
	caggcgtgag ccaccgcacc cggccaaaaa tttttttct ttaagatgag gcctcactct	13500
	gttggccagg ctggagtgca gtgtacaat catagctcac tgtaacttt aactcctggg	13560
	ctcaagtgtat cttcctgctt cagcctctca agtagctggg attacaggca tgtgccacca	13620
10	cacccagcta atttttttta aaataatttt ttttagagac gagggtctcg attggctgcc	13680
	taggttggc ccagactcct gacgggctgc attttatcc tagtccacc acttacgggaa	13740
	gtcaaaattc aaaagataga aaaggcata taggctgggt gcagtggctc acacctgcaa	13800
	tcccagcaat ttgggaggct gaggtgggct gggtgcttga ggtcaggagt tcgagatcag	13860
	cctgggcaac atggcaaaaac ttgtatctac taaaaataca aaaattagcc agatgtggtg	13920
15	gtgtacacct gtaatccccag ctactccgaa ggctgaggca agagaatccc ttgaactcag	13980
	gaggcagagg ttacaatgag cagagatcga acactcgact ccataaaaac aaacaaacaa	14040
	aaaaagaaag caggctgggt gtggggctc acgcctgtaa ccccagcact tcgggaggcc	14100
	aaggcgagcg gatcacctga gggtggcat tcgagaccag cctgaccaac aaggagaaac	14160
	cctgtctcta ctgaaaatac aaaattagcc gggcttgggt ggcacatgcct gtaatctcag	14220
20	ctactcggga ggcagaggca agataattgc ttgaacccgg gaggcggagg ttgcgggtgag	14280
	ccaagatcat gccattgcac tccaaacctgg gcaacaatag cgaaactcctca tctcaaaaaaa	14340
	aaaaaagcaa agggcatata gtgaaaagct ttcttcctac acatgagtat tcacttcctc	14400
	ttccttagagg caaccaaggt tattttgtg tttgtgtgtg tttgtgtgtg tttgtgtgtg	14460
	tgtttggaa cagtctcact ctctcacca ggctgaaatg cagtggcgtc atctcactgc	14520
25	aaactctgccc tcccagtctc aagcgatctt gtgcctcagc ctccttgcgtt tttttcttt	14580
	taaatggggc ctcattctgt cgcccagggt ggagtgcagt ggcacatgcata tagtctactg	14640
	cagcctcgac ctcctgggtc aggttacccct cccacccat cctccggcat agctggggct	14700
	actggcatgc accaccacac tcagttatt tttttcttt tttgagacag agtctcactc	14760
	tgtcacctag actggagtgc agtggtgcca ttcattttgt ttcactgcaa ctttgactt	14820
30	ctgggctcaa gtgattctcc cacccatcagcc tcccaaggcg gctaattaaa aaaaattttt	14880
	ttttttttt ttttagagat ggggtttcgc catgttgcggc aggctgatct cgaactcctg	14940
	ggcacaaaca atctttccac ctcgatctt caaagagctg ggtttagatata gttccaccat	15000
	gcctggcctc attttcttt ttaattttt ttttagacatt atagctctt ttaatggcct	15060
	cattttctta tgtttaattt gagaattatt cttttcatat acaaagaata tattttctcc	15120
35	acctttaaaa acaaataatgta gactgtttaa catctcgctt tattcagtta gtgtatgttcc	15180
	ttagatacgg gtccaaatattt gtacacaaag cacttcctca ttccctcttt acggctgcatt	15240
	agcagttccac tgaatgggtg agctatgatc tattttaccc attctttattt gatggacatt	15300
	tggttttgttatacattttt taattctgtt tagattacaa atcaccatcc aaagaaattt	15360
	tactggttta ttctcctaca atgtgtgaga gttggtaat tacttaatct caatatgtga	15420
40	gagtttaggc agttacctaa tctctctgag ttcaggatcc tctatctgca aaataaaacaa	15480
	aacagtggtt acagtagatcta tttctcgaa ttattgttgg gattactgag atgatgcctg	15540
	taaagtattt ggcacatgtt agttgggtct ctccaaataa ggatatgatt ttattttgtat	15600
	tttgtgagcta ctgtcccagc caggtttatg gatatgtt gaccccttg ccagaccggg	15660
	tttctctgtat tagaacgagg agcagatgtt gcaggaaattt agcaactgat atcagaagag	15720
45	ccgtggcgt tctcttgcca gaggtggccct gtctccaggc cgcctcagtc cccccccatc	15780
	tgtcttctgc tcccagggtcc atccaagctg aatgatcgcc ctgactcaag aagaagccctt	15840
	tgggaccaag gaaactttcc cctgatcatc aagaatctt agatagaaga ctcagatact	15900
	tacatctgtt aagtggaggcc cagaaggag gaggtgcaat tgctgtgtt cggatgttg	15960

	tggggcaggt ggggatgagg atacccctg cctggttccc ttccccacta ctcccccccc	16020
	tgcaccaaat ccagcctgag ctggtgatac cgccagcagcc ccaagaggac caggctgtca	16080
	aactggcctc caaatgtctt aaaacccttc ttgatcaggt gagggatgct ggtggcgga	16140
	ggagggaaaga ggccttggga aaaggaaaga aaaggaaagg aggcaaggga aggagggaga	16200
5	gagactgggg aagagaggat gaggggagag gaggaaagaa gagagagagg aggggagagg	16260
	gaaaccctat cttggctggg ggtgcgcagc tgggtgctgg gaggaaggag atgttggac	16320
	ggcgataatg gagagatgtt gttggttcc ttttgtctgc ctttcctt gggatggta	16380
	tgtgtgtac acagctggcc tttccctcca cagtactgc caactctgac acccacctgc	16440
	ttcagggca ggcctgacc ctgacccctgg agagccccc tggtagtagc ccctcagtgc	16500
10	aatgttaggag tccaagggggt aaaaacatac agggggggaa gaccctctcc gtgtctcagc	16560
	tggagctcca ggatagtgcc acctggacat gcactgtctt gcagaaccag aagaagggtgg	16620
	agttcaaaat agacatcgta gtgcttaggt agggaagccc ctcttcgcgc agtctccctc	16680
	ctgccccagg ggctgacagc ccctccctct gctctgactg ccctgtttct ggttctggtg	16740
	ctgggagggtc aggagtggag aagactaggt cccctagagc tgaggcctgt cttgaaggac	16800
15	tcactggggc cctcatcctc agggggctga ttggcagccca cccctcagtg tggtaggacat	16860
	ggagaaagga aaggctgggg aaggttaagga tgcttagggc ccgagtctcc tttggaggcc	16920
	ccaaaggagg aatgtcaggg agcttacttt ctttggcc tcagctccac acccctacca	16980
	atgtggcaaa tccacttact cagggacact aacaccagta agccaaccct gatgtatgttc	17040
	tatgttgc tac tctggaccc ctaagccagg ccactgtggg gagaccaagg tcctacccca	17100
20	gatcctgtcc cttgggtgct tatgtgactt aaggttagaca taaggttagt tgccagttta	17160
	gtgcattgtac gctgattgaa atcctgggatc tgccacaacc atgtgacctt gggatgttta	17220
	ctaaacctct ctgcacccctt gtttcagcct ctgtgaaatg gggatgtatgt taactgccat	17280
	agtgactacc tcgtattaaat ttgaggactg atatacgtaa ggcactgaaa atgggtgcctg	17340
	gcacagagta agccctagtt aagtgttcgc tggttattttg tgaagggtga tgaatacgcc	17400
25	tctaaggagt ggaggccaaa tggcttctgt ggtccaggaa tcctaaggac agcaaggatc	17460
	ccctgtggct gggctgctct gtgtatggctt ccggggaggag ggaggtggcc tgctgttagga	17520
	aaatgtctggg tggagaagg gagagaaggc tggagaggta ggaaggaact gaagtatctg	17580
	aagtgacaag gtgggtgtct ggactcgatcg ggtcccttc catctccctg ctgcctccac	17640
	atgcacccactt cactcgatcg ccctcatctt cctatctcct caccagggt ctctccctc	17700
30	ccacctccag ctttccagaa ggcctccagc atagtctata agaaagagg ggaacagggtg	17760
	gagttctcct tcccactcg ctttacagtt gaaaagctga cgggcagtgg cgagctgtgg	17820
	tggcaggcgg agagggcttc ctcctccaag tcttggatca cctttgaccc gaaacaacaag	17880
	gaagtgtctg taaaacgggt taccaggac cctaagctcc agatggcaaa gaagctcccg	17940
	ctccacccatca ccctggccca ggccttgcct cagtatgtcg gctctggaaa cctcaccctg	18000
35	gcccttgaag cgaaaacagg aaagttgcat caggaagtga acctgggtgt gatgagaggt	18060
	gagggggccag gccaggagg ggtggcagg ggaaggagtt ggagggccct ggcccaggc	18120
	tccctctgag gcaaggccagg ccccaaggagg ggatgcctag gccctggatca cctggatgaa	18180
	gtgagggagg gccctctggg tttggggctg gtttgaact gagacatcca tgagccagcc	18240
	tggggctggc ttcactgaag atc	18263
40	<210> 78	
	<211> 458	
	<212> PRT	
	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
45	<223> синтетический	
	<400> 78	

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

1

5

10

15

RU 2732 628 C2

	Leu Ser Gln Leu Leu Ala Val Thr Gln Gly Lys Lys Val 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	
5	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			
10	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	
15	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 Lys Thr Leu Ser Val Ser Gln Leu Glu			
20	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	
25	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			
30	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	
35	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			
40	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	
45	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

RU 2732628 C2

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
 5 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> 79
 10 <211> 293
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> синтетический
 15 <400> 79
 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 Lys Ser Ile Gln Phe His Trp Lys Asn Ser Asn
 20 25 30
 20 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 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
 25 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
 30 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 Lys Thr Leu
 130 135 140
 Ser Val Ser Gln Leu Glu Leu Gln Asp Ser Gly Thr Trp Thr Cys Thr
 35 145 150 155 160
 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 Glu Gly Glu
 180 185 190
 40 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
 45 225 230 235 240
 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

RU 2732628 C2

	260	265	270	
5	Thr Leu Ala Leu Glu Ala Lys Thr Gly Lys Leu His Gln Glu Val Asn			
	275	280	285	
	Leu Val Val Met Arg			
5	290			
	<210> 80			
	<211> 142			
	<212> ДНК			
	<213> Искусственная последовательность			
10	<220>			
	<223> синтетический			
	<400> 80			
	tgtttgcctg tgacatgaac tcatttgac acaaaccact gtgctagggg ggatccacta	60		
	gtaacggccg ccagtgtgct ggaattcgcc ctcgcaaggg ccaggcatat aagtacacaa	120		
15	taaacaaatg gcagctctct cc	142		
	<210> 81			
	<211> 99			
	<212> ДНК			
	<213> Искусственная последовательность			
20	<220>			
	<223> синтетический			
	<400> 81			
	cccctccttc ctccccagg cacttccaa gtgtcaactc taggcctat cgccggccsca	60		
	ccgggtataac ttctgtataat gtatgtata cgaagttat	99		
25	<210> 82			
	<211> 90			
	<212> ДНК			
	<213> Искусственная последовательность			
	<220>			
30	<223> синтетический			
	<400> 82			
	ataacttcgt ataatgtatg ctatacgaag ttatgtcgac gtagcctatt tctctagatc	60		
	caaaaatgatg acaacaaaaag gtaccttgtg	90		
	<210> 83			
35	<211> 210			
	<212> PRT			
	<213> Искусственная последовательность			
	<220>			
	<223> синтетический			
40	<400> 83			
	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	
45	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	

RU 2732628 C2

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
 5 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
 10 130 135 140
 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
 15 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
 20 210
 <210> 84
 <211> 151
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 25 <220>
 <223> синтетический
 <400> 84
 Val Leu His Gly Asn Ser Val Leu Gln Gln Thr Pro Ala Tyr Ile Lys
 1 5 10 15
 30 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
 35 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
 40 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
 45 130 135 140
 Arg Pro Glu Thr Gln Lys Gly
 145 150
 <210> 85

<211>	100		
<212>	ДНК		
<213>	Искусственная последовательность		
<220>			
<i>5</i>	<223> синтетический		
<400>	85		
	tgaacctgct gctgctgggt gagtcgatta tcctggggag tggagaagct aggccgagcc	60	
	agttccgggt gtcgcccgtg gatcggacct ggaacctggg		100
	<210> 86		
<i>10</i>	<211> 90		
	<212> ДНК		
	<213> Искусственная последовательность		
	<220>		
	<223> синтетический		
<i>15</i>	<400> 86		
	atgccaggaa cagccctgat actgttagta gagtcaaggg ctgtccaagt accggataaa	60	
	cttcgtataa ggtatcctat acgaagttat		90
	<210> 87		
	<211> 89		
<i>20</i>	<212> ДНК		
	<213> Искусственная последовательность		
	<220>		
	<223> синтетический		
	<400> 87		
<i>25</i>	ataacttcgt ataaggtatc ctatacgaag ttatctcgac ctgatcttgg agggagacct	60	
	ggaccggggag acgtgctggg ggcagggtt		89
	<210> 88		
	<211> 243		
	<212> PRT		
<i>30</i>	<213> Искусственная последовательность		
	<220>		
	<223> синтетический		
	<400> 88		
	Met Ala Ser Pro Leu Thr Arg Phe Leu Ser Leu Asn Leu Leu Leu		
<i>35</i>	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		
<i>40</i>	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		
<i>45</i>	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		
5	145	150	155
	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
10	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		
15	225	230	235
	Lys Ile Val		
	<210> 89		
	<211> 152		
	<212> PRT		
20	<213> Искусственная последовательность		
	<220>		
	<223> синтетический		
	<400> 89		
	Arg Pro Ser Gln Phe Arg Val Ser Pro Leu Asp Arg Thr Trp Asn Leu		
25	1	5	10
	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
30	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
	Leu Thr Leu Ser Asp Phe Arg Arg Glu Asn Glu Gly Tyr Tyr Phe Cys		
35	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
40	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	
	<210> 90		
45	<211> 149		
	<212> ДНК		
	<213> Искусственная последовательность		
	<220>		

<223>	Последовательность химерного человеческого/мышиного локуса МНС I в участке соединения 5' мышиной/человеческой последовательностей	
<400>	90	
	agtgtcgccg cggacgcgtgg atataaaagtc cacgcagccc gcagaactca gaagtcgcga	60
5	atcgccgaca ggtgcgtatgg ccgtcatggc gccccgaacc ctgcgtcctgc tactctcggg	120
	ggctctggcc ctgaccsaga cctgggcgg	149
<210>	91	
<211>	159	
<212>	ДНК	
10	<213> Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	Последовательность химерного человеческого/мышиного локуса МНС I в участке соединения 3' человеческой/мышиной последовательностей	
<400>	91	
15	ggtgtgtgcct tctggacagg agcagagata cacctgccat gtgcagcatg agggtttgcc	60
	caagccccc accctgagat gggtaagga gagtgtgggt gcagagctgg ggtcaggaa	120
	agctggagct ttctgcagac cctgagctgc tcaggcgt	159

(57) Формула изобретения

- 20 1. Генетически модифицированная мышь для формирования опосредованных Т-клетками иммунных ответов, причем мышь содержит в своем геноме:
- (а) первую нуклеотидную последовательность, кодирующую химерный корецептор CD4, который содержит домены D1, D2 и D3 человеческого полипептида CD4 и по меньшей мере трансмембранный и цитоплазматический домены полипептида CD4 мыши,
- 25 при этом мышь экспрессирует химерный корецептор CD4;
- (б) вторую нуклеотидную последовательность и третью нуклеотидную последовательность, соответственно кодирующие химерный полипептид CD8α и химерный полипептид CD8β,
- 30 при этом химерный полипептид CD8α содержит внеклеточный участок человеческого полипептида CD8α и по меньшей мере трансмембранный и цитоплазматический домены полипептида CD8α мыши,
- при этом химерный полипептид CD8β содержит внеклеточный участок человеческого полипептида CD8β и по меньшей мере трансмембранный и цитоплазматический домены полипептида CD8β мыши, и
- 35 при этом мышь экспрессирует химерный корецептор CD8, содержащий химерный полипептид CD8α и химерный полипептид CD8β;
- (с) первую последовательность нукleinовой кислоты и вторую последовательность нукleinовой кислоты, соответственно кодирующие химерный полипептид МНС II α и химерный полипептид МНС II β,
- 40 при этом химерный полипептид МНС II α содержит внеклеточный участок человеческого полипептида HLA класса II α и по меньшей мере трансмембранный и цитоплазматический домены полипептида МНС II α мыши,
- при этом химерный полипептид МНС II β содержит внеклеточный участок человеческого полипептида HLA класса II β и по меньшей мере трансмембранный и цитоплазматический домены полипептида МНС II β мыши,
- 45 при этом у мыши экспрессируется химерный комплекс МНС II, содержащий химерный полипептид МНС II α и химерный полипептид МНС II β; и

при этом химерный комплекс МНС II ассоциируется с химерным корецептором CD4;

(d) третью последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую химерный полипептид МНС I,

при этом химерный полипептид МНС I содержит внеклеточный участок

5 человеческого полипептида HLA класса I и трансмембранный и цитоплазматический домены полипептида МНС I мыши,

при этом у мыши экспрессируется химерный полипептид МНС I, и

при этом химерный полипептид МНС I ассоциируется с химерным корецептором CD8;

10 (e) неперестроенную последовательность вариабельного участка Т-клеточного рецептора (TCR) α , содержащую по меньшей мере один человеческий сегмент V α и по меньшей мере один человеческий сегмент J α , которые перестраиваются в Т-клетке с образованием перестроенной человеческой последовательности V α /J α , функционально связанной с последовательностью константного участка TCR α мыши; и

15 неперестроенную последовательность вариабельного участка TCR β , содержащую по меньшей мере один человеческий сегмент V β , по меньшей мере один человеческий сегмент D β и по меньшей мере один человеческий сегмент J β , которые перестраиваются в Т-клетке с образованием перестроенной человеческой последовательности V β /D β /J β , функционально связанной с последовательностью константного участка TCR β мыши,

20 при этом перестроенная человеческая последовательность V α /J α , функционально связанныя с последовательностью константного участка TCR α мыши, кодирует гуманизированную цепь TCR α , содержащую человеческий вариабельный домен TCR α , функционально связанный с константным доменом TCR α мыши,

при этом перестроенная человеческая последовательность V β /D β /J β , функционально

25 связанныя с последовательностью константного участка TCR β мыши, кодирует гуманизированную цепь TCR β , содержащую человеческий вариабельный домен TCR β , функционально связанный с константным доменом TCR β мыши, и

при этом у мыши экспрессируется Т-клеточный рецептор на поверхности Т-клетки, причем Т-клеточный рецептор содержит гуманизированную цепь TCR α и

30 гуманизированную цепь TCR β , и

(f) необязательно, локус $\beta 2$ -микроглобулина, кодирующий человеческий или гуманизированный полипептид $\beta 2$ -микроглобулин.

2. Генетически модифицированная мышь по п. 1, содержащая в своем геноме зародышевой линии:

35 (a) первую нуклеотидную последовательность, кодирующую химерный корецептор CD4;

(b) вторую и третью нуклеотидные последовательности, соответственно кодирующие химерный полипептид CD8 α и химерный полипептид CD8 β ;

(c) первую и вторую последовательности нуклеиновых кислот, соответственно

40 кодирующие химерный полипептид МНС II α и химерный полипептид МНС II β ;

(d) третью последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую химерный полипептид МНС I; и

(e) неперестроенную последовательность вариабельного участка TCR α , содержащую по меньшей мере один человеческий сегмент V α и по меньшей мере один человеческий

45 сегмент J α , которые перестраиваются в Т-клетке с образованием перестроенной человеческой последовательности V α /J α , функционально связанной с

последовательностью константного участка TCR α мыши, и неперестроенную

последовательность вариабельного участка TCR β , содержащую по меньшей мере один

человеческий сегмент V β , по меньшей мере один человеческий сегмент D β и по меньшей мере один человеческий сегмент J β , которые перестраиваются в Т-клетке с образованием перестроенной человеческой последовательности V β /D β /J β , функционально связанной с последовательностью константного участка TCR β мыши.

- 5 3. Генетически модифицированная мышь по п. 1, у которой:
 - (а) первая нуклеотидная последовательность находится в эндогенном локусе Т-клеточного корецептора CD4;
 - (б) вторая нуклеотидная последовательность находится в эндогенном локусе Т-клеточного корецептора CD8 α и третья нуклеотидная последовательность находится в эндогенном локусе Т-клеточного корецептора CD8 β ;
 - 10 (c) первая последовательность нуклеиновой кислоты находится в эндогенном локусе МНС II α мыши и вторая последовательность нуклеиновой кислоты находится в эндогенном локусе МНС II β мыши;
 - (d) третья последовательность нуклеиновой кислоты находится в эндогенном локусе
- 15 МНС I мыши; и/или
 - (e) неперестроенная последовательность вариабельного участка TCR α находится в эндогенном локусе вариабельного участка TCR α и неперестроенная последовательность вариабельного участка TCR β находится в эндогенном локусе вариабельного участка TCR β .
- 20 4. Генетически модифицированная мышь по п. 3, у которой:
 - (а) первая нуклеотидная последовательность экспрессируется под регуляторным контролем эндогенных промоторных и регуляторных элементов корецептора CD4 мыши;
 - (b) вторая нуклеотидная последовательность экспрессируется под регуляторным
- 25 контролем эндогенных промоторных и регуляторных элементов полипептида CD8 α мыши и третья нуклеотидная последовательность экспрессируется под регуляторным контролем эндогенных промоторных и регуляторных элементов полипептида CD8 β мыши;
- (c) первая последовательность нуклеиновой кислоты экспрессируется под
- 30 регуляторным контролем эндогенных промоторных и регуляторных элементов МНС II α мыши и вторая последовательность нуклеиновой кислоты экспрессируется под регуляторным контролем эндогенных промоторных и регуляторных элементов МНС II β мыши;
- (d) третья последовательность нуклеиновой кислоты экспрессируется под
- 35 регуляторным контролем эндогенных промоторных и регуляторных элементов МНС I мыши; и/или
 - (e) неперестроенная последовательность вариабельного участка TCR α экспрессируется под регуляторным контролем эндогенных промоторных и регуляторных элементов TCR α и неперестроенная последовательность вариабельного участка TCR β
- 40 экспрессируется под регуляторным контролем эндогенных промоторных и регуляторных элементов TCR β .
- 5. Генетически модифицированная мышь по п. 1, у которой:
 - (а) химерный корецептор CD4 содержит домены D1, D2 и D3 человеческого полипептида CD4, функционально связанные с D4, трансмембранным и
 - 45 цитоплазматическим доменами эндогенного полипептида CD4 мыши,
 - (б) химерный полипептид CD8 α содержит IgV-подобный домен человеческого полипептида CD8 α , функционально связанный с трансмембранным и
 - цитоплазматическим доменами эндогенного полипептида CD8 α мыши, и химерный

полипептид CD8 β содержит IgV-подобный домен человеческого полипептида CD8 β , функционально связанный с трансмембранным и цитоплазматическим доменами эндогенного полипептида CD8 β мыши;

(с) химерный полипептид МНС II α содержит домены α_1 и α_2 человеческого HLA

5 класса II, функционально связанные с трансмембранным и цитоплазматическим доменами мыши эндогенного полипептида МНС II α мыши, и химерный полипептид МНС II β содержит домены β_1 и β_2 человеческого HLA класса II, функционально связанные с трансмембранным и цитоплазматическим доменами эндогенного полипептида МНС II β мыши; и/или

10 (d) химерный полипептид МНС I содержит домены α_1 , α_2 и α_3 человеческого HLA класса I, функционально связанные с трансмембранным и цитоплазматическим доменами эндогенного полипептида МНС I мыши.

6. Генетически модифицированная мышь по п. 1, у которой человеческий внеклеточный участок химерного полипептида МНС II α кодируется геном

15 человеческого лейкоцитарного антигена (HLA) класса II, выбранным из группы, состоящей из любого гена цепи α HLA-DR, HLA-DQ и HLA-DP;

при этом человеческий внеклеточный участок химерного полипептида МНС II β кодируется геном HLA класса II, выбранным из группы, состоящей из любого гена цепи β HLA-DR, HLA-DQ и HLA-DP; и/или

20 при этом внеклеточный участок химерного полипептида МНС I кодируется человеческим геном HLA-A, человеческим геном HLA-B или человеческим геном HLA-C.

7. Генетически модифицированная мышь по п. 6, у которой человеческие внеклеточные участки химерного полипептида МНС II α и химерного полипептида

25 МНС II β соответственно кодируются геном цепи α и геном цепи β HLA-DR, и

при этом внеклеточный участок химерного полипептида МНС I кодируется человеческим геном HLA-A.

8. Генетически модифицированная мышь по п. 7, у которой химерный комплекс МНС II содержит домены α_1 , α_2 , β_1 и β_2 человеческого белка HLA-DR2.

30 9. Генетически модифицированная мышь по п. 7, у которой химерный полипептид МНС I содержит домены α_1 , α_2 и α_3 человеческого белка HLA-A2.

10. Генетически модифицированная мышь по п. 1, у которой неперестроенная последовательность вариабельного участка TCR α содержит набор человеческих сегментов гена V α и набор человеческих сегментов гена J α и/или неперестроенная

35 последовательность вариабельного участка TCR β содержит набор человеческих сегментов гена V β , набор человеческих сегментов гена D β и набор человеческих сегментов гена J β .

11. Генетически модифицированная мышь по п. 1, причем в эндогенном вариабельном локусе TCR α мыши отсутствуют все или по существу все функциональные эндогенные

40 сегменты гена V α и/или отсутствуют все или по существу все функциональные эндогенные сегменты гена J α ; и/или

причем в эндогенном вариабельном локусе TCR β мыши (а) отсутствуют все или по существу все функциональные эндогенные сегменты гена V β , (б) отсутствуют все или по существу все функциональные эндогенные сегменты гена D β , (с) отсутствуют все

45 или по существу все функциональные эндогенные сегменты гена J β или (д) любая комбинация (а), (б) и (с).

12. Генетически модифицированная мышь по п. 1, у которой:

(а) первая нуклеотидная последовательность содержит последовательность,

- кодирующую домены D1, D2 и D3 человеческого полипептида CD4, которая (i) замещает последовательность, кодирующую домены D1, D2 и D3 эндогенного полипептида корецептора CD4 мыши, и (ii) функционально связана с эндогенными последовательностями, кодирующими D4, трансмембранный и цитоплазматический домены CD4 мыши, в эндогенном локусе корецептора CD4 мыши;
- 5 (b) вторая нуклеотидная последовательность содержит последовательность, кодирующую внеклеточный участок человеческого полипептида CD8 α , которая (i) замещает последовательность, кодирующую внеклеточный участок эндогенного полипептида CD8 α мыши, и (ii) функционально связана с эндогенными
- 10 последовательностями, кодирующими трансмембранный и цитоплазматический домены CD8 α мыши, в эндогенном локусе полипептида CD8 α мыши, и
- третья нуклеотидная последовательность содержит последовательность, кодирующую внеклеточный участок человеческого полипептида CD8 β , которая (i) замещает последовательность, кодирующую внеклеточный участок эндогенного полипептида
- 15 CD8 β мыши, и (ii) функционально связана с эндогенными последовательностями, кодирующими трансмембранный и цитоплазматический домены CD8 β мыши, в эндогенном локусе полипептида CD8 β ;
- (c) первая последовательность нуклеиновой кислоты содержит последовательность, кодирующую внеклеточный участок человеческого полипептида HLA класса II α ,
- 20 которая (i) замещает последовательность, кодирующую внеклеточный участок эндогенного полипептида МНС II α мыши, и (ii) функционально связана с эндогенными последовательностями, кодирующими трансмембранный и цитоплазматический домены полипептида МНС II α , в эндогенном локусе МНС II α мыши, и
- вторая нуклеиновая кислота содержит последовательность, кодирующую
- 25 внеклеточный участок человеческого полипептида HLA класса II β , которая (i) замещает последовательность, кодирующую внеклеточный участок эндогенного полипептида МНС II β мыши, и (ii) функционально связана с эндогенными последовательностями, кодирующими трансмембранный и цитоплазматический домены полипептида МНС II β , в эндогенном локусе МНС II β мыши;
- 30 (d) третья последовательность нуклеиновой кислоты содержит последовательность, кодирующую внеклеточный участок человеческого полипептида HLA класса I, которая (i) замещает последовательность, кодирующую внеклеточный участок эндогенного полипептида МНС I мыши, и (ii) функционально связана с эндогенными последовательностями, кодирующими трансмембранный и цитоплазматический домены
- 35 полипептида МНС I, в эндогенном локусе МНС I мыши; и/или
- (e) неперестроенная последовательность вариабельного участка TCR α замещает один или более эндогенных сегментов гена V α и/или J α в эндогенном локусе вариабельного участка TCR α и неперестроенная последовательность вариабельного участка TCR β замещает один или более эндогенных сегментов гена V β , D β и/или J β в
- 40 эндогенном локусе вариабельного участка TCR β .

13. Генетически модифицированная мышь по п. 1, причем у мыши не экспрессируется

- (а) функциональный эндогенный корецептор CD4 и/или CD8 мыши из эндогенных локусов корецептора CD4 и/или CD8 соответственно, (б) эндогенный вариабельный домен TCR α из эндогенного локуса TCR α , (с) эндогенный вариабельный домен TCR β из эндогенного локуса TCR β и/или (д) внеклеточный домен эндогенного полипептида классического МНС класса I и/или класса II из своего эндогенного локуса МНС на клеточной поверхности.

14. Генетически модифицированная мышь по п. 1, дополнительно содержащая (f)

локус $\beta 2$ -микроглобулина, кодирующий полипептид, содержащий человеческую аминокислотную последовательность $\beta 2$ -микроглобулина, причем у мыши экспрессируется человеческий или гуманизированный полипептид $\beta 2$ -микроглобулина.

15. Генетически модифицированная мышь по п. 14, причем у мыши не экспрессируется

- ⁵ функциональный эндогенный полипептид $\beta 2$ -микроглобулин мыши из эндогенного локуса $\beta 2$ -микроглобулина мыши.

16. Генетически модифицированная мышь по п. 14, у которой локус $\beta 2$ -микроглобулина функционально связан с эндогенными регуляторными элементами $\beta 2$ -микроглобулина мыши.

- ¹⁰ 17. Генетически модифицированная мышь по п. 14, у которой локус $\beta 2$ -микроглобулина содержит нуклеотидную последовательность, представленную в экзоне 2, экзоне 3 и экзоне 4 человеческого гена $\beta 2$ -микроглобулина.

- ¹⁵ 18. Генетически модифицированная мышь по п. 17, у которой локус $\beta 2$ -микроглобулина дополнительно содержит нуклеотидную последовательность, представленную в экзоне 1 гена $\beta 2$ -микроглобулина мыши.

19. Генетически модифицированная мышь по п. 1,

при этом мышь экспрессирует:

химерный человеческий/мышиный корецептор CD4, содержащий домены D1, D2 и D3 человеческого полипептида CD4, функционально связанные с по меньшей мере

- ²⁰ трансмембранным и цитоплазматическим доменами мышиного полипептида CD4, полипептиды корецепторов CD8 α и CD8 β , каждый из которых соответственно содержит внеклеточный участок человеческого полипептида корецептора CD8 α и CD8 β , функционально связанный с мышиными трансмембранным и цитоплазматическим доменами CD8 α и CD8 β ;

- ²⁵ химерный человеческий/мышиный Т-клеточный рецептор, содержащий человеческий вариабельный участок TCR α и человеческий вариабельный участок TCR β , каждый из которых соответственно функционально связан с мышыным константным участком TCR α и мышыным константным участком TCR β на поверхности Т-клетки;

химерные человеческие/мышиные полипептиды MHC II α , MHC II β и MHC I, каждый

- ³⁰ из которых соответственно содержит внеклеточный участок человеческого полипептида HLA класса II α , HLA класса II β и HLA класса I, функционально связанный с мышыними трансмембранным и цитоплазматическим доменами мышиного полипептида MHC класса II α , MHC класса II β и MHC класса I; и

гуманизированный полипептид $\beta 2$ -микроглобулин.

- ³⁵ 20. Генетически модифицированная мышь по п. 1, причем у мыши экспрессируются по меньшей мере 50% всех функциональных человеческих сегментов гена TCRV α и/или по меньшей мере 50% всех функциональных человеческих сегментов гена TCRV β .

21. Генетически модифицированная мышь по п. 19, у которой:

(а) химерный человеческий/мышиный корецептор CD4 содержит домены D1, D2 и

- ⁴⁰ D3 человеческого полипептида CD4, функционально связанные с D4, трансмембранным и цитоплазматическим доменами эндогенного мышиного полипептида CD4,

(б) химерный человеческий/мышиный полипептид CD8 α содержит IgV-подобный домен человеческого полипептида CD8 α , функционально связанный с трансмембранным и цитоплазматическим доменами эндогенного мышиного полипептида CD8 α , и химерный

- ⁴⁵ человеческий/мышиный полипептид корецептора CD8 β содержит IgV-подобный домен человеческого полипептида CD8 β , функционально связанный с трансмембранным и цитоплазматическим доменами эндогенного мышиного полипептида CD8 β ;

(с) химерный человеческий/мышиный полипептид MHC II α содержит домены $\alpha 1$ и

α2 человеческого HLA класса II, функционально связанные с мышиными трансмембранным и цитоплазматическим доменами эндогенного мышиного полипептида МНС II α, и химерный человеческий/мышиный полипептид МНС II β содержит домены β1 и β2 человеческого HLA класса II, функционально связанные с трансмембранным и цитоплазматическим доменами эндогенного мышиного полипептида МНС II β,

(d) химерный полипептид МНС I содержит домены α1, α2 и α3 человеческого HLA класса I, функционально связанные с трансмембранным и цитоплазматическим доменами эндогенного мышиного полипептида МНС I; и/или

(e) гуманизированный полипептид β2-микроглобулин, кодируемый нуклеотидной последовательностью, содержащей нуклеотидную последовательность, представленную в экзоне 1 эндогенного мышиного гена β2-микроглобулина, функционально связанную с нуклеотидной последовательностью, представленной в экзоне 2, экзоне 3 и экзоне 4 человеческого гена β2-микроглобулина.

22. Генетически модифицированная мышь по п. 21, у которой химерный человеческий/мышиный полипептид МНС II α представляет собой химерный полипептид HLA-DR/H-2E α, химерный полипептид МНС II β представляет собой химерный человеческий/мышиный полипептид HLA-DR/H-2E β и химерный полипептид МНС I представляет собой химерный человеческий/мышиный полипептид HLA-A/H-2K, и причем у мыши экспрессируются белки HLA-A/H-2K и HLA-DR/H-2E.

23. Способ создания генетически модифицированной мыши по п. 1, включающий модификацию генома мыши для содержания:

(a) первой нуклеотидной последовательности, кодирующей химерный корецептор CD4;

(b) второй и третьей нуклеотидных последовательностей, соответственно кодирующих химерный полипептид CD8α и химерный полипептид CD8β;

(c) первой и второй последовательностей нуклеиновых кислот, соответственно кодирующих химерный полипептид МНС II α и химерный полипептид МНС II β;

(d) третьей последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей химерный полипептид МНС I;

(e) неперестроенной последовательности вариабельного участка TCRα, содержащей по меньшей мере один человеческий сегмент Vα и по меньшей мере один человеческий сегмент Jα, которые перестраиваются в Т-клетке с образованием перестроенной человеческой последовательности Vα/Jα, функционально связанной с

последовательностью константного участка TCRα мыши, и неперестроенной последовательности вариабельного участка TCRβ, содержащей по меньшей мере один человеческий сегмент Vβ, по меньшей мере один человеческий сегмент Dβ и по меньшей мере один человеческий сегмент Jβ, которые перестраиваются в Т-клетке с образованием перестроенной человеческой последовательности Vβ/Dβ/Jβ, функционально связанной с последовательностью константного участка TCRβ мыши; и

(f) необязательно локуса β2-микроглобулина, кодирующего человеческий или гуманизированный полипептид β2-микроглобулин.

24. Способ по п. 23, в котором модификация генома включает гомологичную рекомбинацию в одной или более эмбриональных стволовых клетках мыши с тем,

чтобы в геном эмбриональной стволовой клетки мыши добавить в любом порядке первую, вторую и третью нуклеотидные последовательности, неперестроенную последовательность вариабельного участка TCRα и неперестроенную последовательность вариабельного участка TCRβ, первую, вторую и третью

последовательность нуклеиновой кислоты и необязательно локус β2-микроглобулина.

25. Способ по п. 24, дополнительно включающий создание мыши из эмбриональной стволовой клетки мыши, содержащей

первую, вторую и третью нуклеотидные последовательности, неперестроенную

5 последовательность вариабельного участка TCRα и неперестроенную

последовательность вариабельного участка TCRβ, первую, вторую и третью

последовательность нуклеиновой кислоты и необязательно локус β2-микроглобулина.

26. Способ получения клетки, которая экспрессирует белок TCR, который специфичен к антигену и содержит человеческий вариабельный домен TCR,

10 причем способ включает

выделение из мыши по п. 1 Т-клетки, экспрессирующей белок TCR, который

специфичен к антигену и содержит как человеческий вариабельный домен TCR α, так

и человеческий вариабельный домен TCR β.

27. Способ получения белка TCR, который специфичен к антигену и содержит

15 человеческий вариабельный домен TCR,

причем способ включает

получение из мыши по п. 1 Т-клетки, экспрессирующей белок TCR, который

специфичен к антигену и содержит как человеческий вариабельный домен TCR α, так

и человеческий вариабельный домен TCR β, и выделение белка TCR.

28. Способ получения человеческого вариабельного домена TCR белка TCR, который

специфичен к антигену,

причем способ включает

получение из мыши по п. 1 белка TCR, который специфичен к антигену и содержит

как человеческий вариабельный домен TCR α, так и человеческий вариабельный домен

25 TCR β, и выделение человеческого вариабельного домена TCR α и/или человеческого

вариабельного домена TCR β.

29. Способ получения последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей

человеческий вариабельный домен TCR белка TCR, который специфичен к антигену,

причем способ включает получение из мыши по п. 1 белка TCR, который специфичен

30 к антигену и содержит как человеческий вариабельный домен TCR α, так и человеческий

вариабельный домен TCR β, и выделение последовательности нуклеиновой кислоты,

кодирующую человеческий вариабельный домен TCR α, и/или последовательности

нуклеиновой кислоты, кодирующую человеческий вариабельный домен TCR β.

30. Способ по любому из пп. 26-28, дополнительно включающий:

35 внедрение в клетку-хозяина одного или более экспрессионных векторов, содержащих

(i) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую человеческий вариабельный

домен TCR α в функциональной взаимосвязи с человеческим константным участком

TCR α, и/или (ii) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую человеческий

вариабельный домен TCR β в функциональной взаимосвязи с человеческим константным

40 участком TCR β,

культтивирование клетки-хозяина в условиях, достаточных для экспрессии (i) и/или

(ii),

причем последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие человеческий

вариабельный домен TCR α и человеческий вариабельный домен TCR β находятся на

45 одном или разных экспрессионных векторах.

31. Способ по п. 30, в котором один или более экспрессионных векторов содержат

последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую человеческий вариабельный

домен TCRα, функционально связанную с последовательностью, кодирующей

человеческий константный участок TCR α , и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую человеческий вариабельный домен TCR β , функционально связанную с последовательностью, кодирующей человеческий константный участок TCR β .

32. Способ по любому из пп. 26-31, в котором антиген представляет собой опухолевый

⁵ антиген, вирусный антиген или бактериальный антиген.

33. Т-клетка, экспрессирующая белок TCR, содержащий человеческий вариабельный домен TCR, специфичный к антигену, содержащая в своем геноме

(а) первую нуклеотидную последовательность, кодирующую химерный корецептор CD4, который содержит домены D1, D2 и D3 человеческого полипептида CD4 и по

¹⁰ меньшей мере трансмембранный и цитоплазматический домены полипептида CD4 мыши,

(б) вторую нуклеотидную последовательность и третью нуклеотидную последовательность, соответственно кодирующие химерный полипептид CD8 α и химерный полипептид CD8 β ,

¹⁵ при этом химерный полипептид CD8 α содержит внеклеточный участок человеческого полипептида CD8 α и по меньшей мере трансмембранный и цитоплазматический домены полипептида CD8 α мыши,

при этом химерный полипептид CD8 β содержит внеклеточный участок человеческого полипептида CD8 β и по меньшей мере трансмембранный и цитоплазматический домены

²⁰ полипептида CD8 β мыши,

(с) первую последовательность нуклеиновой кислоты и вторую последовательность нуклеиновой кислоты, соответственно кодирующие химерный полипептид МНС II α и химерный полипептид МНС II β ,

²⁵ при этом химерный полипептид МНС II α содержит внеклеточный участок человеческого полипептида HLA класса II α и по меньшей мере трансмембранный и цитоплазматический домены полипептида МНС II α мыши,

при этом химерный полипептид МНС II β содержит внеклеточный участок человеческого полипептида HLA класса II β и по меньшей мере трансмембранный и цитоплазматический домены полипептида МНС II β мыши,

³⁰ (д) третью последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую химерный полипептид МНС I,

при этом химерный полипептид МНС I содержит внеклеточный участок человеческого полипептида HLA класса I и трансмембранный и цитоплазматический домены полипептида МНС I мыши, и

³⁵ (е) перестроенную человеческую последовательность V α /J α , функционально связанную с последовательностью константного участка TCR α мыши, которая кодирует гуманизированную цепь TCR α , содержащую человеческий вариабельный домен TCR α , функционально связанный с константным доменом TCR α мыши; и перестроенную человеческую последовательность V β /D β /J β , функционально связанную с

⁴⁰ последовательностью константного участка TCR β мыши, которая кодирует гуманизированную цепь TCR β , содержащую человеческий вариабельный домен TCR β , функционально связанный с константным доменом TCR β мыши, и где белок TCR содержит гуманизированную цепь TCR α и гуманизированную цепь TCR β .

34. Гибридома, экспрессирующая белок TCR, содержащий человеческий вариабельный

⁴⁵ домен TCR, специфичный к антигену, причем гибридома получена из Т-клетки,

экспрессирующей белок TCR, содержащий человеческий вариабельный домен TCR, специфичный к антигену, и

при этом гибридома содержит:

(а) первую нуклеотидную последовательность, кодирующую химерный корецептор CD4, которая содержит домены D1, D2 и D3 человеческого полипептида CD4 и по меньшей мере трансмембранный и цитоплазматический домены полипептида CD4 мыши;

5 (б) вторую и третью нуклеотидные последовательности, соответственно кодирующие химерный полипептид CD8 α и химерный полипептид CD8 β ;

при этом химерный полипептид CD8 α содержит внеклеточный участок человеческого полипептида CD8 α и по меньшей мере трансмембранный и цитоплазматический домены полипептида CD8 α мыши,

10 при этом химерный полипептид CD8 β содержит внеклеточный участок человеческого полипептида CD8 β и по меньшей мере трансмембранный и цитоплазматический домены полипептида CD8 β мыши, и

(с) перестроенную человеческую последовательность V α /J α , функционально связанную с последовательностью константного участка TCR α мыши, которая кодирует

15 гуманизированную цепь TCR α , содержащую человеческий вариабельный домен TCR α , функционально связанный с константным доменом TCR α мыши, и перестроенную человеческую последовательность V β /D β /J β , функционально связанную с последовательностью константного участка TCR β мыши, которая кодирует гуманизированную цепь TCR β , содержащую человеческий вариабельный домен TCR β ,

20 функционально связанный с константным доменом TCR β мыши, и

при этом гибридома экспрессирует Т-клеточный рецептор на своей поверхности, причем Т-клеточный рецептор содержит гуманизированную цепь TCR α и гуманизированную цепь TCR β .

35. Композиция для оценки гуманизированного Т-клеточного иммунного ответа

25 среди мышиных клеток, причем композиция содержит первую и вторую клетку мыши по п. 1, причем первая и вторая клетки, каждая, содержит:

(а) первую нуклеотидную последовательность, кодирующую химерный корецептор CD4;

(б) вторую и третью нуклеотидные последовательности, соответственно кодирующие

30 химерный полипептид CD8 α и химерный полипептид CD8 β ;

(с) первую и вторую последовательности нуклеиновых кислот, соответственно кодирующие химерный полипептид МНС II α и химерный полипептид МНС II β ;

(д) третью последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую химерный полипептид МНС I;

35 (е) неперестроенную последовательность вариабельного участка TCR α , содержащую по меньшей мере один человеческий сегмент V α и по меньшей мере один человеческий сегмент J α , которые перестраиваются в Т-клетке с образованием перестроенной человеческой последовательности V α /J α , функционально связанной с последовательностью константного участка TCR α мыши, и неперестроенную

40 последовательность вариабельного участка TCR β , содержащую по меньшей мере один человеческий сегмент V β , по меньшей мере один человеческий сегмент D β и по меньшей мере один человеческий сегмент J β , которые перестраиваются в Т-клетке с образованием перестроенной человеческой последовательности V β /D β /J β , функционально связанной с последовательностью константного участка TCR β мыши, и

45 (f) необязательно, локус $\beta 2$ -микроглобулина, кодирующий человеческий или гуманизированный полипептид $\beta 2$ -микроглобулин,

причем первая клетка экспрессирует

(а) химерный корецептор CD4 и/или химерный корецептор CD8, содержащий химерный

полипептид CD8 α и химерный полипептид CD8 β , и

(b) химерный TCR человека/мыши, содержащий одну или обе из (i) химерной цепи TCR α человека/мыши, кодируемой перестроенной человеческой последовательностью Va/J α , функционально связанной с последовательностью константного участка TCR α мыши, и (ii) химерной цепи TCR β человека/мыши, кодируемой перестроенной человеческой последовательностью V β /D β /J β , функционально связанной с последовательностью константного участка TCR β мыши, и

причем у второй клетки экспрессируется химерный полипептид МНС I и, необязательно, человеческий или гуманизированный β 2-микроглобулин.

10 36. Композиция по п. 35, в которой первая клетка представляет собой Т-клетку мыши.

37. Композиция по п. 36, в которой вторая клетка представляет собой антиген представляющую клетку мыши, и причем вторая клетка дополнительно экспрессирует химерный комплекс МНС II, содержащий химерный полипептид МНС II α и химерный полипептид МНС II β .

15 38. Эмбриональная стволовая клетка генетически модифицированной мыши для создания мыши, которая формирует опосредованные Т-клетками иммунные ответы, причем эмбриональная стволовая клетка мыши содержит в своем геноме:

(a) первую нуклеотидную последовательность, кодирующую химерный корецептор CD4, который содержит домены D1, D2 и D3 человеческого полипептида CD4 и по 20 меньшей мере трансмембранный и цитоплазматический домены полипептида CD4 мыши,

(b) вторую нуклеотидную последовательность и третью нуклеотидную последовательность, соответственно кодирующие химерный полипептид CD8 α и химерный полипептид CD8 β ,

25 при этом химерный полипептид CD8 α содержит внеклеточный участок человеческого полипептида CD8 α и по меньшей мере трансмембранный и цитоплазматический домены полипептида CD8 α мыши,

при этом химерный полипептид CD8 β содержит внеклеточный участок человеческого полипептида CD8 β и по меньшей мере трансмембранный и цитоплазматический домены 30 полипептида CD8 β мыши,

(c) первую последовательность нукleinовой кислоты и вторую последовательность нукleinовой кислоты, соответственно кодирующие химерный полипептид МНС II α и химерный полипептид МНС II β ,

35 при этом химерный полипептид МНС II α содержит внеклеточный участок человеческого полипептида HLA класса II α и по меньшей мере трансмембранный и цитоплазматический домены полипептида МНС II α мыши,

при этом химерный полипептид МНС II β содержит внеклеточный участок человеческого полипептида HLA класса II β и по меньшей мере трансмембранный и цитоплазматический домены полипептида МНС II β мыши,

40 (d) третью последовательность нукleinовой кислоты, кодирующую химерный полипептид МНС I,

при этом химерный полипептид МНС I содержит внеклеточный участок человеческого полипептида HLA класса I и трансмембранный и цитоплазматический домены полипептида МНС I мыши, и

45 (e) неперестроенную последовательность вариабельного участка Т-клеточного рецептора (TCR) α , содержащую по меньшей мере один человеческий сегмент Va и по меньшей мере один человеческий сегмент J α , которые способны перестраиваться в Т-клетке с образованием перестроенной человеческой последовательности Va/J α ,

функционально связанной с последовательностью константного участка TCR α мыши; и неперестроенную последовательность вариабельного участка TCR β , содержащую по меньшей мере один человеческий сегмент V β , по меньшей мере один человеческий сегмент D β и по меньшей мере один человеческий сегмент J β , которые способны 5 перестраиваться в Т-клетке с образованием перестроенной человеческой последовательности V β /D β /J β , функционально связанной с последовательностью константного участка TCR β мыши.

39. Эмбриональная стволовая клетка генетически модифицированной мыши по п.

38, у которой:

- 10 (a) первая нуклеотидная последовательность находится в эндогенном локусе Т-клеточного корецептора CD4;
- (b) вторая нуклеотидная последовательность находится в эндогенном локусе Т-клеточного корецептора CD8 α и третья нуклеотидная последовательность находится в эндогенном локусе Т-клеточного корецептора CD8 β ;
- 15 (c) первая последовательность нукleinовой кислоты находится в эндогенном локусе МНС II α мыши и вторая последовательность нукleinовой кислоты находится в эндогенном локусе МНС II β мыши;
- (d) третья последовательность нукleinовой кислоты находится в эндогенном локусе МНС I мыши; и/или
- 20 (e) неперестроенная последовательность вариабельного участка TCR α находится в эндогенном локусе вариабельного участка TCR α и неперестроенная последовательность вариабельного участка TCR β находится в эндогенном локусе вариабельного участка TCR β .

40. Эмбриональная стволовая клетка генетически модифицированной мыши по п.

25 39, у которой:

- (a) первая нуклеотидная последовательность функционально связана с эндогенными промоторными и регуляторными элементами корецептора CD4 мыши;
- (b) вторая нуклеотидная последовательность функционально связана с эндогенными промоторными и регуляторными элементами полипептида CD8 α мыши и третья
- 30 нуклеотидная последовательность функционально связана с эндогенными промоторными и регуляторными элементами полипептида CD8 β мыши;
- (c) первая последовательность нукleinовой кислоты функционально связана с эндогенными промоторными и регуляторными элементами МНС II α мыши и вторая последовательность нукleinовой кислоты функционально связана с эндогенными
- 35 промоторными и регуляторными элементами МНС II β мыши;
- (d) третья последовательность нукleinовой кислоты функционально связана с эндогенными промоторными и регуляторными элементами МНС I мыши; и/или
- (e) неперестроенная последовательность вариабельного участка TCR α функционально связана с эндогенными промоторными и регуляторными элементами TCR α и
- 40 неперестроенная последовательность вариабельного участка TCR β функционально связана с эндогенными промоторными и регуляторными элементами TCR β .

41. Эмбриональная стволовая клетка генетически модифицированной мыши по п.

38, у которой:

- (a) первая нуклеотидная последовательность кодирует химерный корецептор CD4, 45 содержащий домены D1, D2 и D3 человеческого полипептида CD4, функционально связанные с трансмембранным и цитоплазматическим доменами эндогенного полипептида CD4 мыши,
- (b) вторая нуклеотидная последовательность кодирует химерный полипептид CD8 α ,

содержащий IgV-подобный домен человеческого полипептида CD8 α , функционально связанный с трансмембранным и цитоплазматическим доменами эндогенного полипептида CD8 α мыши, и третья нуклеотидная последовательность кодируют химерный полипептид CD8 β , содержащий IgV-подобный домен человеческого полипептида CD8 β , функционально связанный с трансмембранным и цитоплазматическим доменами эндогенного полипептида CD8 β мыши;

5 (c) первая последовательность нуклеиновой кислоты кодирует химерный полипептид МНС II α , содержащий домены $\alpha 1$ и $\alpha 2$ человеческого HLA класса II, функционально связанные с трансмембранным и цитоплазматическим доменами эндогенного

10 полипептида МНС II α мыши, и вторая последовательность нуклеиновой кислоты кодирует химерный полипептид МНС II β , содержащий домены $\beta 1$ и $\beta 2$ человеческого HLA класса II, функционально связанные с трансмембранным и цитоплазматическим доменами эндогенного полипептида МНС II β мыши; и/или

15 (d) третья последовательность нуклеиновой кислоты кодирует химерный полипептид МНС I, содержащий домены $\alpha 1$, $\alpha 2$ и $\alpha 3$ человеческого HLA класса I, функционально связанные с трансмембранным и цитоплазматическим доменами эндогенного полипептида МНС I мыши.

20

25

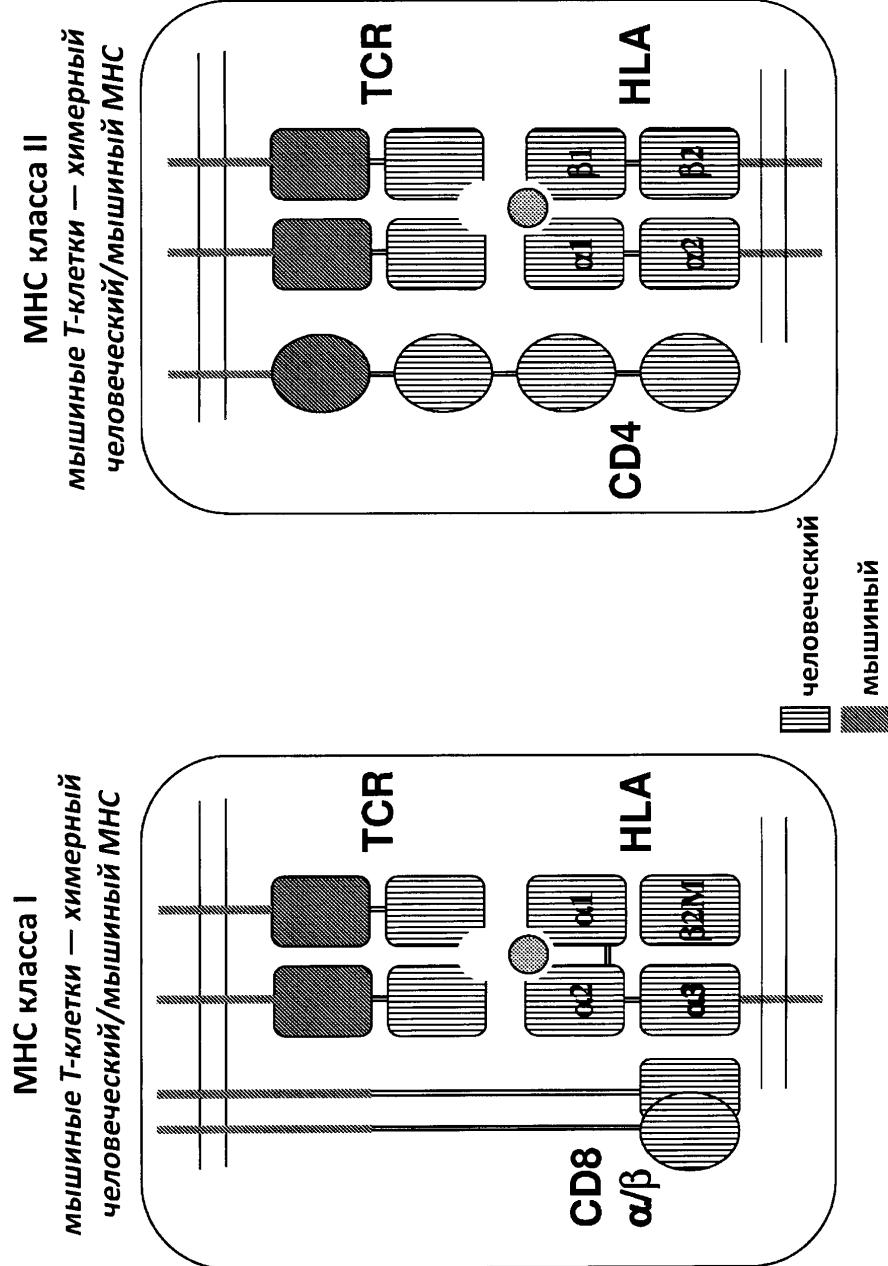
30

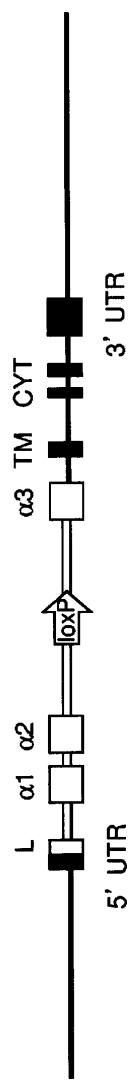
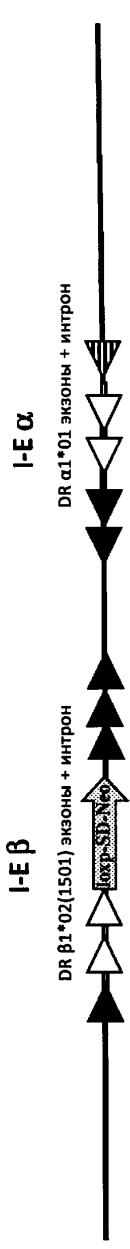
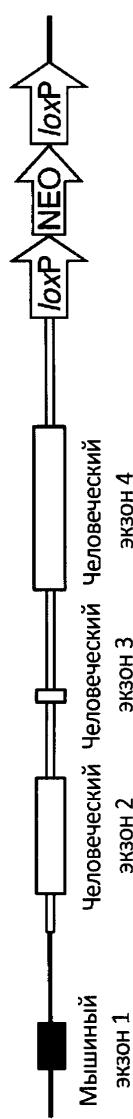
35

40

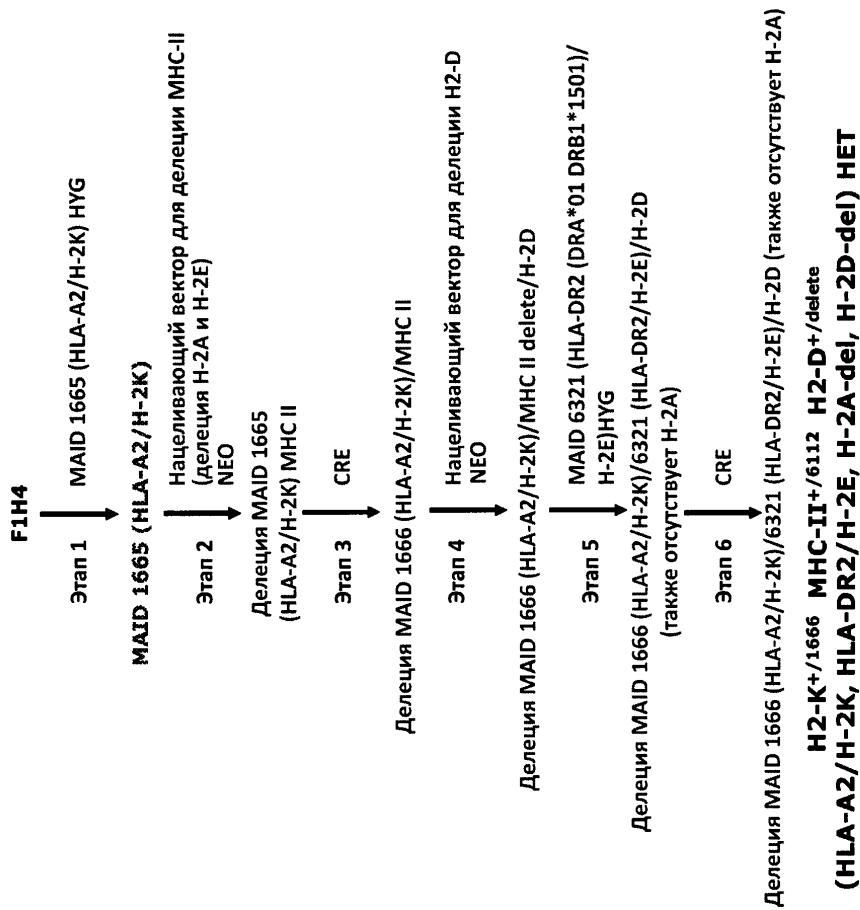
45

ФИГ. 1

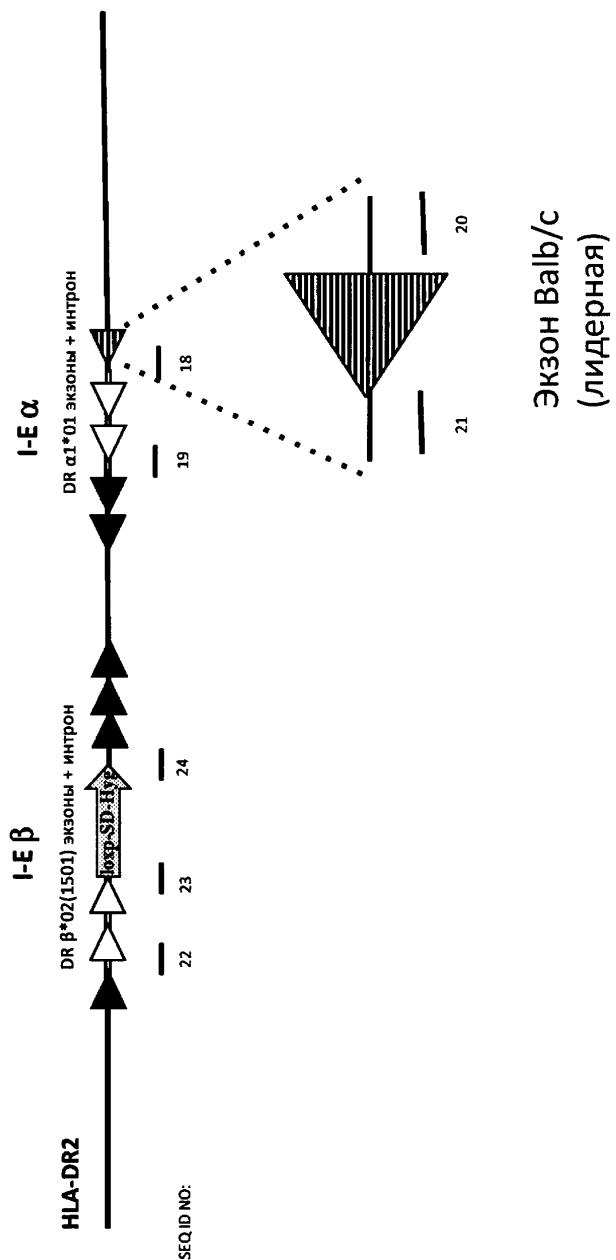


ФИГ. 2А Химерный локус HLA-A2/Н-2К**ФИГ. 2В** Химерный локус HLA-DR2/Н-2Е**ФИГ. 2С** Гуманизированный локус β2m

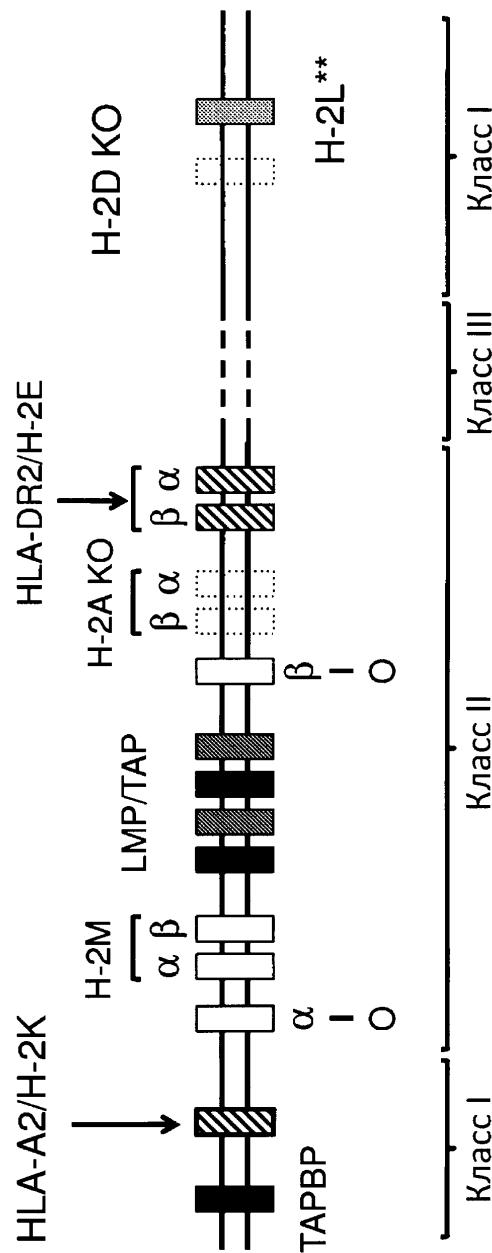
ФИГ. 3А



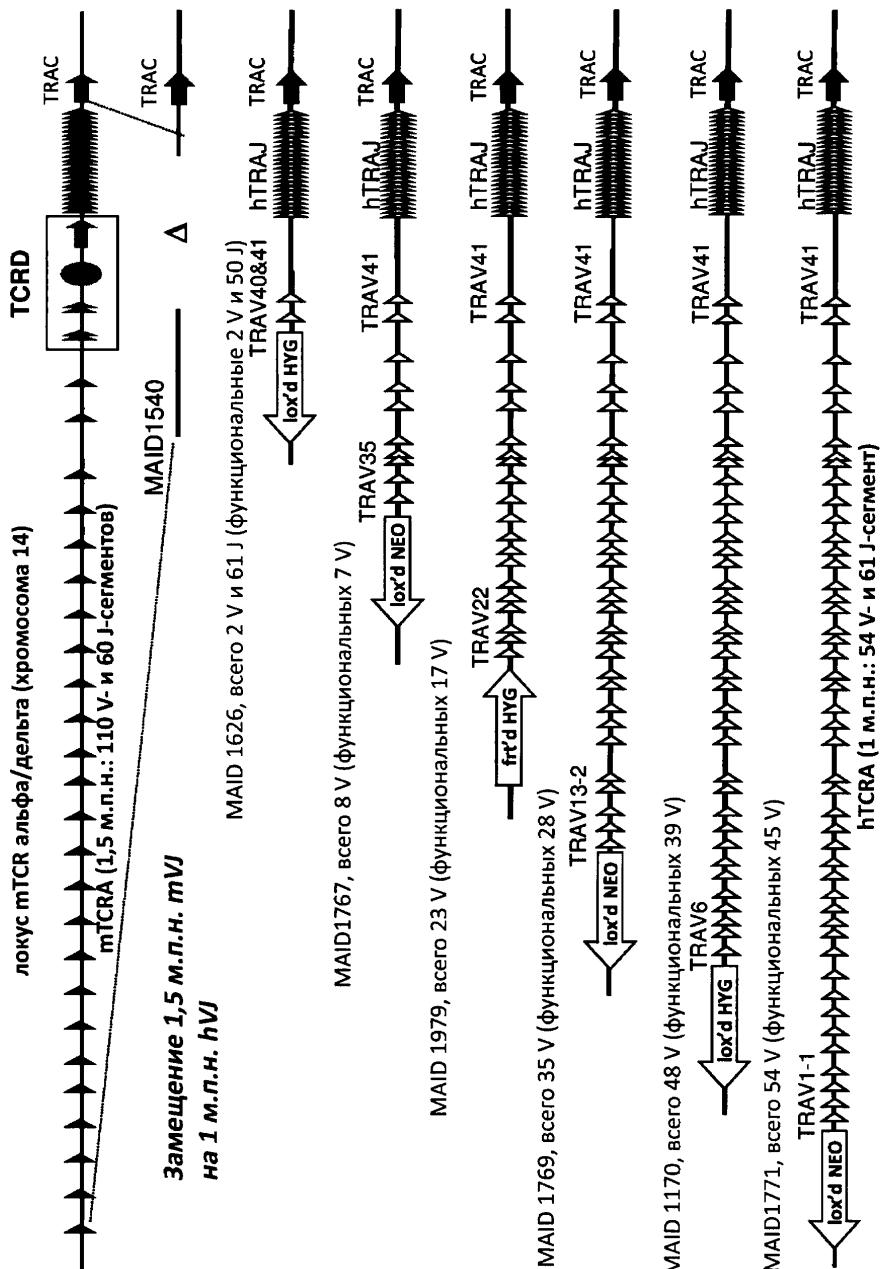
ФИГ. 3В



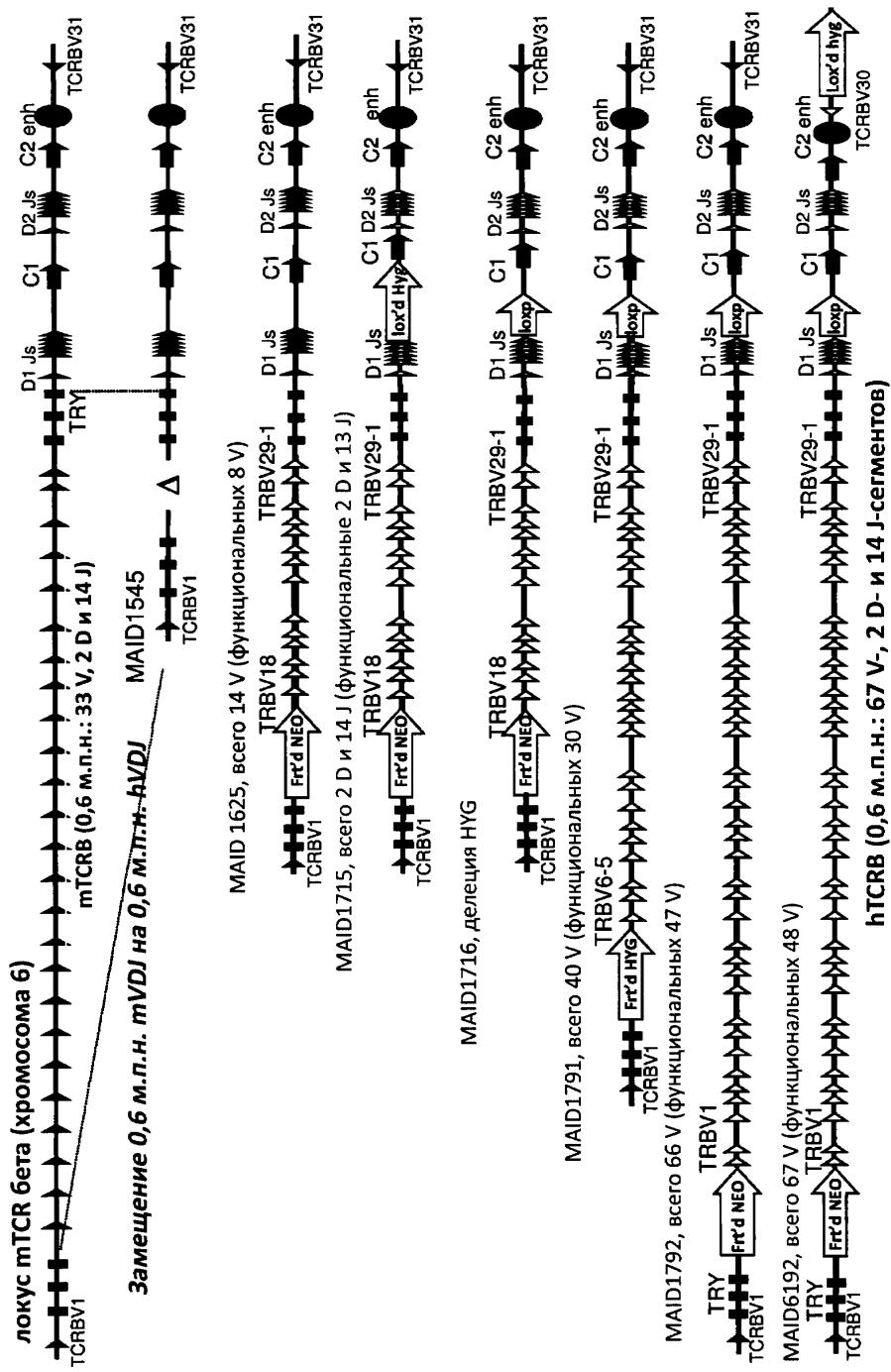
ФИГ. 3С



ФИГ. 4А

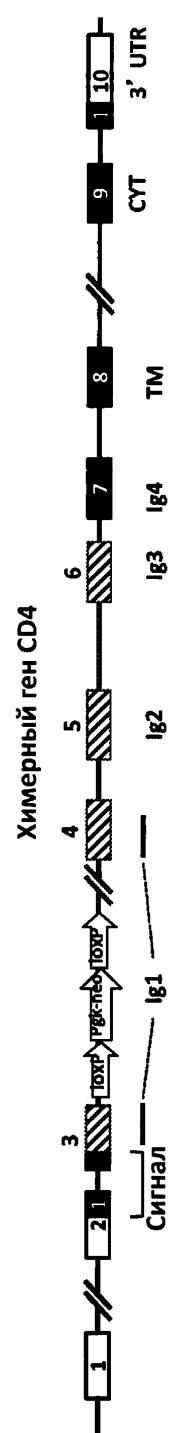


ФИГ. 4В

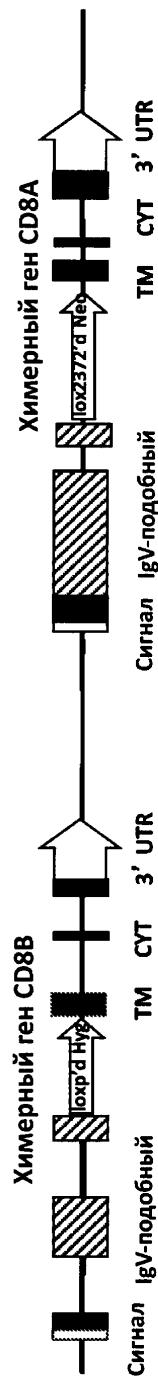


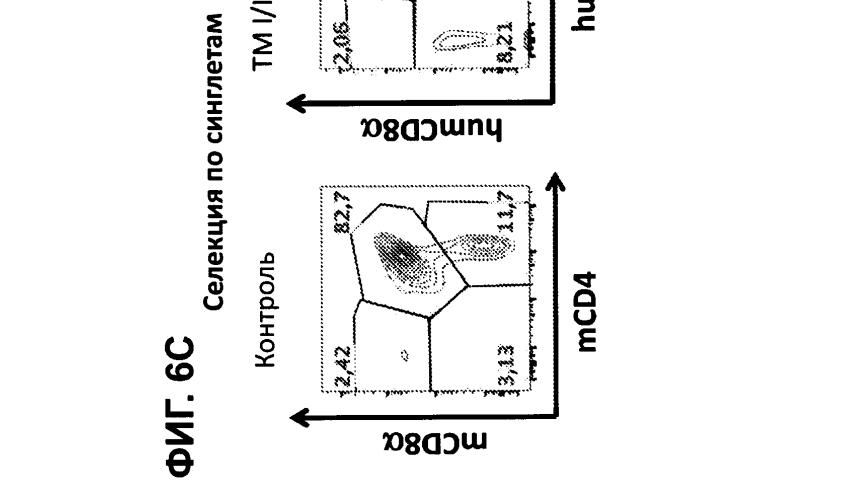
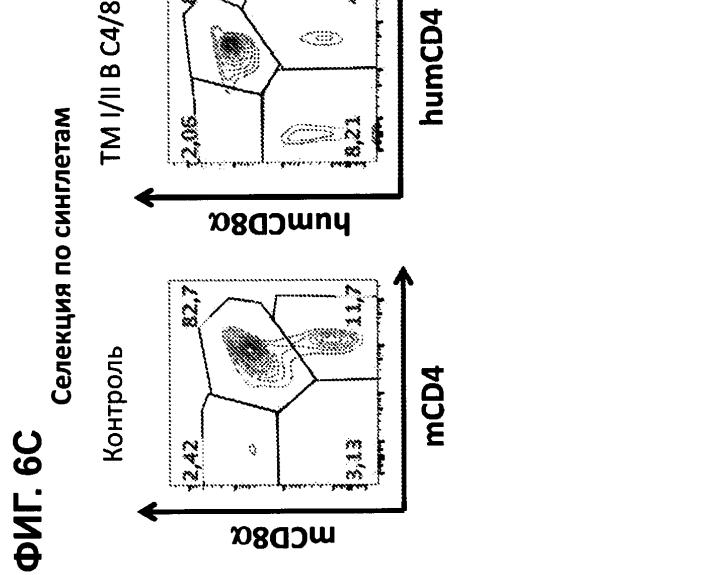
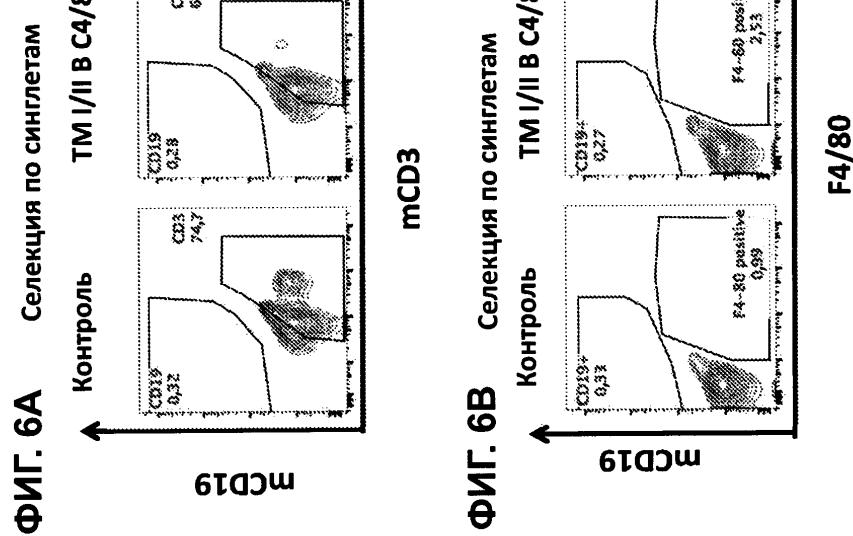
8/28

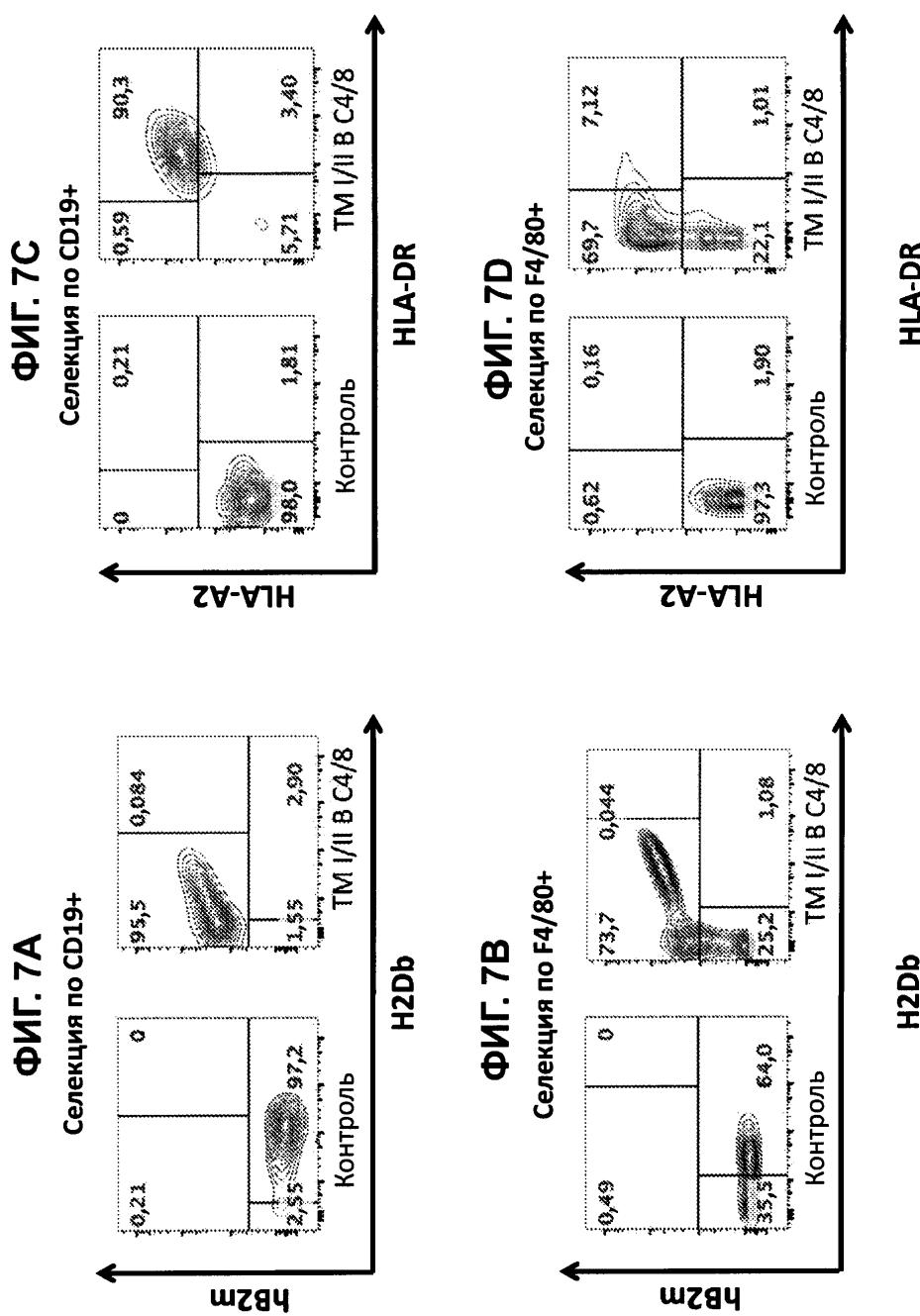
ФИГ. 5А

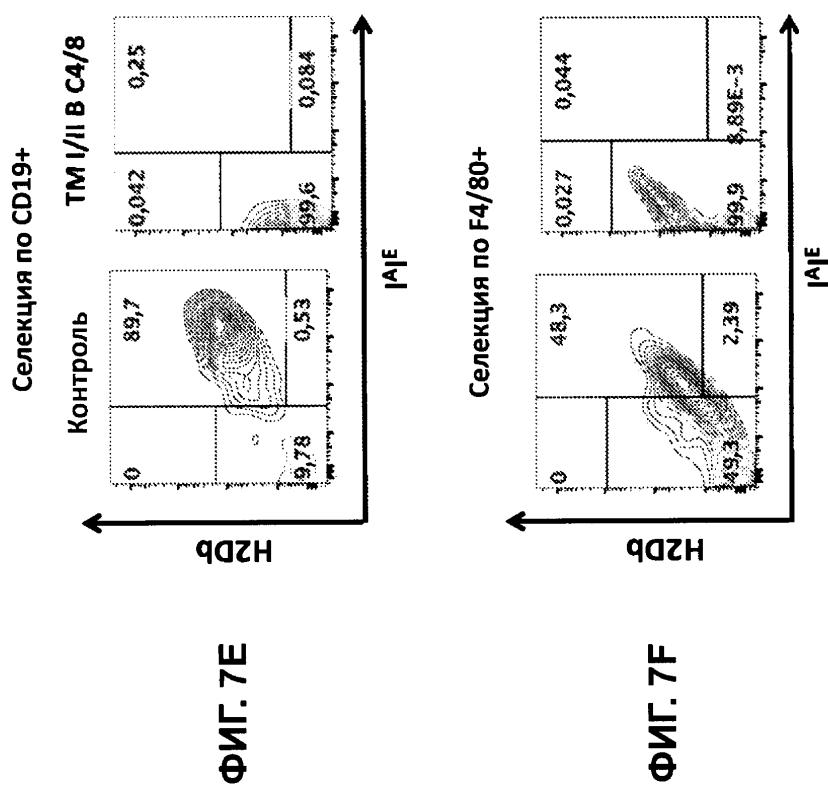


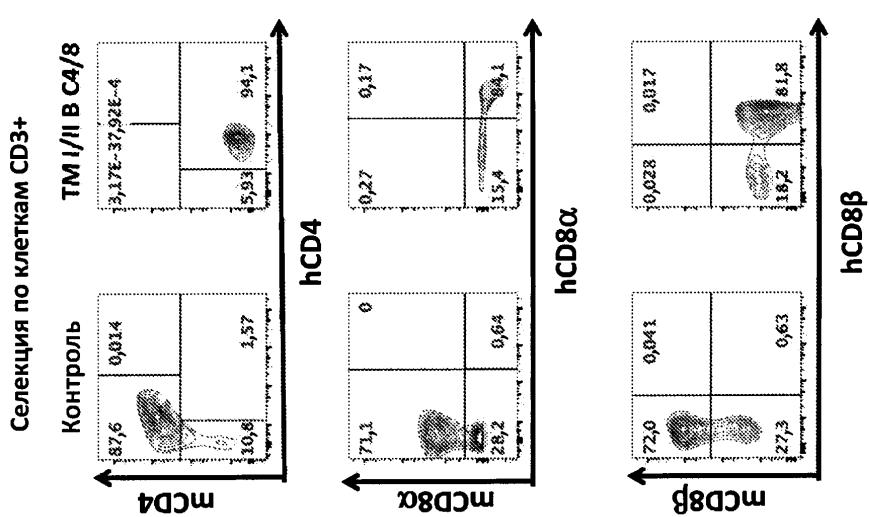
ФИГ. 5В





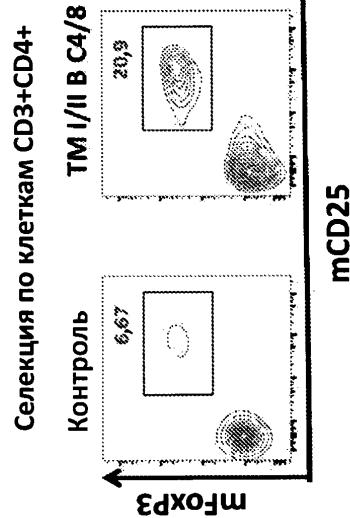


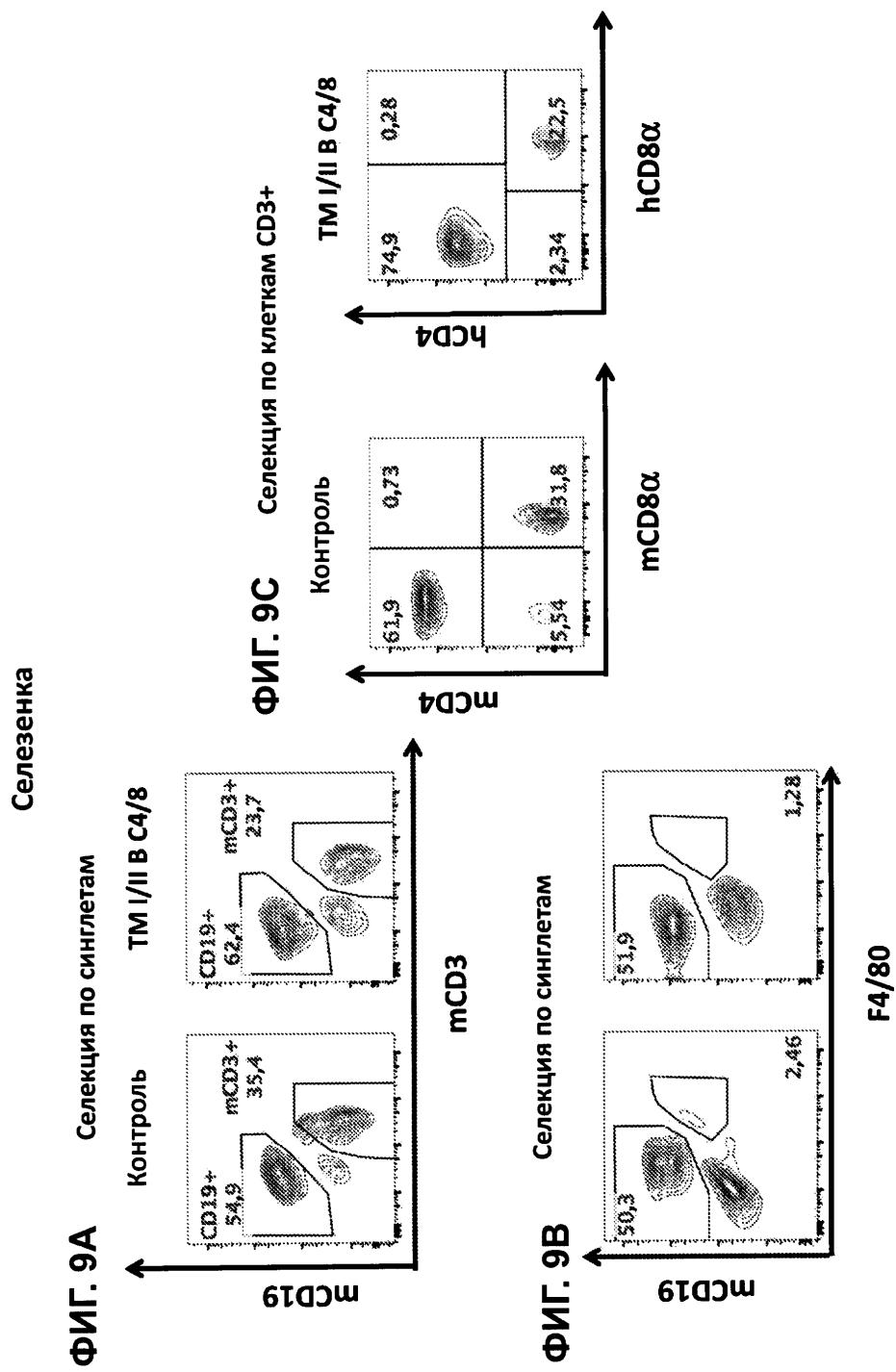


ФИГ. 7G

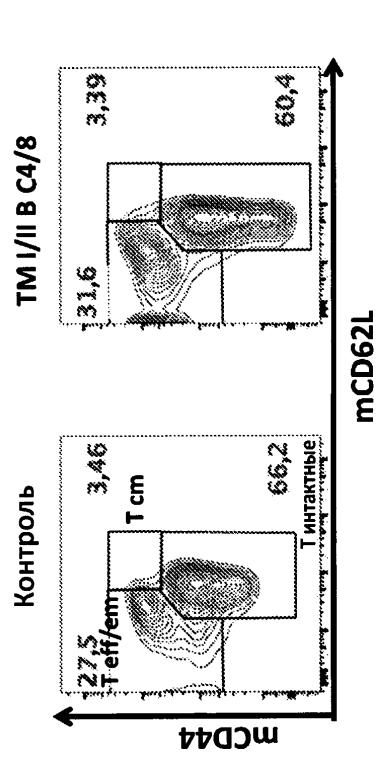
ФИГ. 8

Тимус

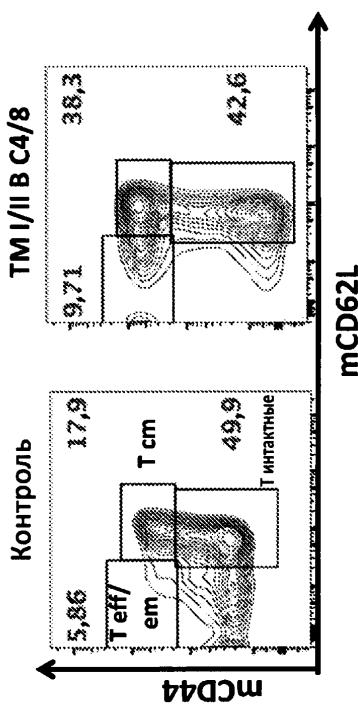




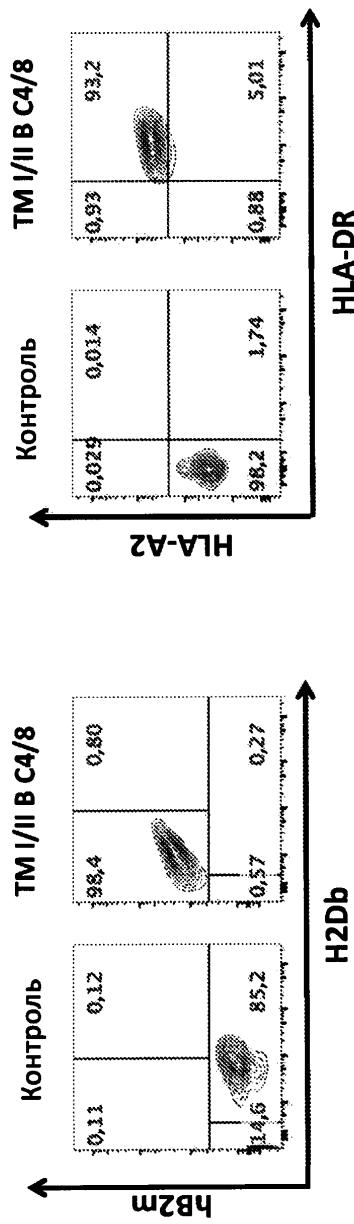
ФИГ. 9Д Селекция по Т-клеткам CD4+



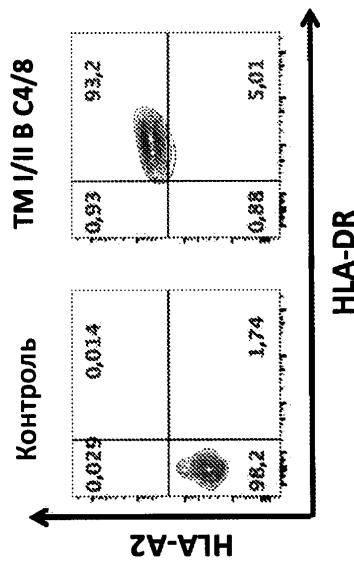
ФИГ. 9Е Селекция по Т-клеткам CD8+



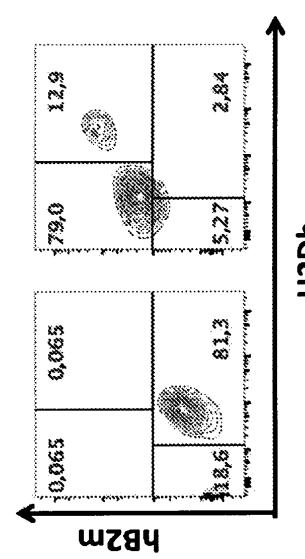
ФИГ. 10А Селекция по CD19+



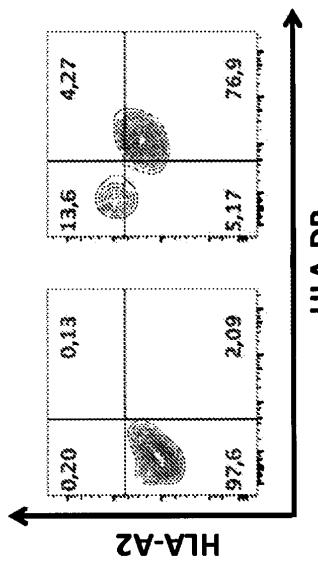
ФИГ. 10С Селекция по CD19+

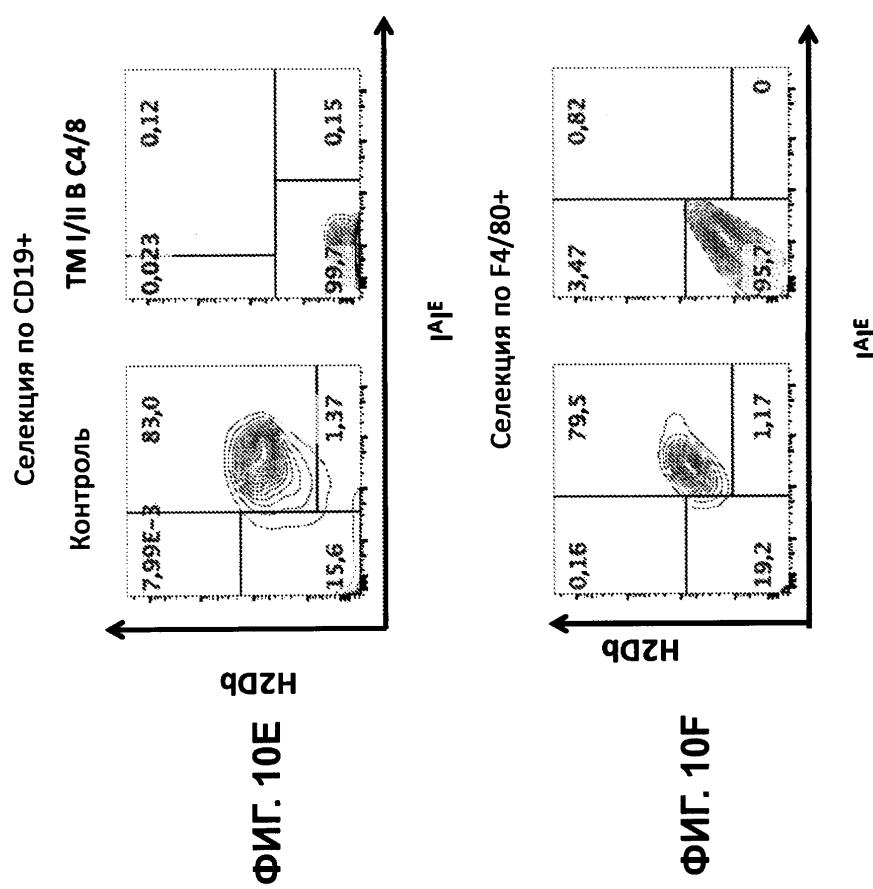


ФИГ. 10В Селекция по F4/80+

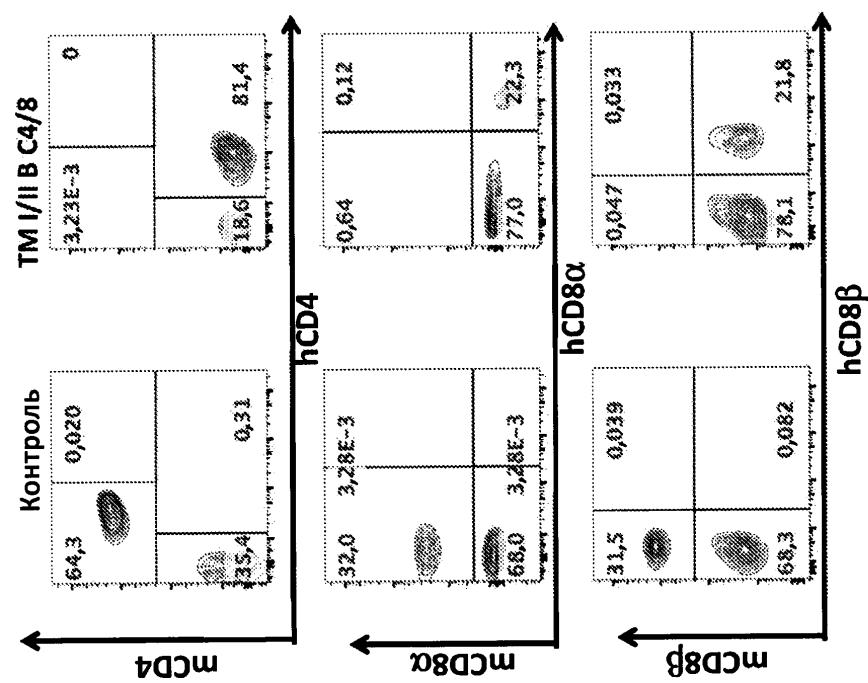


ФИГ. 10Д Селекция по F4/80+

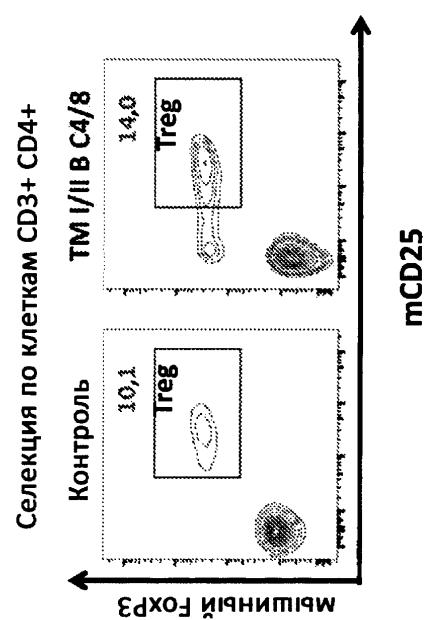




ФИГ. 10G
Селекция по клеткам CD3+

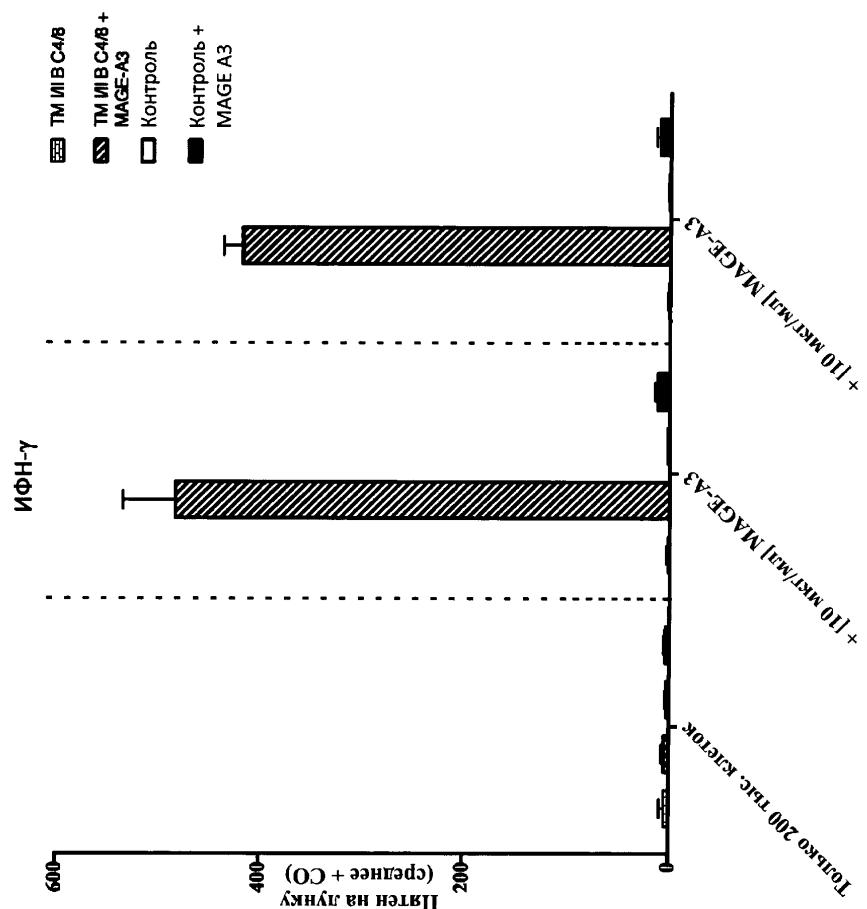


ФИГ. 11
Селезенка

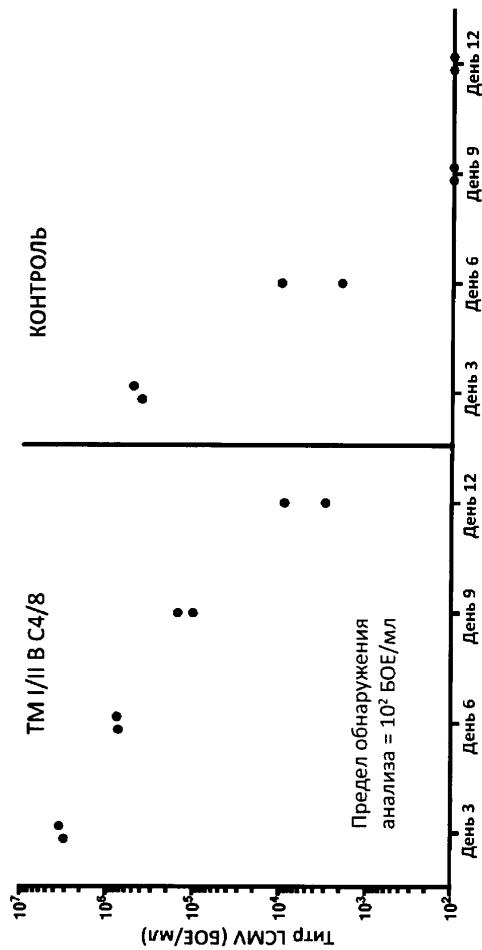
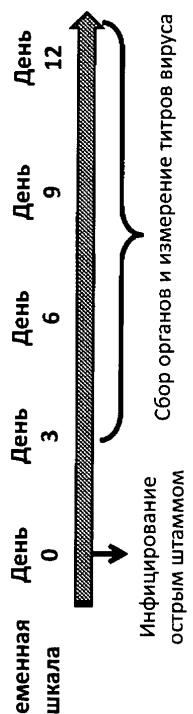


20/28

ФИГ. 12

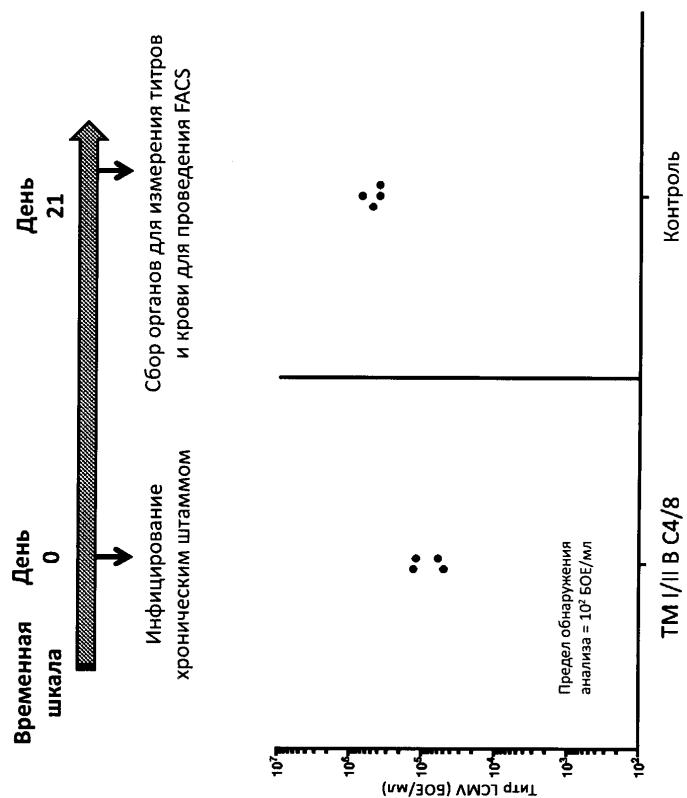


ФИГ. 13А
Инфекция Армстронга

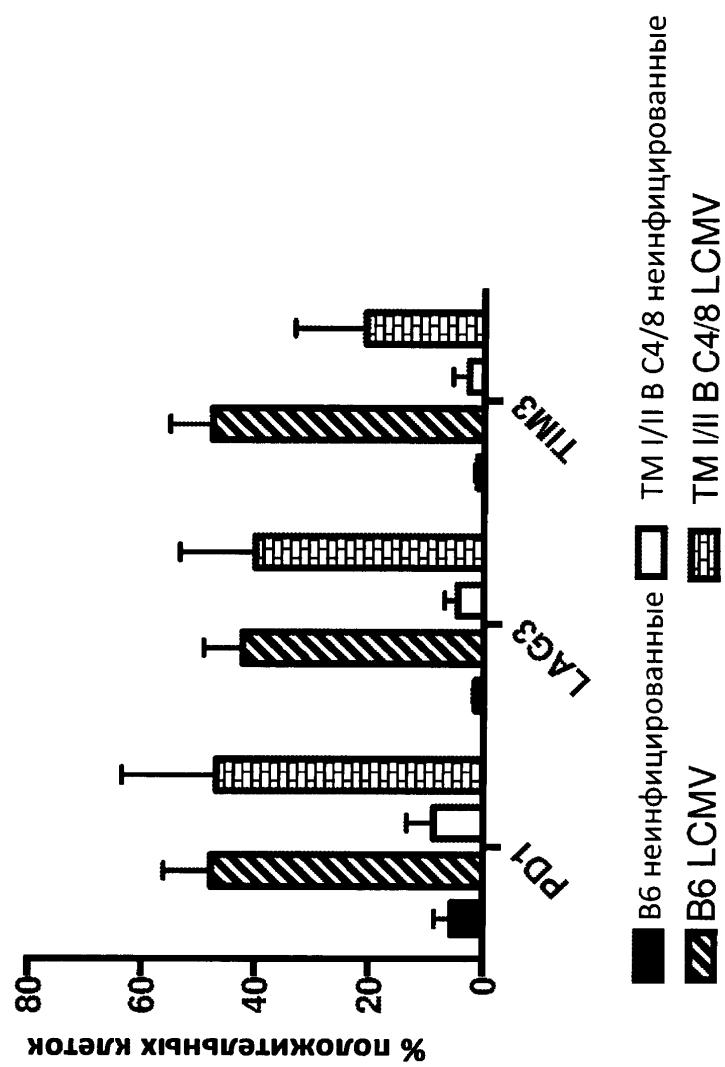


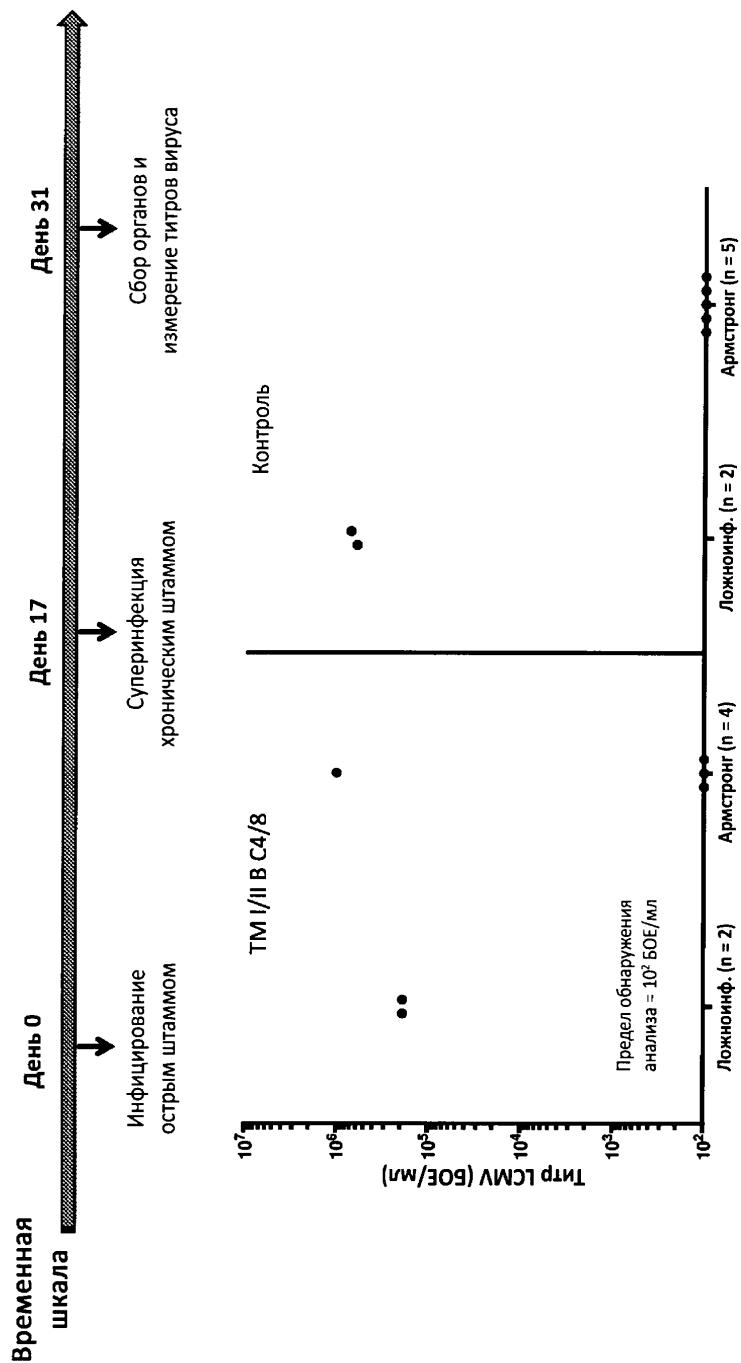
ФИГ. 13В

Инфекция Clone 13

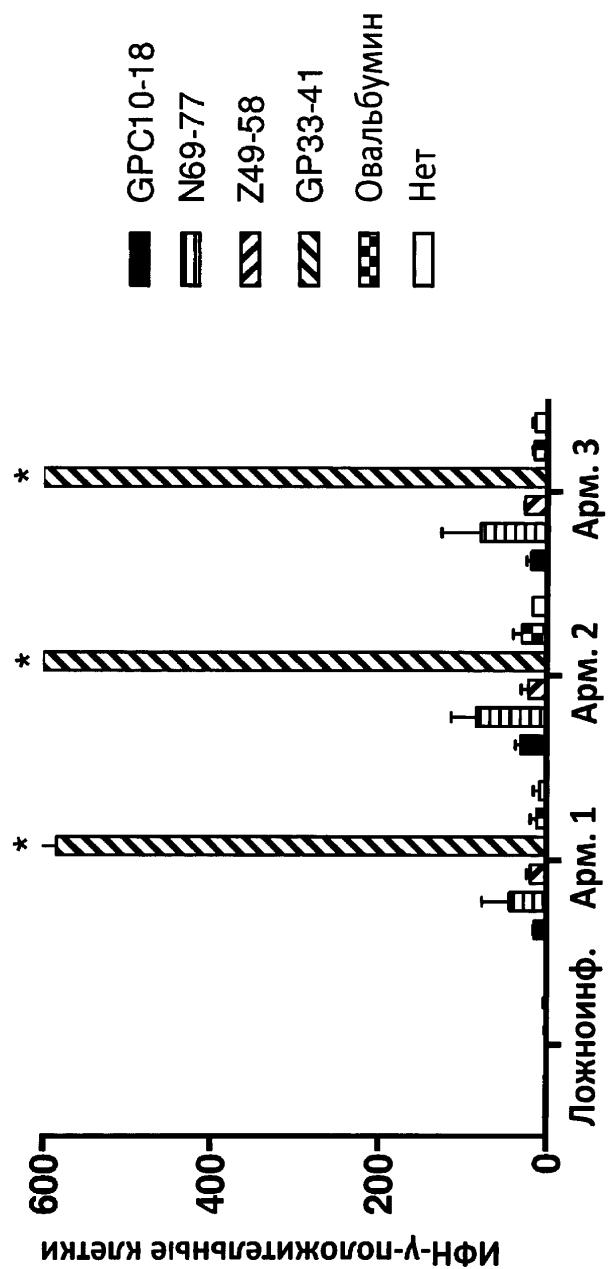


ФИГ. 13С



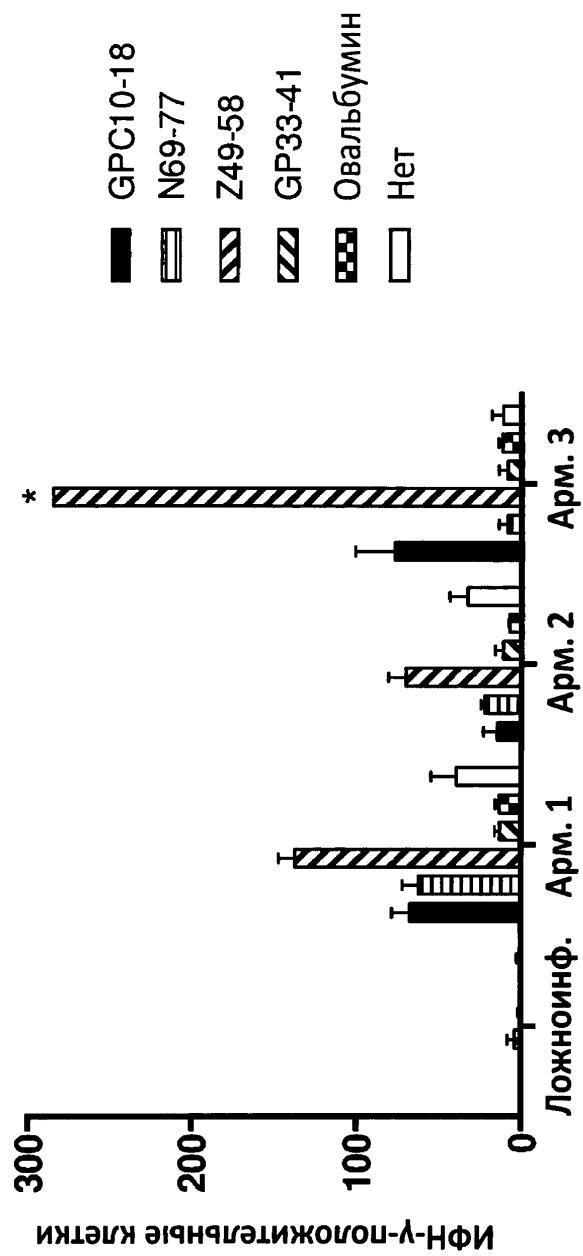
ФИГ. 14

ФИГ. 15А

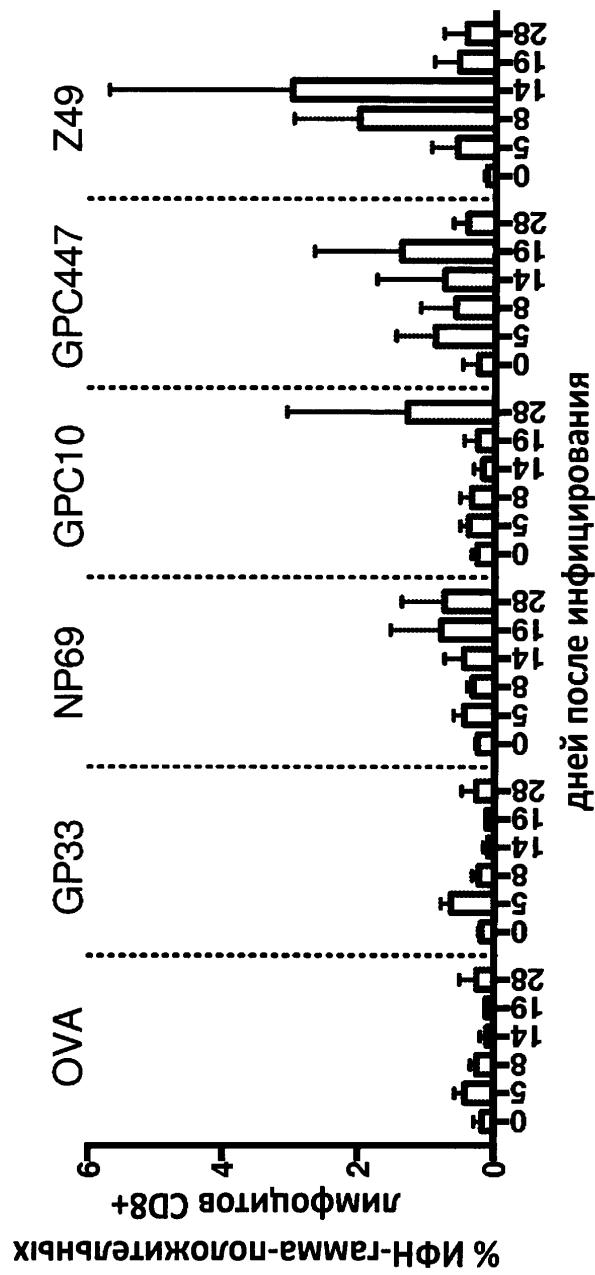


26/28

ФИГ. 15В



ФИГ. 15С
Мыши ТМ I/II в C4/8
% ИФН-гамма-положительных CD8



ФИГ. 15D

