



## (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)

(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 мышинных клеток,

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 2 7 3 2 2 6 2 8 C 2

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



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(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

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 (гуманизированных) Т-клеточных корецепторов (например, CD4 и/или CD8 (например,

20 CD8 $\alpha$  и/или CD8 $\beta$ )); (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  $\alpha$  и/или МНС II  $\beta$ ), и/или МНС I (например, МНС I  $\alpha$  и/или  $\beta$ 2-микроглобулин)); и/или (iii) человеческий (гуманизированный) Т-клеточный рецептор (TCR) (например, TCR $\alpha$  и/или TCR $\beta$ ); эмбрионам, тканям, клеткам и/или нуклеиновым кислотам, выделенным из не относящихся к человеку животных; способам получения не относящихся к человеку животных и способам использования не относящихся к человеку животных для разработки терапевтических средств для человека.

## ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

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-антиген, 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 задействие 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 в *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 переменные 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);

(b) внеклеточным доменом варибельного домена человеческого или гуманизированного TCR (например, варибельным доменом человеческого или гуманизированного TCR $\alpha$  и/или варибельным доменом человеческого или гуманизированного TCR $\beta$ , который соответственно кодируется по меньшей мере одним сегментом гена варибельного участка человеческого TCR $\alpha$  и/или TCR $\beta$ ); и/или

(с) внеклеточным доменом константного домена человеческого TCR; и

(ii) Т-клеточный рецептор (TCR), содержащий по меньшей мере варибельный 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 $\alpha$  и/или человеческий или гуманизированный CD8 $\beta$ ));

(В) 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  $\alpha$  и/или человеческим или гуманизированным МНС II  $\beta$ ), который связывается с человеческим или гуманизированным CD4 и/или человеческим или гуманизированным МНС I (например, человеческим или гуманизированным МНС I $\alpha$  и необязательно человеческим или гуманизированным  $\beta$ 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 вышеперечисленное. 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 $\alpha$  и гуманизированный полипептид

CD8 $\beta$  (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 $\alpha$ , и третью нуклеотидную последовательность, кодирующую химерный человеческий/нечеловеческий полипептид CD8 $\beta$ ),

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 $\alpha$  и нечеловеческого CD8 $\beta$ ,

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, переменные 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 $\alpha$  и человеческого CD8 $\beta$ , которые ответственны за взаимодействие с МНС I, переменные 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 переменный локус гена Т-клеточного рецептора (TCR)  $\alpha$ , содержащий по меньшей мере один человеческий сегмент V $\alpha$  и по меньшей мере один человеческий сегмент J $\alpha$ , функционально связанный с нечеловеческой константной последовательностью гена TCR $\alpha$ , и/или неперестроенный переменный локус гена TCR $\beta$ , 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 связанный с нечеловеческой константной последовательностью гена TCR $\beta$ ); 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 $\alpha$ , и вторую последовательность нуклеиновых кислот, кодирующую химерный человеческий/нечеловеческий полипептид МНС II $\beta$ , 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  $\alpha$  и МНС II  $\beta$ ) 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  $\alpha$ , содержащий  $\alpha 1$  и  $\alpha 2$  домены человеческого полипептида HLA класса II  $\alpha$  и трансмембранный и цитоплазматический домены нечеловеческого полипептида HLA класса II  $\alpha$ ; и (ii) химерный человеческий/нечеловеческий полипептид МНС II  $\beta$ , содержащий  $\beta 1$  и  $\beta 2$  домены человеческого полипептида HLA класса II  $\beta$  и трансмембранный и цитоплазматический домены нечеловеческого полипептида HLA класса II  $\beta$ , и/или в
- 10 котором гуманизированный комплекс МНС I содержит  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  и  $\alpha 3$  домены человеческого полипептида МНС I, и необязательно человеческий (гуманизированный)  $\beta 2$  микроглобулин.

В некоторых вариантах осуществления не относящееся к человеку животное содержит:

- 15 (А) гуманизированный корецептор CD4 и гуманизированный корецептор CD8, содержащие гуманизированный полипептид CD8 $\alpha$  или гуманизированный полипептид CD8 $\beta$  (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 $\alpha$ , и третью нуклеотидную последовательность, кодирующую химерный человеческий/нечеловеческий полипептид CD8 $\beta$ ),

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 $\alpha$  и нечеловеческого CD8 $\beta$ ,

- 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, переменные 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 $\alpha$  и человеческого CD8 $\beta$ , которые ответственны за взаимодействие с МНС I, переменные домены Т-клеточного рецептора, константные домены Т-клеточного рецептора или их комбинацию;

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

вариабельный локус гена TCR $\beta$ , 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 связанный с нечеловеческой константной последовательностью гена TCR $\beta$ ); 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 $\alpha$ , вторую последовательность нуклеиновых кислот, кодирующую химерный человеческий/нечеловеческий полипептид МНС II $\beta$ , и третью последовательность нуклеиновых кислот, кодирующую химерный человеческий/нечеловеческий полипептид МНС I),

- при этом каждый химерный полипептид МНС содержит по меньшей мере
- 15 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  $\alpha$  и МНС II  $\beta$ ) соответственно способен ассоциироваться с гуманизированным корецептором CD8 или гуманизированным корецептором CD4 и представлять пептид в случае HLA, например,
- 20 в котором гуманизированный комплекс МНС II содержит: (i) химерный человеческий/нечеловеческий полипептид МНС II  $\alpha$ , содержащий  $\alpha$ 1 и  $\alpha$ 2 домены человеческого полипептида HLA класса II  $\alpha$  и трансмембранный и цитоплазматический домены нечеловеческого полипептида HLA класса II  $\alpha$ ; и (ii) химерный человеческий/нечеловеческий полипептид МНС II  $\beta$ , содержащий  $\beta$ 1 и  $\beta$ 2 домены человеческого
- 25 полипептида HLA класса II  $\beta$  и трансмембранный и цитоплазматический домены нечеловеческого полипептида HLA класса II  $\beta$ ; и (iii) гуманизированный комплекс МНС I содержит  $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2 и  $\alpha$ 3 домены человеческого полипептида МНС I и необязательно человеческий (гуманизированный)  $\beta$ 2 микроглобулин (например, не относящееся к человеку животное дополнительно содержит локус  $\beta$ 2 микроглобулина, кодирующий
- 30 полипептид, содержащий аминокислотную последовательность человеческого  $\beta$ 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
- 35 последовательность, кодирующая химерный полипептид Т-клеточного корецептора CD8 $\alpha$ , находится в эндогенном локусе Т-клеточного корецептора CD8 $\alpha$ , а третья нуклеотидная последовательность, кодирующая химерный полипептид Т-клеточного корецептора CD8 $\beta$ , находится в эндогенном локусе Т-клеточного корецептора CD8 $\beta$ . Дополнительные варианты осуществления включают химерный человеческий/
- 40 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,
- 45 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 $\alpha$  и/или CD8 $\beta$ ), включая подобные человеческому иммуноглобулину V (IgV) домены  $\alpha$  и  $\beta$ . 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 $\alpha$  содержит внеклеточный домен (например, IgV-подобный домен) человеческого полипептида CD8 $\alpha$ , а нечеловеческий участок химерного полипептида CD8 $\alpha$  содержит трансмембранный и цитоплазматический домены нечеловеческого полипептида CD8 $\alpha$ ,

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

15 В некоторых вариантах осуществления первая последовательность нуклеиновых кислот, кодирующая человеческий (гуманизированный) МНС II  $\alpha$ , находится в эндогенном нечеловеческом локусе МНС II  $\alpha$ , вторая последовательность нуклеиновых кислот, кодирующая человеческий (гуманизированный) МНС II  $\beta$ , находится в эндогенном нечеловеческом локусе МНС II  $\beta$  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 $\alpha$  содержит внеклеточный участок (или его часть) человеческого полипептида МНС II $\alpha$  (например, полипептида HLA класса II $\alpha$ ), человеческий (гуманизированный) полипептид МНС II $\beta$  содержит внеклеточный участок

25 (или его часть) человеческого полипептида МНС II $\beta$  (например, полипептида HLA класса I $\beta$ ) 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  $\alpha$  содержит человеческие домены МНС II  $\alpha$ 1 и  $\alpha$ 2, гуманизированный

30 полипептид МНС II  $\beta$  содержит человеческие домены МНС II  $\beta$ 1 и  $\beta$ 2 и/или 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  $\alpha$ ,

35 экспрессируется под регуляторным контролем эндогенных нечеловеческих промоторных и регуляторных элементов МНС II  $\alpha$ , вторая последовательность нуклеиновых кислот, кодирующая химерный человеческий/нечеловеческий полипептид МНС II  $\beta$ ,

экспрессируется под регуляторным контролем эндогенных нечеловеческих промоторных и регуляторных элементов МНС II  $\beta$  и/или третья последовательность нуклеиновых

40 кислот, кодирующая химерный человеческий/нечеловеческий полипептид МНС I, экспрессируется под регуляторным контролем эндогенных нечеловеческих промоторных и регуляторных элементов МНС I. В дополнительных вариантах осуществления нечеловеческий участок химерного человеческого/нечеловеческого полипептида МНС II  $\alpha$  содержит трансмембранный и цитоплазматический домены эндогенного нечеловеческого полипептида МНС II  $\alpha$ , нечеловеческий участок химерного

45 человеческого/нечеловеческого полипептида МНС II  $\beta$  содержит трансмембранный и цитоплазматический домены эндогенного нечеловеческого полипептида МНС II  $\beta$  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  $\alpha$  содержит внеклеточный участок (или его часть) белка HLA-DR $\alpha$ , белка HLA-DQ  $\alpha$  или белка HLA-DP  $\alpha$ , химерный полипептид МНС II  $\beta$  содержит внеклеточный участок (или его часть) белка HLA-DR $\beta$ , белка HLA-DQ  $\beta$  или белка HLA-DP  $\beta$ , 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  $\alpha$ , содержит домены  $\alpha 1$  и  $\alpha 2$  цепи  $\alpha$  HLA-DR2, а человеческий участок человеческого/нечеловеческого полипептида МНС II  $\beta$  содержит домены  $\beta 1$  и  $\beta 2$  цепи  $\beta$  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  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  и  $\alpha 3$  человеческого полипептида HLA-A2, например домены  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  и  $\alpha 3$  человеческого полипептида HLA-A2.1. Также предложены не относящиеся к человеку животные, у которых нечеловеческие участки комплекса МНС II получены из мышинной кодирующей последовательности H-2E и/или у которых нечеловеческие участки полипептида МНС I получены из мышинной кодирующей последовательности H-2K. Например, химерный полипептид МНС II  $\alpha$  содержит трансмембранный и цитоплазматический домены мышинового полипептида H-2E  $\alpha$ , химерный полипептид МНС II  $\beta$  содержит трансмембранный и цитоплазматический домены мышинового полипептида H-2E  $\beta$ , а химерный полипептид МНС I содержит трансмембранный и цитоплазматический домены мышинового полипептида H-2K.

В некоторых вариантах осуществления неперестроенный варибельный локус гена TCR $\alpha$  находится в эндогенном варибельном локусе гена TCR $\alpha$ , а неперестроенный варибельный локус гена TCR $\beta$  находится в эндогенном варибельном локусе гена TCR $\beta$ . В некоторых аспектах неперестроенный варибельный локус гена TCR $\alpha$  содержит полный набор человеческих неперестроенных сегментов гена V $\alpha$  и полный набор человеческих неперестроенных сегментов гена J $\alpha$  и/или неперестроенный варибельный локус гена TCR $\beta$  содержит полный набор человеческих неперестроенных сегментов гена V $\beta$ , полный набор человеческих неперестроенных сегментов гена D $\beta$  и полный набор человеческих неперестроенных сегментов гена J $\beta$ . В некоторых вариантах осуществления человеческие неперестроенные сегменты гена V $\alpha$  и J $\alpha$  перестраиваются с образованием перестроенной человеческой последовательности V $\alpha$ /J $\alpha$  и/или человеческие неперестроенные сегменты гена V $\beta$ , D $\beta$  и J $\beta$  перестраиваются с образованием перестроенной человеческой последовательности V $\beta$ /D $\beta$ /J $\beta$ . В некоторых вариантах осуществления не относящееся к человеку животное, описанное в настоящем документе, экспрессирует Т-клеточный рецептор, содержащий человеческий варибельный участок TCR $\alpha$  и/или человеческий варибельный участок TCR $\beta$  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 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 $\alpha$ , (b) делецию всех или по существу всех функциональных эндогенных сегментов гена J $\alpha$ , (c) делецию всех или по существу всех функциональных эндогенных сегментов гена V $\beta$ , (d) делецию всех или по существу всех функциональных эндогенных сегментов гена D $\beta$ , (e) делецию всех или по существу всех функциональных эндогенных сегментов гена J $\beta$ , и/или (f) их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления в эндогенном нечеловеческом вариабельном локусе TCR $\alpha$  отсутствуют все или по существу все функциональные 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 $\beta$ , (b) отсутствуют все или по существу все функциональные эндогенные сегменты гена D $\beta$ , (c) отсутствуют все или по существу все функциональные эндогенные сегменты гена J $\beta$ , или (d) любая комбинация (a), (b) и (c).

В некоторых вариантах осуществления первая, вторая и/или третья нуклеотидная (-ые) последовательность (-и), соответственно кодирующая (-ие) полипептид (-ы) химерного Т-клеточного корцептора CD4, CD8 $\alpha$  и/или CD8 $\beta$ , находятся в эндогенных локусах Т-клеточного корцептора, например в эндогенных локусах корцептора CD4, CD8 $\alpha$  и/или CD8 $\beta$  соответственно; перестроенный вариабельный локус гена TCR $\alpha$  находится в эндогенном вариабельном локусе гена TCR $\alpha$ ; перестроенный 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  $\alpha$ , МНС II  $\beta$  и/или МНС I, находится (находятся) в эндогенных локусах МНС; например в локусах МНС II  $\alpha$ , МНС II  $\beta$  и/или МНС I соответственно. В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная (-ые) последовательность (-и), кодирующая (-ие) химерный (-ые) Т-клеточный (-ые) корцептор (-ы), перестроенный вариабельный локус гена TCR $\alpha$ , перестроенный вариабельный локус гена TCR $\beta$  и/или последовательность (-и) 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 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 $\beta$ ; перестроенный вариабельный локус гена TCR $\alpha$  может быть экспрессирован под регуляторным контролем эндогенных регуляторных и промоторных элементов TCR $\alpha$  (вариабельный участок), а перестроенный 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  $\alpha$ , вторая последовательность нуклеиновых кислот может быть экспрессирована под регуляторным контролем эндогенных нечеловеческих промоторных и регуляторных элементов МНС II  $\beta$ , 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) человеческого полипептида CD4, замещает последовательность, кодирующую внеклеточный участок (или его части, например D1, D2, D3 и/или D4) эндогенного нечеловеческого (мышинного) полипептида корецептора CD4, и может быть функционально связана с последовательностями, кодирующими трансмембранный и цитоплазматический домены эндогенного нечеловеческого (мышинного) CD4, в эндогенном нечеловеческом (мышинном) локусе корецептора CD4; нуклеотидная последовательность, кодирующая весь внеклеточный участок или часть внеклеточного участка человеческого полипептида CD8 $\alpha$ , замещает последовательность, кодирующую весь внеклеточный участок или часть внеклеточного участка эндогенного нечеловеческого (мышинного) полипептида Т-клеточного CD8 $\alpha$ , и может быть функционально связана с последовательностями, кодирующими трансмембранный и цитоплазматический домены эндогенного нечеловеческого (мышинного) CD8 $\alpha$ , в эндогенном нечеловеческом (мышинном) локусе CD8 $\alpha$ ; нуклеотидная последовательность, кодирующая весь внеклеточный домен или часть внеклеточного домена человеческого полипептида CD8 $\beta$ , замещает последовательность, кодирующую весь внеклеточный домен или часть внеклеточного домена эндогенного нечеловеческого (мышинного) полипептида Т-клеточного CD8 $\beta$ , и может быть функционально связана с последовательностями, кодирующими трансмембранный и цитоплазматический домены эндогенного нечеловеческого CD8 $\beta$ , в эндогенном локусе CD8 $\beta$ ; неперестроенный вариабельный локус гена TCR $\alpha$  замещает один или более эндогенных сегментов гена V $\alpha$  и/или J $\alpha$  в эндогенном нечеловеческом (мышинном) вариабельном локусе гена TCR $\alpha$ ; неперестроенный вариабельный локус гена TCR $\beta$  замещает один или более эндогенных сегментов гена V $\beta$ , D $\beta$  и/или J $\alpha$  в эндогенном нечеловеческом (мышинном) вариабельном локусе гена TCR $\beta$ ; последовательность нуклеиновых кислот, кодирующая внеклеточный участок (или его части, например домены  $\alpha$ 1 и  $\alpha$ 2) человеческого полипептида МНС II  $\alpha$ , замещает последовательность, кодирующую внеклеточный участок (или его части, например домены,  $\alpha$ 1 и  $\alpha$ 2) эндогенного нечеловеческого (мышинного) полипептида МНС II  $\alpha$ , и может быть функционально связана с последовательностями, кодирующими трансмембранный и цитоплазматический домены эндогенного нечеловеческого (мышинного) МНС II  $\alpha$ , в эндогенном нечеловеческом (мышинном) локусе МНС II  $\alpha$ ; последовательность нуклеиновых кислот, кодирующая внеклеточный участок (или его части, например домены  $\beta$ 1 и  $\beta$ 2) человеческого полипептида МНС II  $\beta$ , замещает последовательность, кодирующую внеклеточный участок (или его части, например домены  $\beta$ 1 и  $\beta$ 2) эндогенного нечеловеческого (мышинного) полипептида МНС II  $\beta$ , и может быть функционально связана с последовательностями, кодирующими трансмембранный и цитоплазматический домены эндогенного нечеловеческого (мышинного) МНС II  $\beta$ , в эндогенном нечеловеческом (мышинном) локусе МНС II  $\beta$ ; и/или последовательность нуклеиновых кислот, кодирующая внеклеточный участок (или его части, например домены  $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2 и/или  $\alpha$ 3) человеческого полипептида МНС I,

замещает последовательность, кодирующую внеклеточный участок (или его части, например домены,  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  и/или  $\alpha 3$ ) эндогенного нечеловеческого (мышинного) полипептида МНС I, и может быть функционально связана с последовательностями, кодирующими трансмембранный и цитоплазматический домены эндогенного нечеловеческого (мышинного) МНС I, в эндогенном нечеловеческом (мышинном) 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 TCR $\alpha$  из эндогенного вариабельного локуса TCR $\alpha$ , не экспрессируется функциональный вариабельный домен TCR $\beta$  из эндогенного вариабельного локуса TCR $\beta$ , 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  $\beta 2$ -микроглобулина, кодирующий полипептид, содержащий человеческую или гуманизированную аминокислотную последовательность  $\beta 2$ -микроглобулина, причем у не относящегося к человеку животного экспрессируется человеческий или гуманизированный полипептид  $\beta 2$ -микроглобулин. В некоторых вариантах осуществления не относящееся к человеку животное не экспрессирует функциональный эндогенный полипептид  $\beta 2$ -микроглобулин не относящегося к человеку животного из эндогенного нечеловеческого локуса  $\beta 2$ -микроглобулина. В некоторых вариантах осуществления локус  $\beta 2$ -микроглобулина функционально связан с эндогенными нечеловеческими регуляторными элементами  $\beta 2$ -микроглобулина. В одном варианте осуществления локус  $\beta 2$ -микроглобулина содержит нуклеотидную последовательность, представленную в экзоне 2, экзоне 3 и экзоне 4 (например, экзонах 2-4) человеческого гена  $\beta 2$ -микроглобулина, и необязательно локус  $\beta 2$ -микроглобулина дополнительно содержит нуклеотидную последовательность, представленную в экзоне 1 нечеловеческого (например, грызуна) гена  $\beta 2$ -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/мышинные полипептиды Т-клеточных корецепторов CD4, CD8 $\alpha$  и CD8 $\beta$ , каждый из которых соответственно содержит трансмембранный и цитоплазматический домены мышинного CD4, CD8 $\alpha$  и CD8 $\beta$ ; Т-клеточный рецептор, содержащий человеческий вариабельный участок TCR $\alpha$  и человеческий вариабельный участок TCR $\beta$  на поверхности Т-клетки; химерные человеческие/мышинные полипептиды МНС II $\alpha$ , МНС II $\beta$  и МНС I, каждый из которых соответственно содержит внеклеточные домены человеческого полипептида МНС II  $\alpha$  (например, домены  $\alpha 1$  и  $\alpha 2$  человеческого HLA класса II), МНС II  $\beta$  (домены  $\beta 1$  и  $\beta 2$  человеческого HLA класса II) и МНС I (например, домены  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  и  $\alpha 3$  человеческого HLA класса I); и необязательно человеческий или гуманизированный полипептид  $\beta 2$ -микроглобулин. В одном варианте осуществления в настоящем документе предложены не относящиеся к человеку животные, например мыши, у которых первая последовательность нуклеиновых кислот кодирует цепь  $\alpha$  химерного человеческого/

мышинного полипептида HLA-DR/H-2E, вторая последовательность нуклеиновых кислот кодирует цепь  $\beta$  химерного полипептида HLA-DR/H-2E, а третья последовательность нуклеиновых кислот кодирует химерный человеческий/мышинный 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 переменные 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 переменный домен TCR, который кодируется по меньшей мере одним человеческим сегментом гена  
20 переменного участка TCR; и (b) 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  
25 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,  
30 кодирующей второй химерный человеческий/нечеловеческий полипептид Т-клеточного корецептора (например, химерный полипептид CD8 $\alpha$ ), и третьей нуклеотидной последовательности, кодирующей третий химерный человеческий/нечеловеческий полипептид Т-клеточного корецептора (например, химерный полипептид CD8 $\beta$ ), причем нечеловеческий участок каждого химерного полипептида Т-клеточного корецептора  
35 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; (b) вставку в геном не  
40 относящегося к человеку животного неперестроенного переменного локуса гена Т-клеточного рецептора (TCR)  $\alpha$ , содержащего по меньшей мере один человеческий сегмент V $\alpha$  и по меньшей мере один человеческий сегмент J $\alpha$ , функционально связанный с нечеловеческой константной последовательностью гена TCR $\alpha$ , и/или неперестроенный переменный локус гена TCR $\beta$ , содержащий по меньшей мере один человеческий сегмент V $\beta$ , по меньшей мере один человеческий сегмент D $\beta$  и по меньшей мере один  
45 человеческий сегмент J $\beta$ , функционально связанный с нечеловеческой константной последовательностью гена TCR $\beta$ ; и необязательно (c) включение в геном первой последовательности нуклеиновых кислот, кодирующей первый химерный человеческий/нечеловеческий полипептид MHC (например, химерный полипептид MHC II $\alpha$ ), второй

последовательности нуклеиновых кислот, кодирующей второй химерный человеческий/нечеловеческий полипептид МНС (например, химерный полипептид МНС II $\beta$ ), 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  $\beta$ 2-микроглобулина, кодирующего человеческий или гуманизированный полипептид  $\beta$ 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 нечеловеческого корецептора CD4, вторая нуклеотидная последовательность кодирует внеклеточный участок (или его часть) человеческого CD8 $\alpha$  и по меньшей мере трансмембранный и цитоплазматический домены нечеловеческого CD8 $\alpha$ , третья нуклеотидная последовательность кодирует внеклеточный участок (или его часть) человеческого CD8 $\beta$  и по меньшей мере трансмембранный и цитоплазматический домены нечеловеческого CD8 $\beta$ , первая последовательность нуклеиновых кислот кодирует внеклеточный участок (или его часть) человеческого полипептида HLA класса II  $\alpha$  и по меньшей мере трансмембранный и цитоплазматический домены нечеловеческого полипептида МНС II  $\alpha$ , вторая последовательность нуклеиновых кислот кодирует внеклеточный участок (или его часть) человеческого полипептида HLA класса II  $\beta$  и по меньшей мере трансмембранный и цитоплазматический домены нечеловеческого полипептида МНС II  $\beta$ , третья последовательность нуклеиновых кислот кодирует внеклеточный участок (или его часть) человеческого полипептида HLA класса I и трансмембранный и цитоплазматический домены нечеловеческого полипептида МНС I, и локус  $\beta$ 2-микроглобулина содержит нуклеотидную последовательность, представленную в экзонах 2-4 человеческого гена  $\beta$ 2-микроглобулина, например нуклеотидную последовательность, представленную в экзонах 2, 3 и 4 человеческого гена  $\beta$ 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), кодирующей (-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 нечеловеческий полипептид CD4, нуклеотидной последовательностью, кодирующей химерный человеческий/нечеловеческий полипептид CD4, и/или замещение в эндогенном локусе CD8 $\alpha$  нуклеотидной последовательности, кодирующей эндогенный нечеловеческий полипептид CD8 $\alpha$ , нуклеотидной последовательностью, кодирующей химерный человеческий/нечеловеческий полипептид CD8 $\alpha$ , и замещение в эндогенном локусе CD8 $\beta$  нуклеотидной последовательности, кодирующей эндогенный нечеловеческий полипептид CD8 $\beta$ , нуклеотидной последовательностью, кодирующей химерный человеческий/нечеловеческий полипептид CD8 $\beta$ ; (b) вставка неперестроенного локуса TCR $\alpha$  и/или неперестроенного локуса TCR $\beta$  в геном животного включает замещение эндогенного нечеловеческого варибельного локуса гена TCR $\alpha$  неперестроенным гуманизированным варибельным локусом гена TCR $\alpha$ , содержащим по меньшей мере один человеческий сегмент V $\alpha$  и по меньшей мере один человеческий сегмент J $\alpha$ , для создания гуманизированного варибельного локуса гена TCR $\alpha$ , причем гуманизированный варибельный локус гена TCR $\alpha$  функционально связан с эндогенным нечеловеческим константным участком TCR $\alpha$ , и/или замещение эндогенного

нечеловеческого варибельного локуса гена TCR $\beta$  перестроенным гуманизированным варибельным локусом гена TCR $\beta$ , содержащим по меньшей мере один человеческий сегмент V $\beta$ , по меньшей мере один человеческий сегмент D $\beta$  и по меньшей мере один человеческий сегмент J $\beta$ , для создания гуманизованного варибельного локуса гена TCR $\beta$ , при этом гуманизированный варибельный локус гена TCR $\beta$  функционально связан с эндогенным нечеловеческим константным участком TCR $\beta$ ; (с) 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  $\beta$ 2-микроглобулина, кодирующего человеческий или гуманизированный полипептид  $\beta$ 2-микроглобулин, в геном не относящегося к человеку животного включает замещение в эндогенном нечеловеческом локусе  $\beta$ 2-микроглобулина нуклеотидной последовательности, кодирующей нечеловеческий полипептид  $\beta$ 2-микроглобулин, нуклеотидной последовательностью, кодирующей человеческий или гуманизированный полипептид  $\beta$ 2-микроглобулин.

В некоторых вариантах осуществления: (а) 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 $\alpha$  нуклеотидной последовательности, кодирующей внеклеточный участок (или его часть) эндогенного нечеловеческого полипептида CD8 $\alpha$ , нуклеотидной последовательностью, кодирующей внеклеточный участок (или его часть) человеческого полипептида CD8 $\alpha$ , в функциональной взаимосвязи с последовательностями, кодирующими трансмембранный и цитоплазматический домены эндогенного нечеловеческого CD8 $\alpha$ ; и/или (iii) замещение в эндогенном локусе CD8 $\beta$  нуклеотидной последовательности, кодирующей внеклеточный участок (или его часть) эндогенного нечеловеческого полипептида CD8 $\beta$ , нуклеотидной последовательностью, кодирующей внеклеточный участок (или его часть) человеческого полипептида CD8 $\beta$ , в функциональной взаимосвязи с последовательностями, кодирующими трансмембранный и цитоплазматический домены эндогенного нечеловеческого CD8 $\beta$ ; (b) вставка перестроенного локуса TCR $\alpha$  и/или перестроенного локуса TCR $\beta$  в геном животного соответственно включает: (i) замещение эндогенного нечеловеческого варибельного локуса гена TCR $\alpha$  перестроенным гуманизированным варибельным локусом гена TCR $\alpha$ , содержащим по меньшей мере один человеческий сегмент V $\alpha$  и по меньшей мере один человеческий сегмент J $\alpha$ , для создания гуманизованного варибельного локуса гена TCR $\alpha$ , причем гуманизированный варибельный локус гена TCR $\alpha$  функционально связан с эндогенным нечеловеческим константным участком TCR $\alpha$ ; и/или (ii) замещение эндогенного нечеловеческого варибельного локуса гена TCR $\beta$  перестроенным

гуманизированным вариабельным локусом гена TCR $\beta$ , содержащим по меньшей мере один человеческий сегмент V $\beta$ , по меньшей мере один человеческий сегмент D $\beta$  и по меньшей мере один человеческий сегмент J $\beta$ , для создания гуманизированного вариабельного локуса гена TCR $\beta$ , при этом гуманизированный вариабельный локус гена TCR $\beta$  функционально связан с эндогенным нечеловеческим константным участком TCR $\beta$ ; (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 MHC II  $\alpha$  нуклеотидной последовательности, кодирующей внеклеточный участок (или его часть) нечеловеческого полипептида MHC II  $\alpha$ , нуклеотидной последовательностью, кодирующей внеклеточный участок (или его часть) человеческого полипептида HLA класса II  $\alpha$ , в функциональной взаимосвязи с последовательностями, кодирующими трансмембранный и цитоплазматический домены эндогенного нечеловеческого MHC II  $\alpha$ ; (ii) замещение в эндогенном нечеловеческом локусе MHC II  $\beta$  нуклеотидной последовательности, кодирующей внеклеточный участок (или его часть) нечеловеческого полипептида MHC II  $\beta$ , нуклеотидной последовательностью, кодирующей внеклеточный участок (или его часть) человеческого полипептида HLA класса II  $\beta$ , в функциональной взаимосвязи с последовательностями, кодирующими трансмембранный и цитоплазматический домены эндогенного нечеловеческого MHC II  $\beta$ ; и/или (iii) замещение в эндогенном нечеловеческом локусе MHC I нуклеотидной последовательности, кодирующей внеклеточный участок (или его часть) нечеловеческого полипептида MHC 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 MHC I; и/или замещение в эндогенном локусе  $\beta$ 2-микроглобулина нуклеотидной последовательности, представленной в экзонах 2-4, нуклеотидной последовательностью, содержащей экзона 2, 3 и 4 человеческого гена  $\beta$ 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 $\alpha$  нуклеотидной последовательности, кодирующей эндогенный нечеловеческий полипептид CD8 $\alpha$ , нуклеотидной последовательностью, кодирующей химерный человеческий/нечеловеческий полипептид CD8 $\alpha$ , и замещение в эндогенном локусе CD8 $\beta$  нуклеотидной последовательности, кодирующей эндогенный нечеловеческий полипептид CD8 $\beta$ , нуклеотидной последовательностью, кодирующей химерный человеческий/нечеловеческий полипептид CD8 $\beta$ . В некоторых вариантах осуществления этап 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 $\alpha$  нуклеотидной последовательности, кодирующей внеклеточный участок (или его часть) эндогенного нечеловеческого

полипептида CD8 $\alpha$ , нуклеотидной последовательностью, кодирующей внеклеточный участок (или его часть) человеческого полипептида CD8 $\alpha$ , в функциональной взаимосвязи с последовательностями, кодирующими трансмембранный и цитоплазматический домены эндогенного нечеловеческого CD8 $\alpha$ , и замещение в  
 5 эндогенном локусе CD8 $\beta$  нуклеотидной последовательности, кодирующей внеклеточный участок (или его часть) эндогенного нечеловеческого полипептида CD8 $\beta$ , нуклеотидной последовательностью, кодирующей внеклеточный участок (или его часть) человеческого полипептида CD8 $\beta$ , в функциональной взаимосвязи с последовательностями, кодирующими трансмембранный и цитоплазматический домены эндогенного  
 10 нечеловеческого CD8 $\beta$ . 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 $\alpha$  перестроенным гуманизированным вариабельным локусом гена  
 15 TCR $\alpha$ , содержащим по меньшей мере один человеческий сегмент V $\alpha$  и по меньшей мере один человеческий сегмент J $\alpha$ , для создания гуманизированного вариабельного локуса гена TCR $\alpha$ , причем гуманизированный вариабельный локус гена TCR $\alpha$  функционально связан с эндогенным нечеловеческим константным участком TCR $\alpha$ ; замещение у четвертого не относящегося к человеку животного эндогенного нечеловеческого  
 20 вариабельного локуса гена TCR $\beta$  перестроенным гуманизированным вариабельным локусом гена TCR $\beta$ , содержащим по меньшей мере один человеческий сегмент V $\beta$ , по меньшей мере один человеческий сегмент D $\beta$  и по меньшей мере один человеческий сегмент J $\beta$ , для создания гуманизированного вариабельного локуса гена TCR $\beta$ , при этом гуманизированный вариабельный локус гена TCR $\beta$  функционально связан с  
 25 эндогенным нечеловеческим константным участком TCR $\beta$ . 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 MHC II одной или более нуклеотидных последовательностей,  
 30 кодирующих нечеловеческий комплекс MHC II, одной или более нуклеотидными последовательностями, кодирующими химерный человеческий/нечеловеческий комплекс MHC II; и замещение у пятого не относящегося к человеку животного в эндогенном нечеловеческом локусе MHC I нуклеотидной последовательности, кодирующей нечеловеческий полипептид MHC I, нуклеотидной последовательностью, кодирующей  
 35 химерный человеческий/нечеловеческий полипептид MHC I. В некоторых вариантах осуществления этап включения включает замещение у пятого не относящегося к человеку животного в эндогенном нечеловеческом локусе MHC II  $\alpha$  нуклеотидной последовательности, кодирующей внеклеточный участок (или его часть) нечеловеческого полипептида MHC II  $\alpha$ , нуклеотидной последовательностью, кодирующей внеклеточный  
 40 участок (или его часть) человеческого полипептида MHC II  $\alpha$  в функциональной взаимосвязи с последовательностями, кодирующими трансмембранный и цитоплазматический домены эндогенного нечеловеческого MHC II  $\alpha$ , и замещение в эндогенном нечеловеческом локусе MHC II  $\beta$  нуклеотидной последовательности, кодирующей внеклеточный участок (или его часть) нечеловеческого полипептида MHC  
 45 II  $\beta$ , нуклеотидной последовательностью, кодирующей внеклеточный участок (или его часть) человеческого полипептида MHC II  $\beta$ , в функциональной взаимосвязи с последовательностями, кодирующими трансмембранный и цитоплазматический домены эндогенного нечеловеческого MHC II  $\beta$ ; 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, 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 шестого не относящегося к человеку животного в эндогенном нечеловеческом локусе  $\beta 2$ -микроглобулина нуклеотидной последовательности, кодирующей нечеловеческий полипептид  $\beta 2$ -микроглобулин, нуклеотидной последовательностью, кодирующей человеческий или гуманизированный полипептид  $\beta 2$ -микроглобулин. В некоторых вариантах осуществления человеческий или гуманизированный полипептид  $\beta 2$ -микроглобулин кодируется нуклеотидной последовательностью, представленной в экзоне 2, экзоне 3 и экзоне 4 человеческого гена  $\beta 2$ -микроглобулина.

Способы, описанные в настоящем документе, включают варианты осуществления, в которых: внедряют первую, вторую и/или третью нуклеотидную (-ые) последовательность (-и), кодирующую (-ие) химерный (-е) полипептид (-ы) Т-клеточного корецептора; вставляют локус TCR $\alpha$  и/или неперестроенный локус TCR $\beta$ ; размещают первую, вторую и/или третью последовательность (-и) нуклеиновых кислот, кодирующую (-ие) химерный (-е) полипептид (-ы) МНС; и/или добавляют локус  $\beta 2$ -микроглобулина посредством скрещивания не относящегося к человеку животного, содержащего одну или более генетических модификаций, описанных в настоящем документе, с другим (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.

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 рецепторов CD4, CD8 $\alpha$  и/или CD8 $\beta$ , человеческие (гуманизированные) белки TCR  $\alpha/\beta$  и химерный комплекс МНС II и МНС I (с человеческим или гуманизированным  $\beta 2$ -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 отдельного не относящегося к человеку животного из таких ЭС-клеток, и последующего скрещивания каждого полученного не относящегося к человеку животного в любом порядке; (b) 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) 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 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 $\alpha$  и/или TCR $\beta$ , которые связываются с антигеном, и/или культивирование клетки, содержащей один или более 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 клонируют в пределах рамки считывания, например, с человеческим геном константного участка TCR, например геном константного участка TCR $\alpha$  и/или геном константного участка TCR $\beta$  соответственно. Также предложены ткани и клетки, содержащие генетические модификации, описанные в настоящем документе (которые могут включать перестроенные человеческие гены вариабельного участка TCR $\alpha$  и/или TCR $\beta$ ), и нуклеиновые кислоты, кодирующие такие человеческие вариабельные домены TCR, 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 человеческий перестроенный ген вариабельного участка TCR $\alpha$  или TCR $\beta$ , клонированный в пределах рамки считывания с соответствующим человеческим геном константного участка TCR, например геном константного участка TCR $\alpha$  или геном константного участка TCR $\beta$  соответственно; (2) клетки-хозяева, содержащие такие нуклеиновые кислоты (например, экспрессионные векторы); и (3) TCR, экспрессированные клетками-хозяевами. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантные нуклеиновые кислоты, предложенные в настоящем документе, содержат человеческий перестроенный ген вариабельного участка TCR $\delta$  или ген вариабельного участка TCR $\gamma$ , например, полученный из не относящегося к человеку животного, генетически модифицированного так, как описано в настоящем документе, или ткани, выделенной из него, клонированный в пределах рамки считывания с человеческим геном константного участка TCR $\delta$  или геном константного участка TCR $\gamma$  соответственно.

Также предложен способ создания гуманизированного Т-клеточного ответа у не относящегося к человеку животного, по существу включающий иммунизацию не 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 вариантах осуществления иммунизированное не относящееся к человеку животное экспрессирует по меньшей мере 50% всех функциональных человеческих сегментов гена TCRV $\alpha$  и/или по меньшей мере 50% всех функциональных человеческих сегментов гена TCRV $\beta$  и/или содержит все или по существу все функциональные человеческие

сегменты гена TCRV $\alpha$  и/или все или по существу все функциональные человеческие сегменты гена TCRV $\beta$ .

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 (b) инкубации с антигеном; причем первая клетка экспрессирует химерный человеческий/нечеловеческий Т-клеточный корецептор и одно или оба из: (i) химерной человеческой/нечеловеческой цепи  $\alpha$  TCR; и (ii) химерной человеческой/нечеловеческой цепи  $\beta$  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  $\alpha$  TCR и (ii) химерной человеческой/нечеловеческой цепи  $\beta$  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  $\beta$ 2М (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<sup>+1666</sup> МНС-II<sup>+6112</sup>), но в нем отсутствуют последовательность H2-D (H2-D<sup>+delete</sup>) и последовательность H-2A (метод генной инженерии также приводит к делеции H-2A, см. пример 1.2). Большие нацеливающие векторы (LTVEC) или конструктор 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 мышинные 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/мышинных 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 мышинные локусы H-2K и H-2E соответственно замещены химерными человеческими/мышинными 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 мышинные гены (сплошные фигуры, обведенные сплошными линиями).

На ФИГ. 4А показана (без соблюдения масштаба) последовательная стратегия гуманизации мышинного локуса TCR $\alpha$ , в которой сегменты гена варибельного участка TCR $\alpha$  последовательно добавляют ближе к 5'-концу от начальной гуманизации удаленного мышинного локуса (MAID 1540). Мышинная последовательность указана в виде закрашенных фигур, человеческая последовательность указана в виде полых фигур. MAID обозначает идентификационный номер модифицированной аллели. TRAV = сегмент V $\alpha$  TCR, TRAJ = сегмент J $\alpha$  TCR (hTRAJ = человеческий TRAJ), TRAC = домен C $\alpha$  TCR, TCRD = TCR $\delta$ . На ФИГ. 4В показана (без соблюдения масштаба) последовательная стратегия гуманизации мышинного локуса TCR $\beta$ , в которой сегменты гена варибельного участка TCR $\beta$  последовательно добавляют ближе к удаленному мышинному локусу TCR $\beta$ . Мышинная 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 $\beta$ .

На ФИГ. 5А представлено схематическое изображение (без соблюдения масштаба) химерного локуса CD4. Человеческие кодирующие экзоны представлены в виде заштрихованных фигур, мышинные кодирующие экзоны представлены в виде закрашенных фигур, а не кодирующие 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 (P<sub>gk</sub>-neo) кассета показана со стрелками,

отмеченными соответствующим образом. На ФИГ. 5В показано схематическое изображение (без соблюдения масштаба) химерных локусов CD8a и CD8b. Человеческие кодирующие экзоны представлены в виде заштрихованных фигур, мышинные кодирующие экзоны представлены в виде закрашенных фигур, а некодирующие экзоны 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 гомологи (Hug) и неомицинфосфотрансферазная (Pgk-neo) кассеты изображены со стрелками, показанными соответствующим образом.

На ФИГ. 6А-С представлены контурные графики FACS клеток тимуса, выделенных из контрольной мыши или мыши, содержащей гуманизированные локусы MHC I, MHC II  $\alpha$  и  $\beta$ , TCR $\alpha$  и  $\beta$ , CD4, CD8 $\alpha$  и  $\beta$ , а также  $\beta$ 2M (TM I/II В С4/8), сортированных по синглетам и меченных (ФИГ. 6А) антителами против мышинового CD19 и против мышинового CD3, (ФИГ. 6В) антителами против мышинового CD19 и против мышинового F4/80, или (ФИГ. 6С) антителами против мышинового CD8 $\alpha$  и против мышинового CD4 (левая таблица), или антителами против человеческого CD8 $\alpha$  и против человеческого CD4 (правая таблица).

На ФИГ. 7А-Г представлены контурные графики FACS клеток тимуса, выделенных из контрольной мыши или мыши, содержащей гуманизированные локусы MHC I, MHC II  $\alpha$  и  $\beta$ , TCR $\alpha$  и  $\beta$ , CD4, CD8 $\alpha$  и  $\beta$ , а также  $\beta$ 2M (TM I/II В С4/8), сортированных по клеткам CD19+, клеткам F4/80+ или клеткам CD3+ и меченных (ФИГ. 7А, 7В) антителами против человеческого B2M и против мышинового H-2D; (ФИГ. 7С, 7D) антителами против HLA-A2 или против HLA-DR; (ФИГ. 7Е, 7F) антителами против H-2D и против I<sup>A</sup>E; или (ФИГ. 7G) антителами против мышинового CD4 и против человеческого CD4 (сверху), антителами против мышинового CD8 $\alpha$  и против человеческого CD8 $\alpha$  (посередине) и антителами против мышинового CD8 $\beta$  и против человеческого CD8 $\beta$  (снизу).

На ФИГ. 8 изображены контурные графики FACS клеток тимуса, выделенных из контрольной мыши или мыши, содержащей гуманизированные локусы MHC I, MHC II  $\alpha$  и  $\beta$ , TCR $\alpha$  и  $\beta$ , CD4, CD8 $\alpha$  и  $\beta$ , а также  $\beta$ 2M (TM I/II В С4/8), сортированных по клеткам CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> и меченных антителами против мышинового FoxP3 и против мышинового CD25.

На ФИГ. 9А-Е изображены контурные графики FACS клеток селезенки, выделенных из контрольной мыши или мыши, содержащей гуманизированные локусы MHC I, MHC II  $\alpha$  и  $\beta$ , TCR $\alpha$  и  $\beta$ , CD4, CD8 $\alpha$  и  $\beta$ , а также  $\beta$ 2M (TM I/II В С4/8), сортированных по синглетам, клеткам CD3+, Т-клеткам CD4+ или Т-клеткам CD8+ и меченных (ФИГ. 9А) антителами против мышинового CD19 и против мышинового CD3, (ФИГ. 9В) антителами против мышинового CD19 и против мышинового F4/80, или (ФИГ. 9С) антителами против мышинового CD4 и против мышинового CD8 $\alpha$  (слева), или антителами против человеческого CD4 и против человеческого CD8 $\alpha$  (справа), или (ФИГ. 9D, 9E) антителами против мышинового CD44 и против мышинового CD62L.

На ФИГ. 10А-Г изображены контурные графики FACS клеток селезенки, выделенных из контрольной мыши или мыши, содержащей гуманизированные локусы MHC I, MHC II  $\alpha$  и  $\beta$ , TCR $\alpha$  и  $\beta$ , CD4, CD8 $\alpha$  и  $\beta$ , а также  $\beta$ 2M (TM I/II В С4/8), сортированных по клеткам CD19+, клеткам F4/80+ или клеткам CD3 и окрашенных (ФИГ. 10А, 10В) антителами против человеческого B2M или против мышинового H-2D, (ФИГ. 10С, 10D) антителами против HLA-A2 или против HLA-DR, (ФИГ. 10Е, 10F) антителами против H-2D и против I<sup>A</sup>E или (ФИГ. 10G) антителами против мышинового CD4 и против

человеческого CD4 (сверху), антителами против мышиногo CD8 $\alpha$  и против человеческого CD8 $\alpha$  (посередине) и антителами против мышиногo CD8 $\beta$  и против человеческого CD8 $\beta$  (снизу).

На ФИГ. 11 изображены контурные графики FACS клеток селезенки, выделенных из контрольной мыши или мыши, содержащей гуманизированные локусы MHC I, MHC II  $\alpha$  и  $\beta$ , TCR $\alpha$  и  $\beta$ , CD4, CD8 $\alpha$  и  $\beta$ , а также  $\beta$ 2M (TM I/II В C4/8), сортированных по клеткам CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> и меченных антителами против мышиногo FoxP3 и против мышиногo CD25.

На ФИГ. 12 показано число клеток селезенки (пятен на лунку (среднее + СО); ось у), которые продуцируют ИФН- $\gamma$  в анализе иммуноферментных пятен после выделения из контрольной мыши или мыши, содержащей гуманизированные локусы MHC I, MHC II  $\alpha$  и  $\beta$ , TCR $\alpha$  и  $\beta$ , CD4, CD8 $\alpha$  и  $\beta$ , а также  $\beta$ 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  $\alpha$  и  $\beta$ , TCR $\alpha$  и  $\beta$ , CD4, CD8 $\alpha$  и  $\beta$ , а также  $\beta$ 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  $\alpha$  и  $\beta$ , TCR $\alpha$  и  $\beta$ , CD4, CD8 $\alpha$  и  $\beta$ , а также  $\beta$ 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<sup>+</sup> (ось у; ИФН- $\gamma$ -положительные клетки), которые продуцировали ИФН- $\gamma$  в ответ на введение пептидов LCMV, рестриктированных по HLA-A2 (GPC10-18; N69-77; Z49-58), рестриктированных по H2D<sup>b</sup> (GP33-41), овалбумина или только инкубацию, и были выделены либо из контрольных животных (ФИГ. 15А), либо из мышей, содержащих гуманизированные локусы MHC I, MHC II  $\alpha$  и  $\beta$ , TCR $\alpha$  и  $\beta$ , CD4, CD8 $\alpha$  и  $\beta$ , а также  $\beta$ 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<sup>+</sup> ИФН- $\gamma$ <sup>+</sup> (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  $\alpha$  и  $\beta$ , TCR $\alpha$  и  $\beta$ , CD4, CD8 $\alpha$  и  $\beta$ , а также  $\beta$ 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 экспрессирующие гуманизированный Т-клеточный корецептор (например, гуманизированный CD4 и/или CD8 (например, CD8 $\alpha$  и/или CD8 $\beta$ )), человеческий или гуманизированный главный комплекс гистосовместимости (МНС), который связывается с гуманизированным Т-клеточным корецептором (например, человеческий или гуманизированный МНС II (например, цепи МНС II  $\alpha$  и/или МНС II  $\beta$ ) и/или МНС I (например, МНС I $\alpha$ ), и необязательно человеческий или гуманизированный  $\beta$ 2-микроглобулин), и/или человеческий или гуманизированный Т-клеточный рецептор (TCR), а также эмбрионы, ткани и клетки, экспрессирующие вышеперечисленное.

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 ( $\alpha$  и  $\beta$ ) и химерную человеческую/мышиную молекулу МНС I, см., например, Li (2010) Nature Medicine 16:1029-1035 и вспомогательные материалы. Такие животные демонстрировали 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/мышинной молекулой МНС I, там же. Соответственно, в настоящем документе предложены не относящиеся к человеку животные, созданные таким образом, чтобы совместно экспрессировать 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 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 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 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, и/или человеческий или гуманизированный Т-клеточный рецептор (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 животного. В предпочтительных вариантах осуществления при иммунизации антигеном не относящиеся к человеку животные представляют рестриктированные по HLA эпитопы антигена TCR, полученные из человеческих сегментов гена TCR, например человеческого сегмента V TCR $\alpha$ , человеческого сегмента J TCR $\alpha$ , человеческого сегмента V TCR $\beta$ , человеческого сегмента D TCR $\beta$  и/или человеческого сегмента J TCR $\beta$ .

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 замены в аминокислотной (-ых) последовательности (-ях), описанной (-ых) в настоящем документе, и/или последовательность нуклеиновых 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) 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 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 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 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 цистеин и метионин. Группы 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 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, кодирующим гуманизированные полипептиды Т-клеточного корцептора, гуманизированные полипептиды МНС и/или вариабельные участки TCR, другие нуклеиновые 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 корцептора (например, полипептид CD4 или CD8), перестроенный вариабельный локус гена Т-клеточного рецептора (например, TCR $\alpha$  и/или TCR $\beta$ ), содержащий человеческие перестроенные сегменты гена, и/или последовательность нуклеиновых 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 нуклеотидная последовательность, кодирующая гуманизированный полипептид Т-клеточного рецептора (например, полипептид CD4 или CD8), перестроенный вариабельный локус гена Т-клеточного рецептора (например, TCR $\alpha$  и/или TCR $\beta$ ), содержащий человеческие перестроенные сегменты гена, и/или последовательность нуклеиновых кислот, кодирующая гуманизированный полипептид МНС, способный 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 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., 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 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 человеческого/мышинного белка с человеческим эктодомом 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% 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 конструктор



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 мышинных полипептидов CD4 или CD8 (CD8 $\alpha$  и/или CD8 $\beta$ ), были замещены нуклеотидными последовательностями, кодирующими участки человеческих полипептидов CD4 или CD8 (CD8 $\alpha$  и/или CD8 $\beta$ ) соответственно.

Термин «функциональный» в контексте настоящего документа, например по 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 $\alpha$  и/или CD8 $\beta$ . 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 $\alpha$  и человеческого или гуманизированного полипептида CD8 $\beta$ . 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 $\alpha$  и/или CD8 $\beta$ ).

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 $\alpha$ , и вторую нуклеотидную последовательность, кодирующую человеческий или гуманизированный полипептид CD8 $\beta$ . 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 $\alpha$  и CD8 $\beta$ , 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 варибельным (V) доменом иммуноглобулина, и считается, что он вместе с частью домена D2 связывается (ассоциируется) с МНС II, например, в сайте 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  $\alpha$  2 и  $\beta$  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 корцептора 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 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 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 корцепторов и TCR с тем же МНС приводит к увеличению фосфорилирования тирозина CD3 и цепи  $\zeta$  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 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.

Корцептор CD4 является основным рецептором для вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), а истощение численности Т-клеток CD4+ является индикатором прогрессирования заболевания. Цитоплазматический хвост CD4 является необходимым 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.

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 рестриктированный по МНС I TCR, дифференцируются в Т-клетки CD8+, а тимоциты DP, которые принимают сигналы через рестриктированный 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 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, 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 мышинного 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, 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. (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). Таким образом, в одном варианте осуществления может иметь преимущество создание генетически модифицированного животного, которое сохраняет эндогенный мышинный 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 генетически модифицированное не относящееся к человеку животное, содержащее, например, в своем эндогенном локусе Т-клеточного корцептора (например, локусе CD4) нуклеотидную последовательность, кодирующую химерный человеческий/нечеловеческий полипептид Т-клеточного корцептора. В одном варианте осуществления человеческий участок химерного полипептида содержит весь или по существу весь внеклеточный участок (или его часть, например один или более внеклеточных доменов, например по меньшей мере два последовательных внеклеточных домена) человеческого Т-клеточного корцептора. В одном варианте осуществления нечеловеческий участок химерного полипептида содержит трансмембранный и цитоплазматический домены нечеловеческого Т-клеточного корцептора. В одном варианте осуществления у не относящегося к человеку животного экспрессируется функциональный химерный полипептид Т-клеточного корцептора. 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 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 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 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 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 варибельным доменом Т-клеточного рецептора. Таким образом, в одном 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 (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 участок химерного полипептида CD4, содержит кодирующую последовательность доменов D1-D4 человеческого гена CD4. В другом варианте осуществления нуклеотидная последовательность может содержать нуклеотидную последовательность, кодирующую мышинный сигнальный пептид CD4, например область, кодируемую участками экзонов 2-3 мышинного гена. В другом варианте осуществления нуклеотидная последовательность 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 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 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 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 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, выполняемыми цитоплазматическим доменом CD4, сохранение эндогенной нечеловеческой (например, мышинной) последовательности у созданных методами генной инженерии животных обеспечивает сохранение правильной внутриклеточной сигнализации и других функций корцептора. В одном варианте осуществления не относящееся к человеку животное представляет собой мышь, а нечеловеческий полипептид CD4 представляет собой мышинный полипептид CD4. Хотя в примерах описана конкретная мышинная 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 корцептора 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 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 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 нечеловеческого CD4), человеческой нуклеотидной последовательностью, кодирующей вышеперечисленное. 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 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, 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/мышинного локуса CD4), описанного в настоящем документе. В одном аспекте в связи с тем, что химерная человеческая/нечеловеческая (например, человека/грызуна, например человеческая/мышинная) последовательность CD4 размещена в эндогенном нечеловеческом (например, грызуна, например мышинном) 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 мышинном) 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 интроне 1 нечеловеческого (например, мышинного) гена CD4. Таким образом, в одном варианте осуществления химерный локус сохраняет эндогенные нечеловеческие (например, грызуна, например мышинные) 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 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 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 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 относящегося к человеку животного экспрессируется химерный белок CD4 на клеточной поверхности с таким же клеточным распределением, которое наблюдается у человека. В одном аспекте белок CD4 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 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 $\alpha$ , и/или нуклеотидную последовательность, кодирующую человеческий или гуманизированный полипептид CD8 $\beta$ . Таким образом, генетически модифицированное не относящееся к человеку животное изобретения экспрессирует человеческий или гуманизированный полипептид CD8 $\alpha$  и/или человеческий или гуманизированный полипептид CD8 $\beta$ .

Человеческий белок CD8, как правило, экспрессируется на клеточной поверхности в виде гетеродимера, состоящего из двух полипептидов (CD8 $\alpha$  и CD8 $\beta$ ), хотя также были обнаружены связанные дисульфидными мостиками гомодимеры и гомомультимеры (например, в НК-клетках и кишечных  $\gamma\delta$  Т-клетках, которые экспрессируют CD8 $\alpha$ ). Гены, кодирующие человеческий CD8 $\alpha$  и CD8 $\beta$ , расположены в непосредственной близости друг от друга на хромосоме 2. Nakayama et al. (1992) Recent Duplication of the Two Human CD8  $\beta$ -chain genes, *J. Immunol.* 148:1919-27. Белок CD8 $\alpha$  содержит лидерный 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 $\alpha$ . Characterization of the Human CD8 $\alpha$  gene, *J. Immunol.* 142:3312-19. Экзоны/интроны гена CD8 $\alpha$  схематически показаны на ФИГ. 5В.

Человеческий ген CD8 $\beta$  находится ближе к 5'-концу от гена CD8 $\alpha$  на хромосоме 2. Описано множество изоформ, полученных путем альтернативного сплайсинга гена CD8 $\beta$ , причем предположительно одна изоформа не содержит трансмембранный домен и продуцирует секретируемый 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 $\beta$  также схематически показаны на ФИГ. 5В.

Мембраносвязанный белок CD8 $\beta$  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, 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.

Белок CD8, как правило, экспрессируется на цитотоксических Т-клетках и взаимодействует с молекулами МНС I. Взаимодействие опосредуется через связывание CD8 с доменом  $\alpha_3$  МНС I. Хотя связывание МНС класса I с CD8 приблизительно в 100 раз слабее, чем связывание TCR с МНС класса I, связывание CD8 усиливает аффинность связывания TCR. 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.

Связывание CD8 с молекулами МНС класса I является видоспецифичным. Показано, что мышинный гомолог CD8, Lyt-2, связывается с молекулами H-2D<sup>d</sup> в домене  $\alpha_3$ , но не связывается с молекулами HLA-A. Connolly et al. (1988) The Lyt-2 Molecule Recognizes Residues in the Class I  $\alpha_3$  Domain in Allogeneic Cytotoxic T Cell Responses, *J. Exp. Med.* 168: 325-341. Дифференцированное связывание происходило предположительно за счет 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  $\alpha 3$  (в положении 223-229). Одиночная замена (V245A) в HLA-A ослабляла связывание CD8 с HLA-A с одновременным значительным уменьшением опосредованного Т-клетками лизиса. Salter et al. (1989), Polymorphism in the  $\alpha 3$  domain of HLA-A molecules affects binding to CDS, Nature 338:345-348. В целом полиморфизм в домене  $\alpha 3$  молекул HLA-A также влиял на связывание с CD8. Там же.

У мышей аминокислотная замена в остатке 227 в H-2D<sup>d</sup> влияла на связывание мышинного Lyt-2 с H-2D<sup>d</sup>, а клетки, трансфицированные мутантным H-2D<sup>d</sup>, 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 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 $\alpha$ , по-видимому, это взаимодействие регулируется присутствием цитоплазматического домена CD8 $\beta$ , так как мутации или делеции цитоплазматического домена CD8 $\beta$  приводили к снижению CD8 $\alpha$ -ассоциированной активности Lck. Irie et al. (1998) The cytoplasmic domain of CD8 $\beta$  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.

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 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 $\alpha$  и/или  $\beta$  в Т-клетках различных линий дифференцировки, включая Т-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.

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 мышинные 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 $\alpha$  и/или  $\beta$ ,

последовательностями, кодирующими человеческие или гуманизированные белки CD8 $\alpha$  и/или  $\beta$ , как описано в настоящем документе.

В различных вариантах осуществления в изобретении предложено генетически модифицированное не относящееся к человеку животное, содержащее в своем геноме, например в своем эндогенном локусе CD8, по меньшей мере одну нуклеотидную последовательность, кодирующую химерный человеческий/нечеловеческий полипептид CD8 (например, полипептид CD8 $\alpha$  и/или  $\beta$ ), причем человеческий участок полипептида содержит весь или по существу весь внеклеточный участок (или его часть, например, внеклеточный домен) человеческого полипептида CD8 (например, CD8 $\alpha$  и/или  $\beta$ ), при этом нечеловеческий участок содержит по меньшей мере трансмембранный и цитоплазматический домены нечеловеческого CD8 (например, CD8 $\alpha$  и/или  $\beta$ ), и при этом животное экспрессирует химерный полипептид CD8 (например, полипептид CD8 $\alpha$  и/или  $\beta$ ). Таким образом, в одном варианте осуществления в изобретении предложено генетически модифицированное не относящееся к человеку животное, содержащее в своем эндогенном нечеловеческом локусе CD8 первую нуклеотидную последовательность, кодирующую химерный человеческий/нечеловеческий полипептид CD8 $\alpha$ , и вторую нуклеотидную последовательность, кодирующую химерный человеческий/нечеловеческий полипептид CD8 $\beta$ , причем первая нуклеотидная последовательность содержит последовательность, которая кодирует весь или по существу весь внеклеточный участок человеческого полипептида CD8 $\alpha$  и по меньшей мере трансмембранный и цитоплазматический домены нечеловеческого полипептида CD8 $\alpha$ , и при этом вторая нуклеотидная последовательность содержит последовательность, которая кодирует весь или по существу весь внеклеточный участок человеческого полипептида CD8 $\beta$  и по меньшей мере трансмембранный и цитоплазматический домены нечеловеческого полипептида CD8 $\beta$ , 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 $\alpha$  и/или  $\beta$ ) и не экспрессируется (-ются) соответствующий (-ие) функциональный (-ые) нечеловеческий (-ие) полипептид (-ы) CD8 из эндогенного локуса CD8.

В одном варианте осуществления химерный человеческий/нечеловеческий полипептид CD8 $\alpha$  содержит в своем человеческом участке весь или по существу весь внеклеточный участок человеческого полипептида CD8 $\alpha$ . В одном варианте осуществления человеческий участок химерного полипептида CD8 $\alpha$  содержит по меньшей мере домен связывания с МНС I человеческого полипептида CD8 $\alpha$ . В одном варианте осуществления человеческий участок химерного полипептида CD8 $\alpha$  содержит последовательность по меньшей мере всего или по существу всего подобного иммуноглобулину V домена человеческого CD8 $\alpha$ . В одном варианте осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая человеческий участок химерного полипептида CD8 $\alpha$ , содержит по меньшей мере экзоны, которые кодируют внеклеточный участок человеческого полипептида CD8 $\alpha$ . В одном варианте осуществления нуклеотидная последовательность содержит по меньшей мере экзоны, которые кодируют IgV-подобные домены. В одном варианте осуществления внеклеточный участок человеческого полипептида CD8 $\alpha$  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 $\alpha$ , содержит

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

5 нечеловеческий полипептид CD8 $\alpha$  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 $\beta$  содержит в своем человеческом участке весь или по существу весь внеклеточный участок человеческого полипептида CD8 $\beta$ . В одном варианте осуществления человеческий участок химерного полипептида CD8 $\beta$  содержит последовательность всего или по существу всего подобного иммуноглобулину V домена человеческого CD8 $\beta$ . В одном варианте осуществления нуклеотидная

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

20 нечеловеческого полипептида CD8 $\beta$ , содержит по меньшей мере экзоны, которые кодируют IgV-подобный домен человеческого CD8 $\beta$ . В одном варианте осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая химерный человеческий/нечеловеческий полипептид CD8 $\beta$ , содержит последовательность, кодирующую нечеловеческий (например, грызуна, например мышинный) сигнальный пептид CD8 $\beta$ . Альтернативно

25 нуклеотидная последовательность может содержать последовательность, кодирующую человеческую сигнальную последовательность CD8 $\beta$ . В одном варианте осуществления химерный человеческий/нечеловеческий полипептид CD8 $\beta$  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 $\alpha$  и/или CD8 $\beta$ . В некоторых вариантах осуществления человеческий участок химерного человеческого/нечеловеческого полипептида CD8 $\alpha$  и/или  $\beta$  содержит одну или более консервативных или неконсервативных модификаций.

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

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

45 осуществления человеческая последовательность полипептида CD8 $\alpha$  и/или  $\beta$  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 $\alpha$  и/или  $\beta$  содержит по меньшей мере трансмембранный и/или цитоплазматический домены нечеловеческого полипептида CD8 $\alpha$  и/или  $\beta$  соответственно. В связи с важными функциями, выполняемыми цитоплазматическим доменом CD8, сохранение эндогенной нечеловеческой (например, мышиной) последовательности у созданных методами генной инженерии животных обеспечивает сохранение правильной внутриклеточной сигнализации и других функций корцептора. В одном варианте осуществления не относящегося к человеку животное представляет собой мышь, а нечеловеческий полипептид CD8 $\alpha$  и/или  $\beta$  представляет собой мышинный полипептид CD8 $\alpha$  и/или  $\beta$  соответственно. Хотя в примерах описаны конкретные мышинные последовательности CD8 $\alpha$  и  $\beta$ , 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 $\alpha$  и/или  $\beta$ . В одном аспекте это приводит к замещению участка эндогенного гена CD8 $\alpha$  нуклеотидной последовательностью, кодирующей участок человеческого полипептида CD8 $\alpha$ , и/или замещению участка эндогенного гена CD8 $\beta$  нуклеотидной последовательностью, кодирующей участок человеческого полипептида CD8 $\beta$ . В одном варианте осуществления такое замещение представляет собой замещение эндогенной нуклеотидной последовательности, кодирующей весь или по существу весь внеклеточный участок нечеловеческого CD8 $\alpha$  и/или  $\beta$ , человеческой нуклеотидной последовательностью, кодирующей вышеперечисленное. 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 $\alpha$  и/или  $\beta$ , человеческой нуклеотидной последовательностью, кодирующей вышеперечисленное. В одном варианте осуществления замещение не содержит замещения последовательности CD8 $\alpha$  и/или  $\beta$ , кодирующей трансмембранный и цитоплазматический домены нечеловеческого полипептида CD8 $\alpha$  и/или  $\beta$ . Таким образом, у не относящегося к человеку животного экспрессируется химерный человеческий/нечеловеческий полипептид CD8 $\alpha$  и/или  $\beta$  из эндогенного нечеловеческого локуса CD8. В еще одном варианте осуществления замещение приводит к образованию белка CD8 $\alpha$  и/или  $\beta$ , 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 мышиногo локуса CD8). В одном аспекте в связи с тем, что химерная человеческая/нечеловеческая (например, человека/грызуна, например человека/мышь) последовательность CD8 $\alpha$  и/или  $\beta$  находится в соответствующем эндогенном нечеловеческом (например, грызуна, например мышином) локусе CD8 $\alpha$  и/или  $\beta$ , в ней сохранены эндогенные промоторные и регуляторные элементы CD8 $\alpha$  и/или  $\beta$ . В другом варианте осуществления химерный локус может содержать человеческие промоторные и регуляторные элементы CD8 $\alpha$  и/или  $\beta$  в количестве, достаточном для надлежащей экспрессии CD8 $\alpha$  и/или  $\beta$  (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 мышь) 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 $\alpha$  и/или  $\beta$ .

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; (b) неперестроенный ген варибельного 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 варибельного участка TCR способны к рекомбинации с образованием перестроенного гена, функционально связанного с нечеловеческой константной последовательностью гена TCR; и (с) последовательность нуклеиновых 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 корцептора. Необязательно не относящееся к человеку животное также содержит человеческий или гуманизированный полипептид  $\beta 2$ -микроглобулин.

5 Соответственно, в различных вариантах осуществления в изобретении по существу предложены генетически модифицированные не относящиеся к человеку животные, содержащие в геноме перестроенные гуманизированные вариabельные локусы гена TCR, например перестроенный человеческий вариabельный участок гена TCR, содержащий человеческие вариabельные сегменты TCR, способные к рекомбинации с  
10 образованием перестроенной вариabельной последовательности гена TCR. Лocus TCR или locus гена TCR (например, locus TCR $\alpha$  или locus TCR $\beta$ ) в настоящем документе означает геномную ДНК, содержащую кодирующий регион TCR, включающий весь кодирующий регион TCR, включая перестроенные 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.). Вариabельный locus TCR, вариabельный участок TCR или вариabельный locus гена TCR (например, вариabельный locus гена TCR $\alpha$  или вариabельный locus гена TCR $\beta$ ) означает геномную ДНК, которая включает сегменты вариabельного 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 вариabельный locus 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  $\alpha$  (альфа) и  $\beta$  (бета) или цепи  $\gamma$  (гамма) и  $\delta$  (дельта). Цепь  $\alpha$  кодируется последовательностью нуклеиновых кислот, расположенной в пределах локуса  $\alpha$  (на человеческой или мышинной хромосоме 14), которая также охватывает весь locus  $\delta$ , а цепь  $\beta$  кодируется последовательностью нуклеиновых кислот, расположенной в пределах  
35 локуса  $\beta$  (на мышинной хромосоме 6 или человеческой хромосоме 7). Большинство Т-клеток имеют  $\alpha\beta$ -TCR; а меньшинство Т-клеток несут  $\gamma\delta$ -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).

$\alpha$ - и  $\beta$ -полипептиды Т-клеточного рецептора (и аналогично  $\gamma$ - и  $\delta$ -полипептиды) связаны друг с другом дисульфидным мостиком. Каждый из двух полипептидов, составляющих TCR, включает внеклеточный домен, содержащий константный и  
45 вариabельный участки, трансмембранный домен и цитоплазматический хвост (трансмембранный домен и цитоплазматический хвост также являются частью константного участка). Вариabельный участок TCR определяет антигенную специфичность рецептора и по аналогии с иммуноглобулинами содержит три области,

определяющие комплементарность (CDR). Также по аналогии с генами иммуноглобулина переменные локусы гена Т-клеточного рецептора (например, локусы TCR $\alpha$  и TCR $\beta$ ) содержат ряд неперестроенных сегментов V(D)J (переменный (V), соединительный (J) и, в TCR $\beta$  и  $\delta$ , дополнительный (D) сегменты). В процессе развития Т-клетки в тимусе переменный locus гена TCR $\alpha$  подвергается перестройке таким образом, что конечная цепь  $\alpha$  TCR кодируется специфической комбинацией сегментов VJ (последовательность V $\alpha$ /J $\alpha$ ); а переменный locus гена TCR $\beta$  подвергается перестройке таким образом, что конечная цепь  $\beta$  TCR кодируется специфической комбинацией сегментов VDJ (последовательность V $\beta$ /D $\beta$ /J $\beta$ ).

Взаимодействия со стромой тимуса активируют тимоциты, которые проходят несколько стадий развития, характеризующихся экспрессией различных маркеров на клеточной поверхности. Обзор характеристик маркеров клеточной поверхности на различных этапах развития в тимусе представлен в таблице 1. Перестройка в переменном locus гена TCR $\beta$  начинается на стадии DN2 и завершается во время стадии DN4, а перестройка переменного locus гена TCR $\alpha$  происходит на стадии DP. После завершения перестройки locus TCR $\beta$  клетки экспрессируют на клеточной поверхности цепь  $\beta$  TCR, а также суррогатную цепь  $\alpha$ , pT $\alpha$ . См. публикацию Janeway's Immunobiology, Chapter 7, 7<sup>th</sup> Ed., Murphy et al. eds., Garland Science, 2008.

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

Стадия развития	DN1	DN2	DN3	DN4	DP	SP
Маркер (-ы)	CD44+/CD25-	CD44+/CD25+	CD44 <sup>low</sup> /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 активируется клональное размножение и дифференцировка в ряд эффекторных Т-клеток (Teff), например цитотоксические Т-клетки, клетки T<sub>REG</sub>, клетки T<sub>H</sub>17, клетки T<sub>H</sub>1, клетки T<sub>H</sub>2 и т.д. После инфицирования ряд Т-клеток сохраняется в виде Т-клеток памяти, которые могут быть двух типов: центральные Т-клетки памяти (T<sub>cm</sub>) и эффекторные Т-клетки памяти (T<sub>em</sub>). 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 T<sub>em</sub> представляют собой легкодоступный пул примированных антигеном Т-клеток в периферических тканях с эффекторными функциями, а клетки T<sub>cm</sub> представляют собой примированные 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), T<sub>cm</sub> 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 T<sub>cm</sub> 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 TCR, внеклеточный участок константного домена, а также трансмембранный и цитоплазматический домены TCR также выполняют важные функции. Полный рецепторный комплекс TCR включает не только полипептиды  $\alpha$  и  $\beta$  или  $\gamma$  и  $\delta$ ; необходимы дополнительные молекулы, такие как CD3 $\gamma$ , CD3 $\delta$  и CD3 $\epsilon$ , а также гомодимер цепи  $\zeta$ , ( $\zeta\zeta$ ). После завершения перестройки TCR $\beta$  (когда клетки экспрессируют TCR $\beta$ /pT $\alpha$ ) данный неполный комплекс TCR находится на клеточной поверхности вместе с CD3. TCR $\alpha$  (или pT $\alpha$ ) 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 $\beta$  имеет в своем трансмембранном домене дополнительный щелочной 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 $\alpha\beta$ , 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 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  $\zeta$  собранного комплекса предоставляют компоненты для TCR-сигналикации, 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 иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM), а цепь  $\zeta$  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 Src (Lck и Fyn), которые иницируют 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 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 $\beta$  играют роль в митохондриальном нацеливании и индукции апоптоза. Фактически в тимоцитах находятся усеченные со стороны N-конца молекулы TCR $\beta$  природного происхождения. Shani et al. (2009) Incomplete T-cell receptor- $\beta$  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 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 кодируют человеческие вариабельные домены Т-клеточного рецептора, включая животных, которые содержат Т-клетки, содержащие перестроенные человеческие вариабельные домены и нечеловеческие (например, мышинные или крысиные) константные участки. В настоящем изобретении также предложены не относящиеся к человеку животные (например, грызуны, например крысы, мыши), которые способны 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 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 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 $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  и/или  $\gamma$ ) эндогенные нечеловеческие сегменты 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 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 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 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

5 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  
10 цитоплазматический хвост TCR. Как указано выше, константный домен TCR участвует в сигнальном каскаде, запущенном в процессе активации примированной 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  
15 животные изобретения экспрессируют гуманизированные Т-клеточные рецепторы, которые сохраняют способность мобилизовать разнообразные эндогенные нечеловеческие якорные или сигнальные молекулы, например молекулы CD3 (например, CD3 $\gamma$ , CD3 $\delta$ , CD3 $\epsilon$ ), цепь  $\zeta$ , Lck, Fyn, ZAP-70 и т.д. Не имеющий ограничительного характера список молекул, которые мобилизуются к комплексу TCR, описан в  
20 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 переменных участков в эндогенные мышинные локусы и сохранением мышинных константных доменов.

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

В некоторых вариантах осуществления предложено не относящееся к человеку животное, которое содержит в своем геноме неперестроенные человеческие сегменты варибельного участка TCR $\delta$ , при этом неперестроенные человеческие сегменты варибельного участка TCR $\delta$  функционально связаны с нечеловеческой

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

В других вариантах осуществления предложено не относящееся к человеку животное, которое содержит в своем геноме неперестроенные человеческие сегменты варибельного участка TCR $\beta$ , при этом неперестроенные человеческие сегменты варибельного участка TCR $\beta$  функционально связаны с нечеловеческой последовательностью гена константного участка TCR $\beta$ , что приводит к образованию гуманизированного локуса TCR $\beta$ . В одном варианте осуществления гуманизированный  
20 локус TCR $\beta$  находится в таком сайте в геноме, который не является эндогенным нечеловеческим локусом TCR $\beta$ . В другом варианте осуществления неперестроенные человеческие сегменты варибельного участка TCR $\beta$  замещают эндогенные нечеловеческие сегменты варибельного участка TCR $\beta$ , при этом сохраняется(-ются) эндогенная(-ые) нечеловеческая(-ие) последовательность(-и) гена константного участка  
25 TCR $\beta$ . В одном варианте осуществления неперестроенный человеческий варибельный локус гена TCR $\beta$  замещает эндогенный нечеловеческий варибельный локус гена TCR $\beta$ . В некоторых вариантах осуществления животное сохраняет эндогенные последовательности гена варибельного участка и константного участка TCR $\alpha$ . Таким образом, у животного экспрессируется TCR, который содержит химерную человеческую/ нечеловеческую (т.е. гуманизированную) цепь  $\beta$  TCR и нечеловеческую цепь  $\alpha$  TCR.  
30

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 варибельный локус гена Т-клеточного рецептора (TCR)  $\alpha$ , содержащий по меньшей  
35 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 $\alpha$ ; (b) неперестроенный варибельный локус гена TCR $\beta$ , содержащий по меньшей мере один человеческий сегмент V $\beta$ , по меньшей мере один человеческий сегмент D $\beta$  и по  
40 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 $\beta$ ; и/или (с) неперестроенный варибельный локус гена TCR $\delta$ , содержащий по меньшей мере один человеческий сегмент V $\delta$ , по меньшей мере один человеческий сегмент D $\delta$  и по меньшей мере один  
45 человеческий сегмент J $\delta$ , функционально связанные с эндогенной нечеловеческой (например, грызуна, например мыши или крысы) последовательностью гена константного участка TCR $\delta$ . Другое не относящееся к человеку животное, предложенное в настоящем документе, содержит в своем геноме: (а) неперестроенный варибельный

локус гена Т-клеточного рецептора (TCR)  $\alpha$ , 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 $\alpha$ ;

5 (b) неперестроенный вариабельный локус гена TCR $\beta$ , 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 $\beta$ ; (c) неперестроенный

10 вариабельный локус гена TCR $\delta$ , 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 $\delta$ ; и/или (d) неперестроенный вариабельный локус гена

15 TCR $\gamma$ , 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 $\gamma$ .

В различных вариантах осуществления изобретения неперестроенный человеческий

20 или гуманизированный вариабельный локус гена TCR (например, вариабельный локус гена TCR $\alpha$ , TCR $\beta$  и/или TCR $\delta$ ) 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 нечеловеческими 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 $\alpha$ , две копии неперестроенного человеческого или гуманизированного вариабельного локуса гена TCR $\beta$  и/или две копии неперестроенного человеческого или гуманизированного вариабельного локуса гена TCR $\delta$ . Таким образом, не относящееся к человеку животное является гомозиготным по одному или более

35 неперестроенным человеческим или гуманизированным вариабельным локусам гена TCR $\alpha$ , TCR $\beta$  и/или TCR $\delta$ . В некоторых вариантах осуществления изобретения не относящееся к человеку животное содержит одну копию неперестроенного человеческого или гуманизированного вариабельного локуса гена TCR $\alpha$ , одну копию неперестроенного человеческого или гуманизированного вариабельного локуса гена

40 TCR $\beta$  и/или одну копию неперестроенного человеческого или гуманизированного вариабельного локуса гена TCR $\delta$ . Таким образом, не относящееся к человеку животное является гетерозиготным по неперестроенному человеческому или гуманизированному вариабельному локусу гена TCR $\alpha$ , TCR $\beta$  и/или TCR $\delta$ . В другом варианте осуществления не относящееся к человеку животное является гетерозиготным или гомозиготным по

45 неперестроенному человеческому или гуманизированному вариабельному локусу гена TCR $\gamma$ .

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

сегменты V $\alpha$  и J $\alpha$ ) расположен в нечеловеческом геноме таким образом, что человеческие сегменты переменного участка замещают соответствующие нечеловеческие сегменты переменного участка. В одном варианте осуществления неперестроенный переменный локус гена TCR $\alpha$ , содержащий человеческие сегменты переменного участка, замещает эндогенный переменный локус 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 переменном локусе гена TCR $\alpha$  способны к перестройке с образованием перестроенной человеческой последовательности V $\alpha$ /J $\alpha$ .

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

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

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

В еще одном варианте осуществления неперестроенные переменные локусы гена TCR $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  и/или  $\gamma$ , содержащие человеческие сегменты переменного участка, замещают соответствующие эндогенные переменные локусы гена TCR $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  и  $\gamma$ . В одном аспекте

эндогенные нечеловеческие сегменты V $\alpha$  и J $\alpha$  неспособны к перестройке с образованием перестроенной последовательности V $\alpha$ /J $\alpha$ , эндогенные нечеловеческие сегменты V $\beta$ , D $\beta$  и J $\beta$  неспособны к перестройке с образованием перестроенной последовательности V $\beta$ /D $\beta$ /J $\beta$ , эндогенные сегменты V $\delta$ , D $\delta$  и J $\delta$  неспособны к перестройке с образованием перестроенной последовательности V $\delta$ /D $\delta$ /J $\delta$  и/или эндогенные 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 $\alpha$  и J $\alpha$  в неперестроенном варибельном локусе гена TCR $\alpha$  способны к перестройке с образованием перестроенной человеческой последовательности V $\alpha$ /J $\alpha$ , человеческие сегменты V $\beta$ , D $\beta$  и J $\beta$  в неперестроенном варибельном локусе гена TCR $\beta$  способны к перестройке с образованием перестроенной человеческой последовательности V $\beta$ /D $\beta$ /J $\beta$  человеческие сегменты V $\delta$ , D $\delta$  и J $\delta$  в неперестроенном варибельном локусе гена TCR $\delta$  способны к перестройке с образованием перестроенной человеческой последовательности V $\delta$ /D $\delta$ /J $\delta$  и/или человеческие сегменты V $\gamma$  и J $\gamma$  в неперестроенном варибельном локусе гена TCR $\alpha$  способны к перестройке с образованием перестроенной человеческой последовательности V $\gamma$ /J $\gamma$ .

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

Количество, номенклатура, положение, а также другие аспекты сегментов V и J и/или V, D и J человеческих и мышинных локусов TCR могут быть установлены с использованием базы данных IMGT, доступной на веб-сайте Международной иммуногенетической информационной системы (IMGT). Мышиный варибельный локус TCR $\alpha$  имеет размер приблизительно 1,5 м. п. н. и содержит всего 110 сегментов V $\alpha$  и 60 сегментов J $\alpha$ . Человеческий варибельный локус TCR $\alpha$  имеет размер приблизительно 1 м. п. н. и содержит всего 54 сегмента V $\alpha$  и 61 сегмент J $\alpha$ , при этом 45 V $\alpha$  и 50 J $\alpha$  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 $\alpha$  и по меньшей мере один человеческий сегмент J $\alpha$ . В одном варианте осуществления не относящееся к человеку животное содержит гуманизированный локус TCR $\alpha$ , 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 V $\alpha$ . В некоторых вариантах осуществления гуманизированный локус TCR $\alpha$  содержит 2, 8, 23, 35, 48 или 54 человеческих сегмента V $\alpha$ . Таким образом, в некоторых вариантах осуществления гуманизированный локус TCR $\alpha$  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 V $\alpha$ ; в некоторых вариантах осуществления он может содержать приблизительно 2%, приблизительно 3%, приблизительно 15%, приблизительно 65%, приблизительно 90% или 100% человеческих V $\alpha$ .

В одном варианте осуществления не относящееся к человеку животное содержит гуманизированный локус TCR $\alpha$ , который содержит фрагмент ДНК, содержащий непрерывную человеческую последовательность из человеческих V $\alpha$ 40-V $\alpha$ 41 (сегмент V $\alpha$  также обозначается как TRAV или TCRAV), и фрагмент ДНК, содержащий непрерывную человеческую последовательность из 61 человеческого сегмента J $\alpha$  (сегмент J $\alpha$  также обозначается как TRAJ или TCRAJ). В одном варианте осуществления не относящееся к человеку животное содержит гуманизированный локус TCR $\alpha$ , 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 осуществления не относящееся к человеку животное содержит гуманизированный локус TCR $\alpha$ , 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 гуманизированный локус TCR $\alpha$ , 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 $\alpha$ , который содержит фрагмент ДНК, 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 $\alpha$ , который содержит фрагмент ДНК, содержащий непрерывную человеческую последовательность из человеческих TRAV1-1-TRAV41 и 61 человеческого TRAJ. В различных вариантах осуществления фрагменты ДНК, содержащие непрерывные человеческие последовательности из человеческих сегментов вариабельного участка TCR $\alpha$ , 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 не нарушают надлежащее функционирование (например, перестройку, сплайсинг и т.д.) различных генов в локусе TCR $\alpha$ .

В одном варианте осуществления гуманизированный локус TCR $\alpha$  содержит 61 человеческий сегмент J $\alpha$  или 100% человеческих сегментов J $\alpha$ . В конкретном варианте осуществления гуманизированный локус TCR $\alpha$  содержит 8 человеческих сегментов V $\alpha$  или 61 человеческий сегмент J $\alpha$ ; в другом конкретном варианте осуществления гуманизированный локус TCR $\alpha$  содержит 23 человеческих сегмента V $\alpha$  или 61 человеческий сегмент J $\alpha$ . В другом конкретном варианте осуществления гуманизированный локус TCR $\alpha$  содержит полный набор человеческих сегментов V $\alpha$  и

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

5 Мышиный варибельный локус  $TCR\beta$  имеет размер приблизительно 0,6 м. п. н. и содержит всего 33 сегмента  $V\beta$ , 2 сегмента  $D\beta$  и 14 сегментов  $J\beta$ . Человеческий варибельный локус  $TCR\beta$  имеет размер приблизительно 0,6 м. п. н. и содержит всего 67 сегментов  $V\beta$ , 2 сегмента  $D\beta$  и 14 сегментов  $J\beta$ . В одном варианте осуществления изобретения генетически модифицированное не относящееся к человеку животное (например, грызун, например мышь или крыса) содержит по меньшей мере один  
10 человеческий сегмент  $V\beta$ , по меньшей мере один человеческий сегмент  $D\beta$  и по меньшей мере один человеческий сегмент  $J\alpha$ . В одном варианте осуществления не относящееся к человеку животное содержит гуманизированный локус  $TCR\beta$ , 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  $V\beta$ . В некоторых вариантах осуществления гуманизированный локус  $TCR\beta$  содержит 8, 14, 40, 66 или 67 человеческих сегментов  $V\beta$ . Таким образом, в некоторых вариантах осуществления гуманизированный локус  $TCR\beta$  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  $V\beta$ ; в некоторых вариантах осуществления он может содержать приблизительно 20%, приблизительно 60%, приблизительно 15%, приблизительно 98% или 100% человеческих  $V\beta$ .

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



отдельный фрагмент ДНК, содержащий непрерывную человеческую последовательность из человеческих D $\beta$ 1-J $\beta$ 1, отдельный фрагмент ДНК, содержащий непрерывную человеческую последовательность из человеческих D $\beta$ 2-J $\beta$ 2 и отдельный фрагмент ДНК, содержащий последовательность человеческого TRBV30. В различных вариантах осуществления фрагменты ДНК, содержащие непрерывные человеческие последовательности из человеческих сегментов вариабельного участка TCR $\beta$ , 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 не нарушают надлежащее функционирование (например, перестройку, сплайсинг и т.д.) различных генов в локусе TCR $\beta$ .

В одном варианте осуществления гуманизированный локус TCR $\beta$  содержит 14 человеческих сегментов J $\beta$  или 100% человеческих сегментов J $\beta$  и 2 человеческих сегмента D $\beta$  или 100% человеческих сегментов J $\beta$ . В другом варианте осуществления гуманизированный локус TCR $\beta$  содержит по меньшей мере один человеческий сегмент V $\beta$ , например 14 человеческих сегментов V $\beta$ , и все мышинные сегменты D $\beta$  и J $\beta$ . В конкретном варианте осуществления гуманизированный локус TCR $\beta$  содержит 14 человеческих сегментов V $\beta$ , 2 человеческих сегмента D $\beta$  или 14 человеческих сегментов J $\beta$ . В другом конкретном варианте осуществления гуманизированный локус TCR $\beta$  содержит полный набор человеческих сегментов V $\beta$ , D $\beta$  и J $\beta$ , т.е. все человеческие сегменты гена вариабельного участка  $\beta$ , кодируемые локусом  $\beta$ , или 67 человеческих сегментов V $\beta$ , 2 человеческих D $\beta$  или 14 человеческих сегментов J $\beta$ . В одном варианте осуществления не относящееся к человеку животное содержит один (например, 5') нечеловеческий сегмент V $\beta$  в гуманизированном локусе TCR $\beta$ . В различных вариантах осуществления не относящееся к человеку животное не содержит каких-либо нечеловеческих сегментов V $\beta$ , D $\beta$  или J $\beta$  в локусе TCR $\beta$ .

В различных вариантах осуществления, в которых не относящееся к человеку животное (например, грызун) содержит набор сегментов вариабельного участка человеческих TCR $\alpha$  и TCR $\beta$  (и необязательно человеческих TCR $\delta$  и TCR $\gamma$ ) (например, полный набор сегментов вариабельного участка), набор различных сегментов (например, полный набор различных сегментов) используется животным для продукции разнообразного 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 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 сгруппированы так же, как в неперестроенном нечеловеческом геномном вариабельном локусе TCR. В различных вариантах осуществления гуманизированного локуса TCR  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  и/или  $\gamma$  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 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 TCR $\delta$  расположены с локусом TCR $\alpha$  (см. ФИГ. 4А сверху, область TCRD заключена в рамку). Сегменты J и D TCR $\delta$  расположены между сегментами V $\alpha$  и J $\alpha$ , а сегменты V TCR $\delta$  разбросаны по всему локусу TCR $\alpha$ , причем большинство расположено среди различных сегментов V $\alpha$ .

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

В некоторых вариантах осуществления изобретения не относящиеся к человеку  
10 животное, содержащее неперестроенный человеческий варибельный локус гена TCR $\alpha$ , также содержит по меньшей мере один человеческий сегмент V $\delta$ , например вплоть до полного набора человеческих сегментов V $\delta$ . Таким образом, в некоторых вариантах осуществления замещение эндогенного варибельного локуса гена TCR $\alpha$  приводит к замещению по меньшей мере одного нечеловеческого сегмента V $\delta$  человеческим  
15 сегментом V $\delta$ . В других вариантах осуществления не относящиеся к человеку животное изобретения содержит полный набор человеческих сегментов V $\delta$ , D $\delta$  и J $\delta$  в неперестроенном гуманизированном локусе TCR $\alpha$ ; в других вариантах осуществления не относящиеся к человеку животное содержит полный неперестроенный человеческий локус TCR $\delta$  в неперестроенном гуманизированном локусе TCR $\alpha$  (т.е. локус TCR $\delta$ ,  
20 включая человеческие сегменты варибельного участка, а также человеческие энхансер и константный участок). Пример осуществления для конструирования неперестроенного гуманизированного локуса TCR $\alpha$ , содержащего полный неперестроенный локус TCR $\delta$ , показан в патенте США №9,113,616, включенном в настоящий документ путем ссылки.

В еще одном варианте осуществления не относящиеся к человеку животное  
25 изобретения дополнительно содержит неперестроенный гуманизированный локус TCR $\gamma$ , например локус TCR $\gamma$ , содержащий по меньшей мере один человеческий сегмент V $\gamma$  и по меньшей мере один человеческий сегмент J $\gamma$  (например, полный набор человеческих сегментов варибельного участка V $\gamma$  и J $\gamma$ ). Человеческий локус TCR $\gamma$  находится на человеческой хромосоме 7, а мышинный локус TCR $\gamma$  находится на мышинной хромосоме  
30 13. Более подробная информация о локусе TCR $\gamma$  представлена в базе данных IMGT.

В одном аспекте не относящиеся к человеку животное (например, грызун, например мышь или крыса), содержащее гуманизированные варибельные локусы гена TCR $\alpha$  и  $\beta$  (и необязательно гуманизированные варибельные локусы гена TCR $\delta/\gamma$ ), описанные  
35 в настоящем документе, экспрессирует на поверхности Т-клетки гуманизированный Т-клеточный рецептор, содержащий человеческий варибельный участок и нечеловеческий (например, грызуна, например мыши или крысы) константный участок. В некоторых аспектах не относящиеся 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  
45 лидерные последовательности.

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 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 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 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 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 рецептор с нечеловеческим константным участком, причем рецептор способен взаимодействовать с нечеловеческими молекулами, например якорными или сигнальными молекулами, экспрессирующимися в Т-клетке (например, молекулами CD3, цепью  $\zeta$ , или другими белками, присоединенными к TCR посредством молекул CD3 или цепи  $\zeta$ ). Таким образом, в одном аспекте предложен клеточный комплекс, содержащий: (а) нечеловеческую Т-клетку, которая экспрессирует: (i) TCR, который содержит гуманизированную цепь  $\alpha$  TCR, описанную в настоящем документе, и гуманизированную цепь  $\beta$  TCR, описанную 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 $\alpha$  и TCR $\beta$  находятся в комплексе с нечеловеческими гомодимером зета ( $\zeta$ ) цепи и гетеродимерами 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, продуцируют 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 относящегося к человеку животного изобретения экспрессируют молекулы клеточной поверхности, в норме продуцируемые Т-клеткой во время конкретной стадии дифференцировки в тимусе (например, CD25, CD44, Kit, CD3, pTa и т.д.). Таким образом, в одном варианте осуществления не относящиеся к человеку животные, описанные в настоящем документе, могут экспрессировать pTa в комплексе с TCR $\beta$  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 вариантах осуществления не относящиеся к человеку животные, описанные в настоящем документе, способны продуцировать набор эффекторных Т-клеток, например CTL (цитотоксические Т-лимфоциты), T<sub>H</sub>1, T<sub>H</sub>2, T<sub>REG</sub>, T<sub>H</sub>17 и т.д. Таким образом, в этих 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 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 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, 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 памяти в ответ на введение интересующего антигена. Например, не относящиеся к человеку животные продуцируют как центральные Т-клетки памяти (T<sub>cm</sub>), так и эффекторные Т-клетки памяти (T<sub>em</sub>) 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, 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 документе, развивается популяция дендритных клеток в тимусе.

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

локусы TCR $\alpha/\beta$  и эндогенные нечеловеческие локусы TCR $\delta/\gamma$ , демонстрируют задействие 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  $\alpha$ , человеческого или гуманизированного полипептида МНС II  $\beta$  и человеческого или гуманизированного полипептида МНС I  $\alpha$ ; 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 $\alpha$  и человеческий или химерный полипептид CD8 $\beta$ ,
- 30 неперестроенный вариабельный locus гена Т-клеточного рецептора (TCR)  $\alpha$ , содержащий по меньшей мере один человеческий сегмент V $\alpha$  и по меньшей мере один человеческий сегмент J $\alpha$ , функционально связанный с нечеловеческой константной последовательностью гена TCR $\alpha$ , и/или неперестроенный вариабельный locus гена TCR $\beta$ , 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 $\beta$ ,
- 35 функционально связанный с нечеловеческой константной последовательностью гена TCR $\beta$ , и необязательно первую и вторую последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие, например, человеческий или гуманизированный полипептид МНС I  $\alpha$  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 locus гена неперестроенного Т-клеточного рецептора (TCR)  $\alpha$ , содержащий по меньшей мере один человеческий сегмент V $\alpha$  и по меньшей мере один человеческий сегмент J $\alpha$ , функционально связанный с нечеловеческой константной последовательностью гена TCR $\alpha$ , и/или неперестроенный вариабельный
- 45 locus гена TCR $\beta$ , 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 связанный с нечеловеческой константной последовательностью гена TCR $\beta$ ; и необязательно первую и вторую последовательности

нуклеиновых кислот, кодирующие, например, человеческий или гуманизированный полипептид МНС II  $\alpha$  и человеческий или гуманизированный полипептид МНС II  $\beta$ . 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 $\alpha$  и химерный полипептид CD8 $\beta$ ; переменный локус гена неперестроенного Т-клеточного рецептора (TCR)  $\alpha$ , содержащий по меньшей мере один человеческий сегмент V $\alpha$  и по меньшей мере один человеческий сегмент J $\alpha$ , функционально связанный с нечеловеческой константной последовательностью гена

10 TCR $\alpha$ , и/или неперестроенный переменный локус гена TCR $\beta$ , 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 связанный с нечеловеческой константной последовательностью гена TCR $\beta$ ; и необязательно первую, вторую, третью и четвертую последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие,

15 например, человеческий или гуманизированный полипептид МНС  $\alpha$ , человеческий или гуманизированный полипептид МНС II  $\beta$ , человеческий или гуманизированный полипептид МНС I  $\alpha$  и человеческий или гуманизированный полипептид  $\beta$ 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  $\alpha$  и  $\beta$ ). 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

40 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

45 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  $\alpha$ , при этом человеческий участок химерного полипептида МНС II  $\alpha$  содержит внеклеточный участок (или его часть, например один  
15 или более внеклеточных доменов) человеческого полипептида МНС II  $\alpha$ ; и/или третью последовательность нуклеиновых кислот, кодирующую химерный человеческий/нечеловеческий полипептид МНС II  $\beta$ , при этом человеческий участок химерного полипептида МНС II  $\beta$  содержит внеклеточный участок (или его часть, например один или более внеклеточных доменов) человеческого полипептида МНС II  $\beta$ ; 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  $\alpha$  и МНС II  $\beta$ . 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 мышинном локусе МНС на мышинной 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  $\alpha$ . В одном варианте осуществления третья последовательность нуклеиновых кислот расположена в эндогенном нечеловеческом локусе МНС II  $\beta$ .

В одном варианте осуществления у не относящегося к человеку животного экспрессируются только химерные человеческие/нечеловеческие полипептиды МНС  
35 I, МНС II  $\alpha$  и/или МНС II  $\beta$  и не экспрессируются эндогенные нечеловеческие полипептиды МНС (например, функциональные эндогенные полипептиды МНС I, II  $\alpha$  и/или II  $\beta$ ) 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,  
40 например антигенпредставляющих 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.

В одном варианте осуществления химерный человеческий/нечеловеческий полипептид  
45 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

внечелюточный домен цепи  $\alpha$  человеческого МНС I. В одном варианте осуществления человеческий участок химерного полипептида содержит домены  $\alpha 1$  и  $\alpha 2$  человеческого МНС I. В другом варианте осуществления человеческий участок химерного полипептида содержит домены  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  и  $\alpha 3$  человеческого МНС I.

5 В одном аспекте человеческий участок химерного полипептида МНС II  $\alpha$  и/или человеческий участок химерного полипептида МНС II  $\beta$  содержит пептид-связывающий домен человеческого полипептида МНС II  $\alpha$  и/или человеческого полипептида МНС II  $\beta$  соответственно. В одном аспекте человеческий участок химерного полипептида МНС II  $\alpha$  и/или  $\beta$  содержит внечелюточный участок человеческого полипептида МНС II  $\alpha$  и/или  $\beta$  соответственно. В одном варианте осуществления человеческий участок химерного полипептида МНС II  $\alpha$  содержит домен  $\alpha 1$  человеческого полипептида МНС II  $\alpha$ ; в другом варианте осуществления человеческий участок химерного полипептида МНС II  $\alpha$  содержит домены  $\alpha 1$  и  $\alpha 2$  человеческого полипептида МНС II  $\alpha$ . В дополнительном варианте осуществления человеческий участок химерного полипептида МНС II  $\beta$  содержит домен  $\beta 1$  человеческого полипептида МНС II  $\beta$ ; в другом варианте осуществления человеческий участок химерного полипептида МНС II  $\beta$  содержит домены  $\beta 1$  и  $\beta 2$  человеческого полипептида МНС II  $\beta$ .

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, 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 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.

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-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 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.

В одном конкретном аспекте человеческие участки гуманизированных полипептидов МНС II  $\alpha$  и  $\beta$ , описанные в настоящем документе, получены из человеческого HLA-DR, например HLA-DR2. Как правило, цепи  $\alpha$  HLA-DR являются мономорфными, например, цепь  $\alpha$  комплекса HLA-DR кодируется геном HLA-DRA (например, геном HLA-DR $\alpha$ \*01). С другой стороны, цепь  $\beta$  HLA-DR является полиморфной. Таким образом, HLA-DR2 содержит цепь  $\alpha$ , кодируемую геном HLA-DRA, а цепь  $\beta$  кодируется геном HLA-DR1 $\beta$ \*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.

Человеческие участки химерного полипептида МНС II  $\alpha$  и/или  $\beta$  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 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  $\alpha$  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  $\alpha$  и/или МНС II  $\beta$  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  $\alpha$  может содержать трансмембранный и/или цитоплазматический домены эндогенного нечеловеческого полипептида МНС II  $\alpha$ . Нечеловеческий участок химерного человеческого/ нечеловеческого полипептида МНС II  $\beta$  может содержать трансмембранный и/или

10 цитоплазматический домены эндогенного нечеловеческого полипептида МНС II  $\beta$ . В одном аспекте не относящееся к человеку животное представляет собой мышь, а нечеловеческий участок химерного полипептида МНС I получен из мышинового белка Н-2К. В одном аспекте животное представляет собой мышь, а нечеловеческие участки химерных полипептидов МНС II  $\alpha$  и  $\beta$  получены из мышинового белка Н-2Е. Таким

15 образом, нечеловеческий участок химерного полипептида МНС I может содержать трансмембранный и цитоплазматический домены, полученные из мышинового Н-2К, а нечеловеческие участки химерных полипептидов МНС II  $\alpha$  и  $\beta$  могут содержать трансмембранный и цитоплазматический домены, полученные из мышинового белка Н-2Е. Хотя в примерах рассматриваются конкретные последовательности Н-2К и Н-2Е,

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 Н-2D. В некоторых вариантах осуществления мышь конструируют таким

25 образом, что у нее отсутствует весь эндогенный локус Н-2D или его участок. В других аспектах у мыши не экспрессируются какие-либо функциональные мышинные 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  $\alpha$  содержит нечеловеческую лидерную последовательность эндогенного полипептида МНС II  $\alpha$ . В одном варианте осуществления химерный полипептид МНС II  $\beta$  содержит нечеловеческую лидерную

35 последовательность эндогенного полипептида МНС II  $\beta$ . В альтернативном варианте осуществления химерный(-ые) полипептид(-ы) МНС I, МНС II  $\alpha$  и/или МНС II  $\beta$  содержит(-ат) нечеловеческую лидерную последовательность полипептида(-ов) МНС I, МНС II  $\alpha$  и/или МНС II  $\beta$  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  $\alpha$  и/или МНС II  $\beta$ , может быть функционально связана с последовательностью нуклеиновых кислот, кодирующей нечеловеческую лидерную последовательность МНС I, МНС II  $\alpha$  и/или МНС II  $\beta$  соответственно. В еще одном варианте осуществления химерный(-ые) полипептид(-ы) МНС I, МНС II  $\alpha$  и/или МНС II  $\beta$  содержит(-ат)

45 человеческую лидерную последовательность полипептида человеческого МНС I, человеческого МНС II  $\alpha$  и/или человеческого МНС II  $\beta$  соответственно (например, лидерную последовательность человеческого HLA-A2, человеческого HLA-DR $\alpha$  и/или человеческого HLA-DR $\beta$ 1\*1501 соответственно).

Химерный человеческий/нечеловеческий полипептид МНС I, МНС II  $\alpha$  и/или МНС II  $\beta$  может содержать в своем человеческом участке полный или по существу полный внеклеточный домен полипептида человеческого МНС I, человеческого МНС II  $\alpha$  и/или человеческого МНС II  $\beta$  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  $\alpha$  и/или человеческого МНС II  $\beta$  (например, человеческого HLA-A2, человеческого HLA-DR $\alpha$  и/или человеческого HLA-DR $\beta$ 1\*1501). В одном примере в по  
 10 существу полном внеклеточном домене полипептида человеческого МНС I, человеческого МНС II  $\alpha$  и/или человеческого МНС II  $\beta$  отсутствует человеческая лидерная последовательность. В другом примере полипептид химерного человеческого/нечеловеческого МНС I, химерного человеческого/нечеловеческого МНС II  $\alpha$  и/или химерного человеческого/нечеловеческого МНС II  $\beta$  содержит человеческую лидерную  
 15 последовательность.

Более того, химерный полипептид МНС I, МНС II  $\alpha$  и/или МНС II  $\beta$  может быть функционально связан (например, может экспрессироваться под регуляторным контролем) с эндогенными нечеловеческими промоторными и регуляторными  
 20 элементами, например мышинными регуляторными элементами МНС I, МНС II  $\alpha$  и/или МНС II  $\beta$  соответственно. Такое сочетание будет способствовать правильной экспрессии химерных полипептидов МНС I и/или МНС II  $\gamma$  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  $\beta$ 2-микроглобулина) последовательность нуклеиновых кислот, кодирующую человеческий или гуманизированный  $\beta$ 2 микроглобулин.  $\beta$ 2-микроглобулин или легкая цепь комплекса МНС класса I (также обозначаемая  $\beta$ 2М) представляет собой небольшой (12 кДа) негликозилированный белок, основная функция которого заключается в стабилизации цепи  $\alpha$  МНС I. Создание животных с человеческим или гуманизированным  
 30  $\beta$ 2-микроглобулином подробно описано в публикации патента США №20130111617, которая включена в настоящий документ путем ссылки.

Нуклеотидная последовательность, кодирующая человеческий или гуманизированный полипептид  $\beta$ 2-микроглобулин, может содержать остатки нуклеиновых кислот, соответствующие полному человеческому гену  $\beta$ 2-микроглобулина. Альтернативно  
 35 нуклеотидная последовательность может содержать остатки нуклеиновых кислот, кодирующие аминокислотную последовательность, идентичную аминокислотам 21-119 человеческого белка  $\beta$ 2-микроглобулина (т.е. аминокислотные остатки, соответствующие зрелому человеческому  $\beta$ 2-микроглобулину). В альтернативном варианте осуществления нуклеотидная последовательность может содержать остатки  
 40 нуклеиновых кислот, кодирующие аминокислотную последовательность, идентичную аминокислотам 23-115 человеческого белка  $\beta$ 2-микроглобулина, например, аминокислотную последовательность, идентичную аминокислотам 23-119 человеческого белка  $\beta$ 2-микроглобулина. Нуклеотидные и аминокислотные последовательности человеческого  $\beta$ 2-микроглобулина описаны в публикации Gussow et al., выше,  
 45 включенной в настоящий документ путем ссылки.

Таким образом, человеческий или гуманизированный полипептид  $\beta$ 2-микроглобулин может содержать аминокислотную последовательность, аналогичную аминокислотам 23-115 человеческого полипептида  $\beta$ 2-микроглобулина, например аминокислотную

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

В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая человеческий или гуманизированный  $\beta$ 2-микроглобулин, содержит нуклеотидную последовательность, представленную в экзонах 2-4 человеческого гена  $\beta$ 2-микроглобулина. Альтернативно нуклеотидная последовательность содержит нуклеотидные последовательности, представленные в экзонах 2, 3 и 4 человеческого гена  $\beta$ 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  $\beta$ 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  $\beta$ 2-микроглобулина. В конкретном варианте осуществления человеческая последовательность содержит приблизительно 2,8 т. п. н. человеческого гена  $\beta$ 2-микроглобулина.

Таким образом, человеческий или гуманизированный полипептид  $\beta$ 2-микроглобулин может кодироваться нуклеотидной последовательностью, представленной в экзонах 2-4 человеческого  $\beta$ 2-микроглобулина, например нуклеотидной последовательностью, соответствующей экзонам 2-4 человеческого гена  $\beta$ 2-микроглобулина. Альтернативно полипептид может кодироваться нуклеотидной последовательностью, содержащей нуклеотидные последовательности, представленные в экзонах 2, 3 и 4 человеческого гена  $\beta$ 2-микроглобулина. В конкретном варианте осуществления человеческий или гуманизированный полипептид  $\beta$ 2-микроглобулин кодируется нуклеотидной последовательностью, соответствующей последовательности, начинающейся от экзона 2 и до приблизительно 267 п. н. после экзона 4 человеческого гена  $\beta$ 2-микроглобулина. В другом конкретном варианте осуществления человеческий или гуманизированный полипептид кодируется нуклеотидной последовательностью, содержащей приблизительно 2,8 т. п. н. человеческого гена  $\beta$ 2-микроглобулина. Так как экзон 4 гена  $\beta$ 2-микроглобулина содержит нетранслируемую область на 5'-конце, человеческий или гуманизированный полипептид может кодироваться нуклеотидной последовательностью, содержащей экзоны 2 и 3 гена  $\beta$ 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  $\beta$ 2-микроглобулина, причем последовательность  $\beta$ 2-микроглобулина по меньшей мере приблизительно на 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична человеческой последовательности  $\beta$ 2-микроглобулина. В конкретном варианте осуществления последовательность  $\beta$ 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  
 5 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  
 10 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  $\beta 2$ -  
 15 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 нуклеиновых 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  
 20 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  
 30 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  
 35 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, мышинового) МНС I, например, при этом  
 40 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  $\beta 2$ -  
 45 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/мышь). 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, 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. мышинный) участок химерного полипептида МНС I может быть получен из мышинового белка МНС I, выбранного из H-2D, H-2K и H-2L.

В одном варианте осуществления не относящееся к человеку животное (например, 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 клетки. В одном варианте осуществления белок МНС II содержит внеклеточный домен человеческого полипептида МНС II  $\alpha$  и внеклеточный домен человеческого полипептида МНС II  $\beta$ . 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, 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  $\alpha$ , содержащий внеклеточный домен человеческого МНС II  $\alpha$  и трансмембранный и цитоплазматический домены эндогенного (например, мышинового) МНС II, при этом человеческий внеклеточный домен МНС II  $\alpha$  содержит домены  $\alpha 1$  и  $\alpha 2$  человеческого МНС II  $\alpha$ ; и (2) гуманизированный полипептид МНС II  $\beta$ , содержащий внеклеточный домен человеческого МНС II  $\beta$  и трансмембранный и цитоплазматический домены эндогенного (например, мышинового) МНС II, при этом человеческий внеклеточный домен МНС II  $\beta$  содержит домены  $\beta 1$  и  $\beta 2$  человеческого МНС II  $\beta$ . В одном аспекте оба гуманизированных полипептида МНС II  $\alpha$  и  $\beta$  кодируются последовательностями нуклеиновых кислот, расположенными в эндогенных локусах МНС II  $\alpha$  и  $\beta$  соответственно; в одном аспекте у животного не экспрессируются функциональные эндогенные полипептиды МНС II  $\alpha$  и  $\beta$ . Таким образом, МНС II, экспрессируемый у животных, может представлять собой химерный человеческий/нечеловеческий белок МНС II (например, человека/грызуна, например человека/мышь). 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 другой молекулы HLA класса II, присутствующей в человеческой популяции. В варианте осуществления, в котором животное представляет собой мышь, нечеловеческий (т.е. мышинный) участок химерного полипептида МНС II может быть получен из мышинового белка МНС II, выбранного из H-2E и H-2A.

Специалисту в данной области будут очевидны различные другие варианты 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, продуцируют клетки, например АПК, на поверхности которых находятся человеческий или 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 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 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 рогатого скота (например, коровы, быка, буйвола), оленя, 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 способы включают, например, модификацию генома другой клетки, кроме ЭС-клетки (например, фибробласта или индуцированной плюрипотентной 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 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 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, мыши и крысы, песчанки, иглистые мыши, косматые хомяки), Nesomyidae (например, рипидомисы, скальные крысы, белохвостые крысы, мадагаскарские крысы и мыши), Platanthomyidae (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 Muridae), песчанки, иглистой 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 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, 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 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 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 Вистар, линии LEA, линии Спрег-Доули, линии Фишер, F344, F6 и темной агути. 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 агути.

Таким образом, в одном варианте осуществления изобретения предложена генетически модифицированная мышь, причем мышь содержит, например, в своем геноме, например в своем геноме зародышевой линии: (а) первую нуклеотидную последовательность, кодирующую первый химерный человеческий/мышинный полипептид Т-клеточного корцептора (например, CD4), вторую нуклеотидную последовательность, кодирующую второй химерный человеческий/мышинный полипептид Т-клеточного корцептора (например, CD8 $\alpha$ ), и/или третью нуклеотидную последовательность, кодирующую третий химерный человеческий/мышинный полипептид Т-клеточного корцептора (например, CD8 $\beta$ ), при этом мышинный участок каждого химерного полипептида Т-клеточного корцептора содержит по меньшей мере трансмембранный и цитоплазматический домены мышинного Т-клеточного корцептора, при этом человеческий участок каждого химерного полипептида содержит внеклеточный участок (или его часть, например один или более внеклеточных доменов) человеческого Т-клеточного корцептора, и при этом у мышцы экспрессируются первый, второй и/или третий химерный полипептид Т-клеточного корцептора; (b) варибельный локус гена неперестроенного Т-клеточного рецептора (TCR)  $\alpha$ , содержащий по меньшей мере один человеческий сегмент V $\alpha$  и по меньшей мере один человеческий сегмент J $\alpha$ , функционально связанный с мышинной константной последовательностью гена TCR $\alpha$ , и/или неперестроенный варибельный локус гена TCR $\beta$ , 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 связанный с мышинной константной последовательностью гена TCR $\beta$ ; и необязательно (с) первую последовательность нуклеиновых кислот, кодирующую первый химерный человеческий/мышинный полипептид МНС (например, МНС II  $\alpha$ ), вторую последовательность нуклеиновых кислот, кодирующую второй химерный человеческий/мышинный полипептид МНС (например, МНС II  $\beta$ ), и/или третью последовательность нуклеиновых кислот, кодирующую третий химерный человеческий/мышинный полипептид МНС (например, МНС I), и локус  $\beta$ 2-микроглобулина, кодирующий человеческий или гуманизированный  $\beta$ 2-микроглобулин, при этом человеческий участок каждого 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  $\alpha$  и  $\beta$ ) ассоциируется с химерным полипептидом CD4, и/или человеческий участок химерного полипептида МНС I (или комплекса МНС I, например гуманизированного МНС I $\alpha$  и человеческого (гуманизированного)  $\beta$ 2-микроглобулина) ассоциируется с химерным корецептором CD8 (например, гуманизированными полипептидами CD8  $\alpha$  и  $\beta$ ).

В настоящем документе предложена генетически модифицированная мышь, содержащая в своем геноме, например в своем эндогенном локусе CD4, нуклеотидную последовательность, кодирующую химерный человеческий/мышинный полипептид CD4, причем мышинный участок химерного полипептида содержит по меньшей мере трансмембранный и цитоплазматический домены мышинного полипептида CD4, и при этом у мыши экспрессируется химерный человеческий/мышинный CD4. В одном варианте 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 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 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/мышинный CD4, который содержит человеческую последовательность CD4, которая 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/мышинный CD4, который содержит человеческую последовательность CD4, отвечающую за взаимодействие с МНС II и/или вариабельным доменом Т-клеточного рецептора. В одном варианте осуществления нуклеотидная последовательность содержит последовательность, кодирующую мышинный сигнальный пептид CD4. В одном варианте осуществления мышь содержит замещение нуклеотидной последовательности, кодирующей мышинный 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 мышинный домен D1 CD4, например нуклеотидной последовательности, кодирующей по меньшей мере все или по существу все из мышинных доменов D1-D2 CD4, например нуклеотидной последовательности, кодирующей по меньшей мере все или по существу все из мышинных 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.

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

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 мышинных доменов D1-D3, у мыши сохранена эндогенная нуклеотидная последовательность, кодирующая мышинный домен D4 CD4, а также нуклеотидная последовательность, кодирующая трансмембранный и цитоплазматический домены мышинового CD4.

В одном аспекте у мыши, экспрессирующей химерный человеческий/мышинный белок CD4, сохранены мышинные промоторные и регуляторные последовательности CD4, например нуклеотидная последовательность у мыши, кодирующая химерный человеческий/мышинный CD4, функционально связана с эндогенными мышинными промоторными и регуляторными последовательностями CD4. В одном аспекте эти мышинные регуляторные последовательности, сохраненные у созданного методами генной инженерии животного по изобретению, включают последовательности, которые регулируют экспрессию химерного белка на соответствующих стадиях в процессе 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 содержать в своем геноме, например в своем эндогенном локусе CD8, первую нуклеотидную последовательность, кодирующую химерный человеческий/мышинный полипептид CD8 $\alpha$ , и вторую нуклеотидную последовательность, кодирующую химерный человеческий/мышинный полипептид CD8 $\beta$ . В одном варианте осуществления первая нуклеотидная последовательность содержит последовательность, которая кодирует весь или по существу весь внеклеточный участок человеческого полипептида CD8 $\alpha$  и по меньшей мере трансмембранный и цитоплазматический домены мышинового полипептида CD8 $\alpha$ , а вторая нуклеотидная последовательность содержит последовательность, которая кодирует весь или по существу весь внеклеточный участок человеческого полипептида CD8 $\beta$  и по меньшей мере трансмембранный и цитоплазматический домены мышинового полипептида CD8 $\beta$ , и при этом у мыши экспрессируется функциональный химерный человеческий/мышинный белок CD8. В одном варианте осуществления первая нуклеотидная последовательность содержит последовательность, которая кодирует по меньшей мере подобный иммуноглобулину

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

В одном варианте осуществления у мыши не экспрессируется функциональный  
 эндогенный мышинный полипептид CD8 $\alpha$  и/или CD8 $\beta$  из ее эндогенного локуса CD8. В  
 одном варианте осуществления мышь, описанная в настоящем документе, содержит  
 30 химерную человеческую/мышиную последовательность CD8 в своей зародышевой  
 линии.

В одном аспекте у мыши, экспрессирующей химерный человеческий/мышинный  
 полипептид CD8 $\alpha$  и/или CD8 $\beta$ , сохранены мышинные промоторные и регуляторные  
 последовательности CD8 $\alpha$  и/или CD8 $\beta$ , например, нуклеотидная последовательность  
 35 у мыши, кодирующая химерный человеческий/мышинный CD8, функционально связана  
 с эндогенными мышинными 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  
 40 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  
 45 локус гена TCR, например вариабельный локус гена TCR $\alpha$ , TCR $\beta$ , TCR $\delta$  и/или TCR $\gamma$ . В  
 некоторых вариантах осуществления неперестроенный человеческий или  
 гуманизированный вариабельный локус гена TCR замещает эндогенный мышинный  
 вариабельный локус гена TCR. В других вариантах осуществления неперестроенный

человеческий или гуманизированный переменный локус гена TCR находится в таком сайте в геноме, который отличен от соответствующего эндогенного мышинного локуса TCR. В некоторых вариантах осуществления человеческий или гуманизированный неперестроенный переменный локус гена TCR функционально связан с мышинным константным участком TCR.

В одном варианте осуществления предложена генетически модифицированная мышь, причем мышь содержит в своем геноме неперестроенный переменный локус гена Т-клеточного рецептора (TCR)  $\alpha$ , содержащий по меньшей мере один человеческий сегмент V $\alpha$  и по меньшей мере один человеческий сегмент J $\alpha$ , функционально связанный с мышинной константной последовательностью гена TCR $\alpha$ , и неперестроенный переменный локус гена TCR $\beta$ , 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 связанный с мышинной константной последовательностью гена TCR $\beta$ . В одном конкретном варианте осуществления мышь содержит в своем геноме неперестроенный переменный локус гена TCR  $\alpha$ , содержащий полный набор человеческих сегментов V $\alpha$  и полный набор человеческих сегментов J $\alpha$ , функционально связанных с мышинной константной последовательностью гена TCR $\alpha$ , и неперестроенный переменный локус гена TCR $\beta$ , содержащий полный набор человеческих сегментов V $\beta$ , полный набор человеческих сегментов D $\beta$  и полный набор человеческих сегментов J $\beta$ , функционально связанных с мышинной константной последовательностью гена TCR $\beta$ .

В некоторых вариантах осуществления неперестроенный переменный локус гена TCR $\alpha$ , содержащий человеческие сегменты переменного участка TCR $\alpha$ , замещает эндогенный мышинный переменный локус гена TCR $\alpha$ , а неперестроенный переменный локус гена TCR $\beta$ , содержащий человеческие сегменты переменного участка TCR $\beta$ , замещает эндогенный мышинный переменный локус гена TCR $\beta$ . В некоторых вариантах осуществления эндогенные мышинные сегменты V $\alpha$  и J $\alpha$  неспособны перестраиваться с образованием перестроенной последовательности V $\alpha$ /J $\alpha$ , а эндогенные мышинные сегменты V $\beta$ , D $\beta$  и J $\beta$  неспособны перестраиваться с образованием перестроенной последовательности V $\beta$ /D $\beta$ /J $\beta$ . В некоторых вариантах осуществления человеческие сегменты V $\alpha$  и J $\alpha$  перестраиваются с образованием перестроенной человеческой последовательности V $\alpha$ /J $\alpha$ , а человеческие сегменты V $\beta$ , D $\beta$  и J $\beta$  перестраиваются с образованием перестроенной человеческой последовательности V $\beta$ /D $\beta$ /J $\beta$ .

Изобретение также относится к генетически модифицированной мыши, которая 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 корцептора, как описано в настоящем документе. Генетически модифицированные мыши, описанные в настоящем документе, могут содержать первую последовательность нуклеиновых кислот, кодирующую химерный человеческий/мышинный полипептид МНС I, вторую последовательность нуклеиновых кислот, кодирующую химерный человеческий/мышинный полипептид МНС II  $\alpha$ , и/или третью последовательность нуклеиновых кислот, кодирующую химерный человеческий/мышинный полипептид МНС II  $\beta$ . Человеческий участок химерного МНС I, МНС II  $\alpha$  и/или МНС II  $\beta$  может содержать внеклеточный домен человеческого МНС I, МНС II  $\alpha$  и/или МНС II  $\beta$  соответственно. В одном варианте осуществления у мыши экспрессируются функциональные химерные человеческие/мышинные полипептиды МНС I, МНС II  $\alpha$  и/или МНС II  $\beta$  из ее эндогенного мышинного локуса МНС. В одном варианте

осуществления у мыши не экспрессируются функциональные мышинные полипептиды МНС, например функциональные мышинные полипептиды МНС I, МНС II  $\alpha$  и/или МНС II  $\beta$ , из ее эндогенного мышинового локуса МНС. В других вариантах осуществления единственные МНС I и МНС II, экспрессируемые мышью на клеточной поверхности,

представляют собой химерные МНС I и МНС II.

В одном варианте осуществления человеческий участок химерного человеческого/мышинового 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 осуществления у мыши не экспрессируется домен связывания с пептидом или внеклеточный домен эндогенного мышинового полипептида МНС I из ее эндогенного мышинового 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 человеческого МНС I содержит внеклеточный домен цепи  $\alpha$  человеческого МНС I. В одном варианте осуществления эндогенный мышинный локус МНС I представляет собой локус H-2K (например, H-2Kb), а мышинный участок химерного полипептида МНС I содержит трансмембранный и цитоплазматический домены мышинового полипептида H-2K (например, H-2Kb). Таким образом, в одном варианте осуществления мышь изобретения содержит в своем эндогенном мышинном локусе МНС I последовательность нуклеиновых кислот, кодирующую химерный человеческий/мышинный МНС I, причем человеческий участок химерного полипептида содержит внеклеточный домен человеческого полипептида HLA-A2 (например, HLA-A2.1), а мышинный участок содержит трансмембранный и цитоплазматический домены мышинового полипептида H-2K (например, H-2Kb), и у мыши экспрессируется химерный человеческий/мышинный белок HLA-A2/H-2K. В другом варианте осуществления мышинный участок химерного полипептида МНС I может быть получен из другого мышинового 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 аспекте у мыши не экспрессируется функциональный эндогенный полипептид H-2K из ее эндогенного мышинового 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 вариантах осуществления единственные полипептиды МНС I, экспрессируемые у мыши на клеточной поверхности, представляют собой химерные человеческие/мышинные полипептиды МНС I.

В одном варианте осуществления человеческий участок химерного человеческого/мышинового полипептида МНС II  $\alpha$  содержит человеческий домен связывания с пептидом или внеклеточный домен МНС II  $\alpha$ , а человеческий участок химерного человеческого/мышинового полипептида МНС II  $\beta$  содержит человеческий домен связывания с пептидом или внеклеточный домен МНС II  $\beta$ . В некоторых вариантах осуществления у мыши не экспрессируется домен связывания с пептидом или внеклеточный домен эндогенного мышинового полипептида  $\alpha$  и/или  $\beta$  из эндогенного мышинового локуса (например, локуса 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 единственные полипептиды МНС II, экспрессируемые у мыши

на клеточной поверхности, представляют собой химерные человеческие/мышинные полипептиды МНС II. Домен связывания с пептидом человеческого полипептида МНС II  $\alpha$  может содержать домен  $\alpha 1$ , а домен связывания с пептидом человеческого полипептида МНС II  $\beta$  может содержать домен  $\beta 1$ ; таким образом, домен связывания с пептидом химерного комплекса МНС II может содержать человеческие домены  $\alpha 1$  и  $\beta 1$ . Внеклеточный домен человеческого полипептида МНС II  $\alpha$  может содержать домены  $\alpha 1$  и  $\alpha 2$ , а внеклеточный домен человеческого полипептида МНС II  $\beta$  может содержать домены  $\beta 1$  и  $\beta 2$ ; таким образом, внеклеточный домен химерного комплекса МНС II может содержать человеческие домены  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\beta 1$  и  $\beta 2$ . В одном варианте осуществления мышинный участок химерного комплекса МНС II содержит трансмембранный и цитоплазматический домены мышинного МНС II, например мышинного Н-2Е (например, трансмембранный и цитоплазматический домен мышинных цепей  $\alpha$  и  $\beta$  Н-2Е). Таким образом, в одном варианте осуществления мышь изобретения содержит в своем эндогенном мышинном локусе МНС II последовательность нуклеиновых кислот, кодирующую химерный человеческий/мышинный МНС II  $\alpha$ , причем человеческий участок химерного полипептида МНС II  $\alpha$  содержит внеклеточный домен, полученный из цепи  $\alpha$  человеческого МНС II (например, цепи  $\alpha$  HLA-DR2), а мышинный участок содержит трансмембранный и цитоплазматический домены, полученные из цепи  $\alpha$  мышинного МНС II (например, Н-2Е); и мышь содержит в своем эндогенном мышинном локусе МНС II последовательность нуклеиновых кислот, кодирующую химерный человеческий/мышинный МНС II  $\beta$ , при этом человеческий участок химерного полипептида МНС II  $\beta$  содержит внеклеточный домен, полученный из цепи  $\beta$  человеческого МНС II (например, цепи  $\beta$  HLA-DR2), а мышинный участок содержит трансмембранный и цитоплазматический домены, полученные из цепи  $\beta$  мышинного МНС II (например, Н-2Е); например, при этом у мыши экспрессируется химерный человеческий/мышинный белок HLA-DR2/Н-2Е. В другом варианте осуществления мышинный участок химерного белка МНС II может быть получен из другого мышинного МНС II, например Н-2А 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 Н-2А и Н-2Е из ее эндогенных мышинных локусов (например, у мыши не экспрессируются полипептиды Н-2Аb1, Н-2Аa, Н-2Еb1, Н-2Еb2 и Н-2Еa). В некоторых вариантах осуществления у мыши не экспрессируется эндогенная молекула МНС I или МНС II на клеточной поверхности.

В различных аспектах человеческий или гуманизированный  $\beta 2$ -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  $\beta 2$ -микроглобулина. Например, предпочтительно, чтобы человеческий или гуманизированный  $\beta 2$ -микроглобулин связывался с цепью  $\alpha$  полипептида МНС I (например, эндогенным нечеловеческим или человеческим полипептидом МНС I). Человеческий или гуманизированный полипептид  $\beta 2$ -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  $\beta 2$ -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 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 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 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 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 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 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.

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.

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/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.

Кроме созданного методами генной инженерии не относящегося к человеку животного также предложен нечеловеческий эмбрион (например, эмбрион грызуна, например мышинный 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 эмбрион содержит донорскую ЭС-клетку, которая содержит химерный ген CD4, химерный ген CD8 (например, CD8 $\alpha$  и/или CD8 $\beta$ ), гуманизованную последовательность нуклеиновых кислот МНС I (например, МНС I  $\alpha$ ), гуманизованную последовательность нуклеиновых кислот МНС II (например, МНС II  $\alpha$  и/или МНС II  $\beta$ ), неперестроенный гуманизированный локус TCR (например, TCR $\alpha$  и/или TCR $\beta$  или TCR $\delta$  и/или TCR $\gamma$ ) и/или человеческую или гуманизованную последовательность гена  $\beta$ 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 $\alpha$  и/или CD8 $\beta$ ), гуманизированный полипептид TCR (например, полипептид TCR $\alpha$  и/или TCR $\beta$  или TCR $\delta$  и/или TCR $\gamma$ ), гуманизированный полипептид МНС I (например, МНС I  $\alpha$ ), гуманизированный полипептид МНС II (например, полипептид МНС II  $\alpha$  и/или МНС II  $\beta$ ) и/или человеческий или гуманизированный  $\beta$ 2-микроглобулин.

В одном аспекте предложен способ получения химерной человеческой/нечеловеческой 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 лентивирусный вектор. В одном варианте осуществления клетку выбирают из CHO, COS, 293, HeLa и клетки сетчатки, экспрессирующей вирусную последовательность нуклеиновых кислот (например, клетки PERC.6<sup>TM</sup>).

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 варианте осуществления клетку выбирают из CHO, COS, 293, HeLa и клетки сетчатки, экспрессирующей вирусную последовательность нуклеиновых кислот (например, клетки PERC.6<sup>TM</sup>).

Также предложена химерная молекула CD4, продуцируемая не относящимся к 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 мышинного 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 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 этом оставшая часть белка (например, трансмембранный домен, цитоплазматический домен, любой участок внеклеточного домена, который не был гуманизирован) получена из эндогенной нечеловеческой последовательности белка. Пример химерного человеческого/нечеловеческого полипептида 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 отдельно в SEQ ID NO: 79).

В одном аспекте предложен способ получения химерной человеческой/нечеловеческой молекулы CD8 (например, CD8 $\alpha$  и/или CD8 $\beta$ ), включающий экспрессию в одной клетке химерного(-ых) полипептида(-ов) CD8 из нуклеотидного(-ых) конструкта(-ов), как 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, экспрессирующей вирусную последовательность нуклеиновых кислот (например, клетки PERC.6<sup>TM</sup>).

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 сетчатки, экспрессирующей вирусную последовательность нуклеиновых кислот (например, клетки PERC.6<sup>TM</sup>).

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 (например, CD8 $\alpha$  и/или CD8 $\beta$ ) и по меньшей мере трансмембранный и цитоплазматический домены нечеловеческого белка CD8, например мышинового белка CD8. Пример химерного полипептида CD8 $\alpha$  представлен в SEQ ID NO: 88, а пример химерного белка CD8 $\beta$  представлен в SEQ ID NO: 83.

Также предложен гуманизированный белок TCR, продуцируемый не относящимся 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. 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<sub>H</sub>). В одном варианте осуществления клетка T<sub>H</sub> представляет собой эффекторную клетку T<sub>H</sub>, например клетку T<sub>H</sub>1 или клетку T<sub>H</sub>2. В одном варианте осуществления клетка представляет собой Т-клетку CD8+. В одном варианте осуществления клетка представляет собой цитотоксическую Т-клетку. Также предложена нечеловеческая клетка, которая экспрессирует белок TCR, содержащий человеческий вариабельный участок и нечеловеческий константный участок. Белок TCR может содержать TCR $\alpha$ , TCR $\beta$  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 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 (b) белок TCR, содержащий человеческий вариабельный 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 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 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 из CHO, COS, 293, HeLa и клетки сетчатки, экспрессирующей вирусную последовательность нуклеиновых кислот (например, клетки PERC.6<sup>TM</sup>).

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 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 мышинные белки H-2K, H-2A и H-2E, последовательностью нуклеиновых кислот, кодирующей химерные человеческие/мышинные 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 $\alpha$  и/или CD8 $\beta$ ), ген, кодирующий гуманизированный полипептид МНС I (например, МНС I  $\alpha$  и/или  $\beta$ 2-микроглобулина), ген, кодирующий гуманизированный полипептид МНС II (например, МНС II  $\alpha$  и/или МНС II  $\beta$ ), и/или неперестроенный гуманизированный локус TCR, кодирующий
- 30 гуманизированный полипептид TCR $\alpha$  и/или TCR $\beta$ , описанные в настоящем документе. В одном варианте осуществления индуцированная плюрипотентная клетка получена из не относящегося к человеку животного, описанного в настоящем документе.

- В одном аспекте предложена гибридома или квадрома, полученная из не относящегося к человеку животного, описанного в настоящем документе. В одном
- 35 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

- 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 корцептора содержит по меньшей мере трансмембранный и цитоплазматический домены нечеловеческого Т-клеточного корцептора, 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 переменного локуса гена Т-клеточного рецептора (TCR)  $\alpha$ , содержащего по меньшей мере один человеческий сегмент V $\alpha$  и по меньшей мере один человеческий сегмент J $\alpha$ , функционально связанный с нечеловеческой константной последовательностью гена TCR $\alpha$ , и/или неперестроенный переменный локус гена TCR $\beta$ , 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 связанный с нечеловеческой константной последовательностью гена TCR $\beta$ ; и необязательно (c) включение в геном первой последовательности нуклеиновых кислот, кодирующей первый химерный человеческий/нечеловеческий полипептид МНС, второй
- 10 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  $\beta$ 2-микроглобулина, кодирующего человеческий или гуманизированный полипептид  $\beta$ 2-микроглобулин. В некоторых вариантах осуществления этапы внедрения, вставки и/или включения включают нацеливание на последовательности, кодирующие внеклеточный(-ые) домен(-ы) Т-клеточного корцептора, переменный(-ые) домен(-ы) TCR, внеклеточный(-ые) домен(-ы) полипептида МНС или участок  $\beta$ 2-микроглобулина, и замещение их последовательностями, кодирующими человеческий
- 25 (-ие) внеклеточный(-ые) домен(-ы) Т-клеточного корцептора, человеческие переменные домены TCR, человеческий(-ие) внеклеточный(-ые) домен(-ы) МНС и/или человеческий участок  $\beta$ 2-микроглобулина соответственно.

В других вариантах осуществления внедрение, вставка, включение и/или добавление могут включать разведение, например скрещивание, животных одного вида. В других 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

30 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

35 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

40 конструктор, полученный по технологии VELOCIGENE®, причем конструктор внедряют в ЭС-клетки, а нацеленные ЭС-клеточные клоны внедряют в мышинный эмбрион по технологии VELOCIMOUSE®, как описано в примерах. Нацеливающий конструктор 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 5 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 быть фланкирована сайтами рекомбинации, которые позволяют 10 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 15 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 20 фрагмента ДНК. В другом варианте осуществления кассета селекции расположена в участке соединения человеческого и мышинного 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, 25 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 30 CD4 мыши таким образом, чтобы обеспечить экспрессию химерного человеческого/мышинного 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/ 35 нечеловеческий полипептид CD4. В одном аспекте способа химерный человеческий/мышинный полипептид CD4 содержит весь или по существу весь внеклеточный домен человеческого полипептида CD4 и по меньшей мере трансмембранный и цитоплазматический домены эндогенного мышинного полипептида CD4. В другом аспекте способа химерный человеческий/нечеловеческий полипептид CD4 содержит 40 все или по существу все из доменов D1-D2 человеческого полипептида CD4. В еще одном варианте осуществления химерный человеческий/мышинный полипептид CD4 содержит все или по существу все из доменов D1-D3 человеческого полипептида CD4. В еще одном варианте осуществления химерный человеческий/мышинный полипептид CD4 содержит всю или по существу всю аминокислотную последовательность человеческого CD4, 45 которая отвечает за взаимодействие с МНС II и/или внеклеточным доменом Т-клеточного рецептора. В еще одном варианте осуществления химерный человеческий/мышинный полипептид CD4 содержит всю или по существу всю аминокислотную последовательность человеческого CD4, которая отвечает за взаимодействие с МНС

II и/или варибельным доменом Т-клеточного рецептора.

Таким образом, предложен нуклеотидный конструктор 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, мышьиной) геномной последовательности CD4. Пример конструктора 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 $\alpha$  и/или CD8 $\beta$ . 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/мышьиного 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 $\alpha$ , CD8 $\beta$  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 мышьиного полипептида CD8.

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

В связи с близким хромосомным расположением генов, кодирующих CD8 $\alpha$  и CD8 $\beta$ , последовательное нацеливание двух генов повышает шансы на успешную гуманизацию. В одном варианте осуществления стратегия нацеливания включает внедрение химерного конструктора CD8 $\beta$ , 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 $\alpha$ , описанного в настоящем документе, в указанные генетически модифицированные ЭС-клетки. В другом варианте осуществления стратегия нацеливания включает внедрение химерного конструкта CD8 $\beta$ , описанного в настоящем документе, в ЭС-клетки, отбор клеток, в которые был внедрен химерный конструкт CD8 $\beta$ , внедрение химерного конструкта CD8 $\alpha$ , описанного в настоящем документе, в ЭС-клетки, в которые был внедрен химерный конструкт CD8 $\beta$  и которые его содержат, и отбор клеток, в которые были внедрены оба химерных рецептора: CD8 $\beta$  и CD8 $\alpha$ . В одном аспекте данного варианта осуществления этапы отбора выполняют с использованием разных селективных маркеров. В альтернативных вариантах осуществления сначала может быть выполнена гуманизация CD8 $\alpha$ . 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 модифицированного не относящегося к человеку животного приводит к получению животного, в геноме которого содержится гуманизированный неперестроенный локус TCR (например, гуманизированный неперестроенный локус TCR $\alpha$ , TCR $\beta$ , TCR $\delta$  и/или TCR $\gamma$ ). В одном варианте осуществления предложен способ создания генетически модифицированного не относящегося к человеку животного (например, грызуна, 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 $\alpha$  неперестроенным гуманизированным вариабельным локусом гена TCR $\alpha$ , содержащим по меньшей мере один человеческий сегмент V $\alpha$  и по меньшей мере один человеческий сегмент J $\alpha$ , при этом гуманизированный вариабельный локус гена TCR $\alpha$  функционально связан с эндогенным константным участком TCR $\alpha$ ; вставку, например замещение, у второго не относящегося к человеку животного эндогенного нечеловеческого вариабельного локуса гена TCR $\beta$  неперестроенным гуманизированным вариабельным локусом гена TCR $\beta$ , содержащим по меньшей мере один человеческий сегмент V $\beta$ , один человеческий сегмент D $\beta$  и один человеческий сегмент J $\beta$ , при этом гуманизированный вариабельный локус гена TCR $\beta$  функционально связан с эндогенным константным участком TCR $\beta$ ; и скрещивание первого и второго не относящихся к человеку животных 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 $\alpha$ , или не относящегося к человеку животного, в геноме которого содержится гуманизированный неперестроенный локус TCR $\beta$ . В различных вариантах осуществления замещения выполнены в эндогенных локусах. В различных вариантах осуществления способ включает последовательную стратегию гуманизации, при которой конструкт,

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

5 В описании также предложен способ модификации варибельного локуса гена TCR (например, локуса гена TCR $\alpha$ , TCR $\beta$ , TCR $\delta$  и/или TCR $\gamma$ ) 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 варибельного 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 варибельного локуса гена TCR неперестроенным гуманизированным варибельным локусом гена TCR. В одном варианте осуществления, в котором варибельный локус гена TCR представляет собой  
15 варибельный локус гена TCR $\alpha$ , неперестроенный гуманизированный варибельный локус гена TCR содержит по меньшей мере один человеческий сегмент V $\alpha$  и по меньшей мере один человеческий сегмент J $\alpha$ . В одном варианте осуществления, в котором варибельный локус гена TCR представляет собой варибельный локус гена TCR $\beta$ , неперестроенный гуманизированный варибельный локус гена TCR содержит по  
20 меньшей мере один человеческий сегмент V $\beta$ , по меньшей мере один человеческий сегмент D $\beta$  и по меньшей мере один человеческий сегмент J $\beta$ . В различных аспектах неперестроенный гуманизированный варибельный локус гена TCR функционально связан с соответствующим эндогенным нечеловеческим константным участком TCR.

Таким образом, также предложены нуклеотидные конструкторы для создания  
25 генетически модифицированных животных, содержащих гуманизированные гены варибельного участка TCR. В одном аспекте нуклеотидный конструктор содержит: гомологичные плечи на 5'- и 3'-концах, фрагмент ДНК, содержащий человеческий (-ие) сегмент (-ы) гена варибельного участка TCR, и каскету селекции, фланкированную сайтами рекомбинации. В одном варианте осуществления человеческий фрагмент ДНК  
30 представляет собой фрагмент гена TCR $\alpha$ , и он содержит по меньшей мере один человеческий сегмент варибельного участка TCR $\alpha$ . В другом варианте осуществления человеческий фрагмент ДНК представляет собой фрагмент TCR $\beta$ , и он содержит по меньшей мере один человеческий сегмент гена варибельного участка TCR $\beta$ . 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 $\alpha$  или TCR $\beta$ ).

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, мышинном локусе Н-2К и/  
40 или Н-2Е). 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  $\alpha$  и МНС  $\beta$ , 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  $\alpha$  и МНС II  $\beta$ , как описано в настоящем документе.

Таким образом, предложен нуклеотидный конструктор для создания генетически модифицированных животных, содержащих химерный человеческий/нечеловеческий МНС. В одном аспекте нуклеотидный конструктор 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 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).

В одном варианте осуществления нечеловеческие гомологичные плечи на 5'- и 3'-концах содержат геномную последовательность на 5'- и 3'-концах соответственно эндогенного нечеловеческого (например, мышинового) локуса гена МНС класса I или МНС класса II (например, в направлении 5' от первой лидерной последовательности и 3' от экзона  $\alpha 3$  мышинового гена МНС I или ближе к 5'-концу от мышинового гена H-2Ab1 и ближе к 3' концу от мышинового гена H-2Ea). В одном варианте осуществления эндогенный локус МНС класса I выбирают из мышинового H-2K, H-2D и H-2L. В конкретном варианте осуществления эндогенный локус МНС класса I представляет собой мышинный H-2K. В одном варианте осуществления эндогенный локус МНС II выбирают из мышинового H-2E и H-2A. В одном варианте осуществления созданный конструктор МНС II позволяет осуществлять замещение обоих мышинных генов H-2E и H-2A. 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 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/мышинные МНС I и МНС II.

В описании также предложены способы получения созданного методами генной инженерии не относящегося к человеку животного (например, созданного методами генной инженерии грызуна, например мыши или крысы), в геноме которого содержится локус  $\beta 2$ -микроглобулина, кодирующий человеческий или гуманизированный полипептид  $\beta 2$ -микроглобулин. В одном аспекте способы приводят к получению созданного методами генной инженерии грызуна, например мыши, в геноме которого содержится в эндогенном локусе  $\beta 2$ -микроглобулина нуклеотидная последовательность, кодирующая человеческий или гуманизированный полипептид  $\beta 2$ -микроглобулин. В некоторых примерах у мыши не экспрессируется функциональный мышинный  $\beta 2$ -микроглобулин из эндогенного мышинового локуса  $\beta 2$ -микроглобулина. В некоторых аспектах в способах применяется нацеливающий конструктор, например, полученный по технологии VELOCIGENE®, причем конструктор внедряют в ЭС-клетки, а нацеленные ЭС-клеточные клоны внедряют в мышинный эмбрион, например, по технологии VELOCIMOUSE®, как описано в настоящем документе.

Также предложен нуклеотидный конструктор, используемый для получения созданных

методами генной инженерии не относящихся к человеку животных. Нуклеотидный конструктор может содержать: гомологичные плечи на 5'- и 3'-концах, фрагмент ДНК, содержащий человеческие последовательности  $\beta 2$ -микроглобулина, и кассету селекции, фланкированную сайтами рекомбинации. В одном варианте осуществления человеческий фрагмент ДНК представляет собой геномный фрагмент, который содержит как интроны, так и экзоны человеческого гена  $\beta 2$ -микроглобулина. В одном варианте осуществления нечеловеческие гомологичные плечи гомологичны нечеловеческому локусу  $\beta 2$ -микроглобулина. Геномный фрагмент может содержать экзоны 2, 3 и 4 человеческого гена  $\beta 2$ -микроглобулина. В одном примере геномный фрагмент содержит (от 5' к 3'):

экзон 2, интрон, экзон 3, интрон и экзон 4 человеческой последовательности  $\beta 2$ -микроглобулина. Кассета селекции может быть расположена в любом месте в конструкторе за пределами кодирующего региона  $\beta 2$ -микроглобулина, например, она может быть расположена в направлении 3' от экзона 4 человеческого  $\beta 2$ -микроглобулина. Нечеловеческие гомологичные плечи на 5'- и 3'-концах могут содержать геномную последовательность на 5'- и 3'-концах эндогенного нечеловеческого гена  $\beta 2$ -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  $\beta 2$ -микроглобулина не относящегося к человеку животного (например, грызуна, например мыши или крысы) так, чтобы обеспечить экспрессию человеческого или гуманизированного полипептида  $\beta 2$ -микроглобулина, описанного в настоящем документе. Один способ модификации локуса  $\beta 2$ -микроглобулина не относящегося к человеку животного, например мыши, так, чтобы обеспечить экспрессию человеческого или гуманизированного полипептида  $\beta 2$ -микроглобулина, включает замещение в эндогенном локусе  $\beta 2$ -микроглобулина нуклеотидной последовательности, кодирующей мышинный  $\beta 2$ -микроглобулин, нуклеотидной последовательностью, кодирующей человеческий или гуманизированный полипептид  $\beta 2$ -микроглобулин. В одном варианте осуществления такого способа не относящегося к человеку животное, например мышь, не экспрессирует функциональный полипептид  $\beta 2$ -микроглобулин из эндогенного нечеловеческого, например мышинного, локуса  $\beta 2$ -микроглобулина. В некоторых конкретных вариантах осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая человеческий или гуманизированный полипептид  $\beta 2$ -микроглобулин, содержит нуклеотидную последовательность, представленную в экзонах 2-4 человеческого гена  $\beta 2$ -микроглобулина. В других вариантах осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая человеческий или гуманизированный полипептид  $\beta 2$ -микроглобулин, содержит нуклеотидные последовательности, представленные в экзонах 2, 3 и 4 человеческого гена  $\beta 2$ -микроглобулина.

Различные примеры осуществления гуманизированных локусов, описанных в 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 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,

иммуногистохимические способы и т.д. В одном примере не относящихся к человеку животных (например, мышей), несущих интересующую генетическую модификацию, идентифицируют путем скрининга на потерю мышинового аллеля и/или приобретение человеческого аллеля с помощью 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. 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.

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  $\beta$ 2-микроглобулин, может быть получено путем скрещивания животного, содержащего химерный локус CD8 (например, химерный локус CD8 $\alpha$  и/или  $\beta$ ), как описано в настоящем документе, с животным, содержащим гуманизированный локус МНС I и/или  $\beta$ 2-микроглобулина. Животное также может быть получено путем внедрения в ЭС-клетки животного, содержащего гуманизированный локус МНС I и/или  $\beta$ 2-микроглобулина, нуклеотидной последовательности, кодирующей химерный CD8 (например, химерный CD8 $\alpha$  и/или  $\beta$ ), например, для замещения в эндогенном локусе CD8 (например, химерном локусе CD8 $\alpha$  и/или  $\beta$ ); или внедрения в ЭС-клетки животного, содержащего химерный локус CD8 (например, химерный локус CD8 $\alpha$  и/или  $\beta$ ), нуклеотидной (-ых) последовательности (-ей), кодирующей (-их) гуманизированный МНС I и/или  $\beta$ 2-микроглобулин.

В некоторых вариантах осуществления животное, содержащее химерный локус CD8, может быть сначала скрещено с животным, содержащим гуманизированный варибельный локус гена TCR, для получения животного, содержащего гуманизированные локусы CD8 и варибельного участка TCR, которое после этого может быть скрещено с животным, содержащим гуманизированные локусы МНС I и/или  $\beta$ 2 микроглобулина, для получения животного, содержащего гуманизированные локусы МНС I, варибельного гена TCR и/или  $\beta$ 2-микроглобулина. Альтернативно животное, содержащее гуманизированные локусы МНС I и/или  $\beta$ 2-микроглобулина, может быть сначала скрещено с животным, содержащим гуманизированный варибельный локус гена TCR, для получения животного, содержащего гуманизированные локусы МНС I и варибельного участка TCR, которое после этого может быть скрещено с животным, содержащим химерный локус CD8, для получения животного, содержащего гуманизированные локусы МНС I, варибельного гена TCR и/или  $\beta$ 2-микроглобулина соответственно.

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 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 MHC II, для получения животного, содержащего гуманизированные локусы CD4, MHC II и вариабельного гена TCR. Альтернативно животное, содержащее гуманизированный локус MHC II, может быть сначала скрещено с животным, содержащим гуманизированный вариабельный локус гена TCR, для получения животного, содержащего гуманизированные локусы MHC II и вариабельного участка TCR, которое после этого может быть скрещено с животным, содержащим химерный локус CD4, для получения животного, содержащего гуманизированные локусы MHC II, вариабельного гена TCR и/или  $\beta$ 2-микроглобулина соответственно.

В некоторых вариантах осуществления не относящееся к человеку животное, содержащее химерный человеческий/нечеловеческий CD8, описанный в настоящем документе, и гуманизированный MHC I и/или  $\beta$ 2-микроглобулин, скрещивают с животным, содержащим химерный локус CD4, описанный в настоящем документе, и животным, содержащим гуманизированный локус MHC II, для получения не относящегося к человеку животного, содержащего химерные полипептиды CD4 и CD8 и гуманизированные молекулы MHC I (и/или  $\beta$ 2-микроглобулина) и MHC II. В некоторых вариантах осуществления животное, содержащее химерные человеческие/нечеловеческие полипептиды CD4 и CD8 и гуманизированные молекулы MHC I и MHC 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 MHC I (и/или  $\beta$ 2-микроглобулина) и MHC II 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, CD8 $\alpha$  и/или CD8 $\beta$ ); химерный человеческий/нечеловеческий CD4; человеческий или гуманизированный MHC I; человеческий или гуманизированный  $\beta$ 2-микроглобулин; человеческий или гуманизированный MHC II (например, MHC II $\alpha$  и/или MHC II $\beta$ ) и человеческий или гуманизированный TCR (например, TCR $\alpha$  и/или TCR $\beta$ ). Соответственно, животное может быть гетерозиготным или гомозиготным по любому или всем из этих генов.

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 MHC II и/или гуманизированные CD8 и MHC I (и  $\beta$ 2-микроглобулин), представляют пептиды 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 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 рестриктированный 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 рестриктированную 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 рестриктированной 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 рестриктированной 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 рестриктированный по HLA класса I или класса II иммунный ответ, включающий воздействие на мышь, описанную в настоящем документе, гипотетического антигена и измерение антиген-специфичного рестриктированного 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 приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 75%, по 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 $\alpha$ , TCR $\beta$ , TCR $\gamma$  и/или TCR $\delta$ . В некоторых вариантах осуществления у не относящегося к человеку животного, описанного в настоящем 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 приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 97% или по меньшей мере приблизительно 99% всех функциональных человеческих сегментов гена TCR V $\alpha$ ;

(ii) 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 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 $\alpha$ ;

(iii) 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 приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 97% или по меньшей мере приблизительно 99% всех функциональных человеческих сегментов гена TCR V $\beta$ ;

(iv) 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 приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 97% или по меньшей мере приблизительно 99% всех функциональных человеческих сегментов гена TCR D $\beta$ ; и/или

(v) 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

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 $\beta$ .

В одном варианте осуществления у мыши продуцируется набор Т-клеток, содержащий  
 5 все или по существу все функциональные человеческие сегменты гена TCR V $\alpha$  и содержащий все или по существу все функциональные человеческие сегменты гена TCR V $\beta$ . В одном варианте осуществления у мыши, предложенной в настоящем документе, человеческие гены TCR V $\alpha$  и/или V $\beta$  используются с частотой, аналогичной частоте использования человеческих генов TCR V $\alpha$  и/или V $\beta$  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/мышинный) 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  
 30 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  
 40 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.

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

инфильтрирующих 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 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; Linnemann 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 карциноме; и адоптивный перенос TIL специфически не направлен на конкретные опухолеассоциированные антигены (ТАА). Linnemann 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 ТАА. Текущая генная терапия TCR основана на выявлении

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  $\alpha$  и  $\beta$  TCR, специфичного к эпитопам ассоциированного с меланомой антигена MART-1, и 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, 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 аутоантигенами, и TCR, нацеливающиеся на эти антигены, часто либо удаляются, либо обладают субоптимальной аффинностью, 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 варибельный локус гена TCR. Не относящееся к человеку животное, описанное в 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 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 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,

интересующим антигеном; что позволяет формировать у животного иммунный ответ; выделение из животного Т-клетки, реагирующей на интересующий антиген; определение последовательности нуклеиновых кислот человеческого переменного участка TCR, экспрессированного Т-клеткой; клонирование человеческого переменного участка TCR в нуклеотидный конструкт, содержащий последовательность нуклеиновых кислот человеческого константного участка TCR, так, что человеческий переменный 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 переменного участка TCR, экспрессированного Т-клеткой, клонирования человеческого переменного 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.

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.6™ 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](http://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.

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.

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 варибельного участка TCR $\alpha$  и/или TCR $\beta$ ); третьей и/или четвертой последовательности нуклеиновых кислот, кодирующей человеческий перестроенный ген варибельного участка TCR $\delta$  или ген варибельного участка TCR $\gamma$ , 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 варибельного участка TCR $\alpha$  человеческого перестроенного ген варибельного участка TCR $\beta$ , ген варибельного участка, TCR $\delta$  или ген варибельного участка TCR $\gamma$ , в экспрессионный вектор (например, ретровирусный вектор), например, необязательно при этом первую,

20 вторую, третью и/или четвертую последовательность нуклеиновых кислот, соответственно кодирующую человеческий перестроенный ген варибельного участка TCR $\alpha$ , человеческий перестроенный ген варибельного участка TCR $\beta$ , ген варибельного участка TCR $\delta$  или ген варибельного участка TCR $\gamma$ , соответственно клонируют в

25 пределах рамки считывания с человеческим константным геном TCR $\alpha$ , человеческим константным геном TCR $\beta$ , константным геном TCR $\delta$  или константным геном TCR $\gamma$ , 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 относящегося 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 варибельного домена Т-клеточного рецептора, экспрессируемого Т-клетками, клонирование варибельного домена Т-клеточного рецептора, кодирующей последовательности, 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 инфузию Т-клеток субъекта, несущих Т-клеточный рецептор, субъекту.

Кроме того, в настоящем документе предложено использование не относящегося к человеку животного, описанного в настоящем документе, для получения последовательностей нуклеиновых кислот, кодирующих человеческие варибельные домены TCR (например, варибельные домены TCR  $\alpha$  и/или  $\beta$ ). В одном варианте осуществления предложен способ получения последовательности нуклеиновых кислот, кодирующей человеческий варибельный 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 варибельный домен TCR, который связывается с интересующим антигеном. В одном варианте осуществления способ дополнительно включает получение последовательности нуклеиновых кислот, кодирующей человеческий варибельный 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 варибельный домен TCR, связанный с нечеловеческим константным участком TCR, а также клонирование последовательности (-ей) нуклеиновых кислот, кодирующей (-их) варибельный домен TCR (например, первой, второй, третьей или четвертой последовательности нуклеиновых кислот соответственно, кодирующей человеческий перестроенный ген варибельного участка TCR $\alpha$ , человеческий перестроенный ген варибельного участка TCR $\beta$ , ген варибельного участка TCR $\delta$  или ген варибельного участка TCR $\gamma$ ) в пределах рамки считывания с соответствующим человеческим геном константного участка (например, человеческим геном константного участка TCR $\alpha$ , человеческим геном константного участка TCR $\beta$ , человеческим геном константного участка TCR $\delta$  или геном варибельного участка TCR $\gamma$  соответственно).

Таким образом, в настоящем документе предложены последовательности нуклеиновых кислот варибельного участка TCR, такие как перестроенные варибельные последовательности нуклеиновых кислот TCR, например перестроенные последовательности нуклеиновых кислот варибельного участка TCR $\alpha$  и/или TCR $\beta$ , продуцируемые не относящимися к человеку животными, описанными в настоящем документе, и кодируемые соответственно, например, человеческой перестроенной последовательностью гена V $\alpha$ /J $\alpha$  и человеческой перестроенной последовательностью гена V $\beta$ D $\beta$ J $\beta$ . Также предложены аминокислотные последовательности варибельного участка TCR, кодируемые такими перестроенными последовательностями нуклеиновых

кислот варибельного участка TCR. Такие перестроенные последовательности нуклеиновых кислот варибельного участка TCR (последовательности нуклеиновых кислот варибельного участка TCR $\alpha$  и/или TCR $\beta$ ), полученные от не относящихся к человеку животных, описанных в настоящем документе, могут быть клонированы в функциональной взаимосвязи с человеческим константным участком TCR (константный участок TCR $\alpha$  и/или TCR $\beta$ ) 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 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, получение из Т-клеток последовательности (-ей) нуклеиновых кислот, кодирующей (-их) гуманизированный белок TCR или человеческий варибельный домен TCR, который связывается с интересующим антигеном, и использование последовательности (-ей) нуклеиновых кислот, кодирующей (-их) гуманизированный белок TCR или человеческий варибельный домен TCR, для создания терапевтического средства для человека.

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 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 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 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 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 варибельных участков TCR для использования в качестве терапевтических агентов были приложены значительные усилия. Создание растворимых Т-клеточных рецепторов зависит от получения перестроенных варибельных участков TCR. Одним из подходов является создание одноцепочечных TCR, содержащих TCR $\alpha$  и TCR $\beta$ , 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 $\alpha/\beta$ . Альтернативные подходы включали создание растворимого TCR,

5 имеющего константные домены TCR $\beta$  (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 20 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 25 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 30 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 35 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). 40

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/ 45 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, мышинный ген H-2K был гуманизирован в одну стадию посредством конструирования уникального нацеливающего вектора из ДНК человеческой и мышинной 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 мышинового клона BAC RP23-173k21 (Invitrogen) модифицировали путем гомологичной рекомбинации с замещением геномной ДНК, кодирующей домены  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  и  $\alpha 3$  мышинового гена H-2K, человеческой геномной ДНК, кодирующей субъединицы  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  и  $\alpha 3$  человеческого гена HLA-A (ФИГ. 2А).

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

Конечный конструктор для нацеливания на эндогенный локус гена H-2K включал (от 5' к 3'): (1) гомологичное плечо на 5'-конце, содержащее ~ 200 п.н. мышинной 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/ $\alpha 1$  интрон HLA-A\*0201, экзон  $\alpha 1$  HLA-A\*0201, интрон  $\alpha 1$ - $\alpha 2$  HLA-A\*0201, экзон  $\alpha 2$  HLA-A\*0201, ~ 316 п.н. 5'-конца интрона  $\alpha 2$ - $\alpha 3$ ; (3) сайт 5' loxP; (4) гигромициновую кассету; (5) сайт 3' loxP; (6) ~ 580 п.н. человеческой геномной последовательности, включающей ~ 304 п.н. 3'-конца интрона  $\alpha 2$ - $\alpha 3$ , экзон  $\alpha 3$  HLA-A\*0201; и (7) гомологичное плечо на 3'-конце, содержащее ~ 200 п.н. мышинной геномной последовательности, включая интрон между последовательностями, кодирующими мышинный H-2K  $\alpha 3$  и трансмембранный домен. Последовательность из 149 нуклеотидов в участке соединения мышинной/человеческой последовательностей на 5'-конце нацеливающего вектора представлена в SEQ ID NO: 90, а последовательность из 159 нуклеотидов в участке соединения человеческой/мышинной последовательностей на 3'-конце нацеливающего вектора представлена в SEQ ID NO: 91. Гомологичная рекомбинация с этим нацеливающим вектором позволила создать модифицированный мышинный 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 мышинового H-2K, что при трансляции приводит к образованию химерного человеческого/мышинового белка МНС класса I. Кассета селекции, присутствующая в нацеливающем конструкторе, может быть впоследствии удалена различными способами, известными в данной области.

Нацеленную ДНК ВАС использовали для электропорации мышинных ЭС-клеток F1H4 с созданием модифицированных ЭС-клеток для получения мышей, у которых экспрессируется химерный белок МНС класса I на поверхности ядросодержащих клеток (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 TAQMAN™ (Valenzuela et al. (2003), выше).

Для создания мышей, экспрессирующих химерный МНС I, нацеленные ЭС-клетки, описанные в настоящем документе, использовали в качестве донорских ЭС-клеток и внедряли в мышинный 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 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, использовали на дополнительных этапах конструирования, описанных в примерах 1.2-1.3, для создания мышей, содержащих гуманизированные локусы MHC I и MHC II и не содержащих эндогенные локусы MHC I и MHC II (см. ФИГ. 3А).

Пример 1.2. Создание мышинных ЭС-клеток, содержащих делеции локусов MHC I и MHC II

Делеция эндогенных локусов MHC II описана в публикации заявки на патент США №20130111616, включенной в настоящий документ путем ссылки. Вкратце, нацеливающий вектор для внедрения делеции эндогенных генов MHC 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 Valenzuela et al., выше). ДНК искусственной бактериальной хромосомы (BAC) RP23-458i22 (Invitrogen) была модифицирована с удалением эндогенных генов MHC класса II H-2Ab1, H-2Aa, H-2Eb1, H-2Eb2 и H-2Ea.

В частности, нижележащее и вышележащее гомологичные плечи были получены с помощью ПЦР мышинной ДНК BAC 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 MHC класса II путем бактериальной гомологичной рекомбинации (BHR). Данную область заменили неомициновой кассетой, фланкированной сайтами lox2372. Конечный нацеливающий вектор включал (от 5' к 3') гомологичное плечо 26 т.п.н., содержащее мышиную геномную последовательность ближе к 5'-концу от гена H-2Ab1 эндогенного локуса MHC класса II, сайт lox2372 5', неомициновую кассету, сайт lox2372 3' и гомологичное плечо 63 т.п.н., содержащее мышиную геномную последовательность ближе к 3'-концу от гена H-2Ea эндогенного локуса MHC класса II.

Нацеливающий вектор ДНК BAC (описанный выше) использовали для электропорации мышинных ЭС-клеток, содержащих гуманизированный локус MHC I (из примера 1.1 выше; см., например, этап 2 на ФИГ. 3А), для создания модифицированных ЭС-клеток, содержащих делецию эндогенного локуса MHC класса II (удалены как H-2A, так и H-2E). Положительные ЭС-клетки, содержащие удаленный эндогенный локус MHC класса II, идентифицировали посредством количественного анализа ПЦР с использованием зондов TAQMAN™ (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 (CAGAACGCCAGGCTGTAAC; SEQ ID NO: 1) и 5111U R (GGAGAGCAGGGTCACTCAAC; 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 5111D F (GTGGGCACCATCTTCATCATTC; SEQ ID NO: 4) и 5111D R (CTTCCTTTCCAGGGTGTGACTC; SEQ ID NO: 5) и зонда 5111D P (AGGCCTGCGATCAGGTGGCACCT; SEQ ID NO: 6). Присутствие неомициновой кассеты из нацеливающего вектора подтверждали с использованием NEOF (GGTGGAGAGGCTATTCGGC; SEQ ID NO: 7) и NEOR (GAACACGGCGGCATCAG; SEQ ID NO: 8) и зонда NEOP (TGGGCACAACAGACAATCGGCTG; 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: (TTTGTAACA AAGTCTACCC AGAGACAGAT GACAGACTTC AGCTCCAATG  
 5 CTGATTGGTT CCTCACTTGG GACCAACCCT) ACCGGTATAA CTCGTATAA GGTATCCTAT ACGAAGTTAT ATGCATGGCC TCCGCGCCGG. Нуклеотидная последовательность, проходящая через точку делеции ближе к 3'-концу (SEQ ID NO: 11), включала нижеследующее, что обозначает последовательность кассеты, смежную с эндогенной мышиной последовательностью ближе к 3'-концу от точки делеции  
 10 (находящейся в скобках ниже): CGACCTGCAG CCGGCGCGCC 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.

При удалении мышинного локуса H-2D BHR использовали для модификации мышинного  
 20 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 мышинного 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'.

Нацеливающий вектор ДНК BAC (описанный выше) использовали для  
 25 электропорации мышинных ЭС-клеток, содержащих гуманизированный локус МНС I и делецию мышинного 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 TAQMAN™ для обнаружения удаленного локуса H-2D**

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

**Пример 1.3. Внедрение химерного человеческого/мышинного локуса МНС II**

Для создания вектора, содержащего гуманизированный HLA-DR2/H-2E, сначала мышинный 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 мышинного гена H-2Eb, синтезированную человеческую цепь  $\beta$  HLA-DR2 (DRB1\*1501) использовали для создания вектора, содержащего экзоны и интроны DR $\beta$ 1\*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 мышинной/человеческой последовательностей, участки соединения человеческой/мышинной последовательностей или участки соединения мышинной 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), мышинные 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 CTTCATCCC GA <b>CCGCGG</b> (CCCA ATCTCTCTCC ACTACTTCCT GCCTACATGT ATGTAGGT)
19	(CAAGGTTTCC TCCTATGATG CTTGTGTGAA ACTCGG) <b>GGCC GGCC</b> AGCATTTAAC AGTACAGGGA TGGGAGCACA GCTCAC
20*	(GAAAGCAGTC TTCCCAGCCT TCACACTCAG AGGTACAAAT) CCCCATTTTC ATATTAGCGA TTTTAATTTA TTCTAGCCTC
21*	TCTTCCSTAA CTCCCATTCT ATGCTCTTCC ATCCCGA <b>CCG CGG</b> (CCCAATC TCTCTCCACT ACTTCCTGCC TACATGTATG)
22	GAGTTCCTCCATCACTTCACTGGGTAGCACAGCTGTAACGTGCCAGCCTG (TCCTGGGCTGCAGGTGGTGGGCGTTGCGGGTGGGGCCGGTTAAGGTTCCA)

23	(TCCCACATCCTATTTTAATTGCTCCATGTTCTCATCTCCATCAGCACAG) CTCGAG ATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAAGTTAT ATGCATGGCC
24	ATACGAAGTTAT GCTAGTAACTATAACGGTCCTAAGGTAGCGAGTGGCTT ACAGGTAGGTGCGTGAAGCTTCTACAAGCACAGTTGCCCCCTGGGAAGCA

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-2Еа экзон 1 и остальную часть интрона 1 аллеля C57BL/6 H-2Еа замещали эквивалентной областью 2616 п.н., начиная от аллеля BALB/c H-2Еа. Это выполнялось в связи с тем, что экзон 1 аллеля C57BL/6 H-2Еа содержит делению, которая делает ген нефункциональным, тогда как экзон 1 аллеля BALB/c H-2Еа 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 мышинных 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 функциональные эндогенные мышинные локусы H-2Е, H-2А, H-2К 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 TAQMAN™ для обнаружения гуманизации локусов МНС I и МНС II**

Название (местоположение)	Прямой праймер	Обратный праймер	Зонд
Кассета Нуг	TGCGGCCGATCTTAG CC (SEQ ID NO: 25)	TTGACCGATTCCTTG CGG (SEQ ID NO: 26)	ACGAGCGGGTTCGG 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)

5 10 15 20	7092 hTDP1 (экзон 3 DRB1*1501)	AGACCCTGGTGATGC TGGAA (SEQ ID NO: 34)	CGCTTGGGTGCTCCA CTT (SEQ ID NO: 35)	TCGAAGTGGAGAGG TTTA (SEQ ID NO: 36)
	7092 hTDP2 (экзон 3 DRB1*1501)	TGGAATGGAGTGAG CAGCTTT (SEQ ID NO: 37)	GCACGGTCCCCTTCT TAGTG (SEQ ID NO: 38)	TGACTTCCTAAATTT CTC (SEQ ID NO: 39)
	hDRAIU (экзон 2 DRA)	CTGGCGGCTTGAAGA ATTTGG (SEQ ID NO: 40)	CATGATTTCCAGGTT GGCTTTGTC (SEQ ID NO: 41)	CGATTTGCCAGCTTT GAGGCTCAAGG (SEQ ID NO: 42)
	1751jxn2 <sup>1</sup> (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)	TGCATCTCGAGCACA GGCATTTGG (SEQ ID NO: 45)

<sup>1</sup> 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/мышинный локус МНС класса I, могут быть трансфицированы конструктом, 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 мышинный 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 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 мышинных штаммах). Экспрессию обоих химерных человеческих/мышинных белков МНС I и МНС II подтверждают с использованием антител, специфичных к человеческим HLA-DR2 и HLA-A2. Гетерозиготных мышей разводили до достижения гомозиготности.

#### Пример 1.4. Создание мышей с гуманизированным $\beta 2$ -микроглобулином

Создание мышей с  $\beta 2$ -микроглобулином описано в публикации заявки на патент США №20130111617, включенной в настоящий документ путем ссылки. Вкратце, мышинный ген  $\beta 2$ -микроглобулина ( $\beta 2m$ ) гуманизировали за один этап посредством конструирования уникального нацеливающего вектора из ДНК человеческой и мышинной 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 мышинного  $\beta 2m$  из клона BAC 89C24 из библиотеки RPCI-23 (Invitrogen). Мышинные гомологичные плечи были разработаны таким образом, чтобы ограничивать человеческий фрагмент ДНК  $\beta 2m$  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), фланкированную сайтами распознавания рекомбиназы (например, сайтами loxP), внедряли в нацеливающий вектор, чтобы обеспечить возможность последующей селекции. Конечный нацеливающий вектор линейаризовывали и электропорировали в мышиную линию ЭС-клеток F1H4 (Valenzuela et al., выше).

Нацеленные ЭС-клеточные клоны с удаленной кассетой селекции лекарственными средствами (путем внедрения рекомбиназы Cre) внедряли в мышинный эмбрион на стадии 8 клеток по способу VELOCIMOUSE® (см., например, патент США №7,294,754 и публикацию Poueymirou et al., выше). Мышей VelociMice® (мышь F0, полученные полностью из донорской ЭС-клетки), несущих гуманизированный ген  $\beta 2m$ , выявляли путем скрининга для определения утраты мышинного аллеля и приобретения человеческого аллеля с использованием анализа на модификацию аллеля (см. Valenzuela et al., выше). Гетерозиготных мышей разводили до достижения гомозиготности. Экспрессию человеческого  $\beta 2$ -микроглобулина подтверждали посредством проточной цитометрии с использованием антител, специфичных к человеческому  $\beta 2$ -микроглобулину.

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

Мышей, содержащих делецию эндогенных переменных локусов TCR ( $\alpha$  или  $\beta$ ) 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 последовательности, полученные из библиотек BAC с помощью бактериальной гомологичной рекомбинации, используют для создания больших нацеливающих векторов (LTVEC), содержащих геномные фрагменты человеческих переменных локусов TCR, фланкированных нацеливающими плечами, для нацеливания LTVEC на эндогенные мышинные переменные локусы TCR в мышинных ЭС-клетках. Подробное описание гуманизации альфа- и бета-локусов TCR приведено в патенте США №9,113,616, включенном в настоящий документ путем ссылки. LTVEC повторно линейаризовывали и электропорировали в линию мышинных 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 мышинные эмбрионы на стадии 8 клеток (или ранее) по способу VELOCIMOUSE® (Poueymiro, 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

генотипировали и разводили до достижения гомозиготности. Мышей, гомозиготных

по гуманизированным вариабельным локусам TCR $\alpha$  и/или TCR $\beta$ , получают так, как

описано в настоящем документе.

#### Пример 2.1. Гуманизация альфа-локуса TCR

1,5 м.п.н. ДНК в мышинном локусе TCR $\alpha$ , соответствующих 110 V и 60 J мышинным

сегментам, замещали 1 м.п.н. ДНК, соответствующих 54 V- и 61 J-сегментам

человеческого TCR $\alpha$ , с использованием стратегии последовательной гуманизации,

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 $\alpha$ , приведены

в таблице 5 и включены в перечень последовательностей.

**Таблица 5. Соединительные последовательности нуклеиновых кислот для различных нацеливающих векторов для локуса TCR $\alpha$**

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

№ MAID	SEQ ID NO	Описание
1769	53	Соединительная последовательность нуклеиновых кислот между 3'-концом мышинной последовательности, расположенной ближе к 5'-концу от варибельного локуса TCR $\alpha$ , и 5'-концом кассеты <i>loxP</i> -Ub-Neo- <i>loxP</i> .
	54	Соединительная последовательность нуклеиновых кислот между 3'-концом кассеты <i>loxP</i> -Ub-Neo- <i>loxP</i> и 5'-концом вставки человеческих TCRV $\alpha$ 13-2–TCRV $\alpha$ 21, включая сайт AsiSI.
1770	55	Соединительная последовательность нуклеиновых кислот между 3'-концом мышинной последовательности, расположенной ближе к 5'-концу от варибельного локуса TCR $\alpha$ , и 5'-концом кассеты <i>loxP</i> -Ub-Hyg- <i>loxP</i> .
	56	Соединительная последовательность нуклеиновых кислот между 3'-концом кассеты <i>loxP</i> -Ub-Hyg- <i>loxP</i> и 5'-концом вставки человеческих TCRV $\alpha$ 6–TCRV $\alpha$ 8-5, включая сайт AsiSI.
1771	57	Соединительная последовательность нуклеиновых кислот между 3'-концом мышинной последовательности, расположенной ближе к 5'-концу, и варибельным локусом TCR $\alpha$ от 5'-конца кассеты <i>loxP</i> -Ub-Neo- <i>loxP</i> .
	58	Соединительная последовательность нуклеиновых кислот между 3'-концом кассеты <i>loxP</i> -Ub-Neo- <i>loxP</i> и 5'-концом вставки человеческих TCRV $\alpha$ 1-1–TCRV $\alpha$ 5, включая сайт AsiSI.

Человеческие сегменты варибельного участка TCR $\alpha$  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 мышинового клона BAC RP23-6A14 (Invitrogen) модифицировали путем гомологичной рекомбинации и использовали в качестве нацеливающего вектора для замещения области TCRAJ1-TCRAJ28 эндогенного мышинового локуса TCR $\alpha$  кассетой Ub-гигромицин с последующим сайтом *loxP*. ДНК из мышинового 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 мышинового локуса TCR $\alpha$  и  $\delta$ , кассетой PGK-неомицин с последующим сайтом *loxP*. ЭС-клетки, несущие дважды нацеленную хромосому (т.е. один эндогенный мышинный локус TCR $\alpha$  нацеливали обоими из этих нацеливающих векторов), идентифицировали путем кариотипирования и способов скрининга (например, TAQMAN<sup>TM</sup>), 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 мышинового локуса TCR $\alpha$  от TCRAV1 до



TCRAJ1) и оставляя только один сайт loxP, неомициновую кассету и мышинные константный и энхансерный участки. Эта стратегия приводила к созданию удаленного мышинного локуса TCR  $\alpha/\delta$  (MAID 1540, ФИГ. 4А, вторая схема).

Первый человеческий нацеливающий вектор с TCR $\alpha$  содержал 191 660 п.н.

5 человеческой ДНК из клонов ВАС CTD2216p1 и CTD2285m07 (Invitrogen), которые содержали первые два последовательных человеческих сегмента гена V TCR $\alpha$  (TRAV40 и 41) и 61 сегмент гена J (50 функциональных) TCR $\alpha$ . ВАС модифицировали путем гомологичной рекомбинации с включением 403 п.н. сайта Not1 ближе к 3'-концу от сегмента гена J1 TCR $\alpha$  для лигирования мышинного гомологичного плеча 3' и сайта AsiSI 5' для лигирования мышинного гомологичного плеча 5'. Два разных гомологичных плеча использовали для лигирования с этим человеческим фрагментом: гомологичное плечо 3' содержало эндогенные мышинные последовательности TCR $\alpha$  из клона ВАС RP23-6A14, а гомологичное плечо 5' содержало эндогенную последовательность TCR $\alpha$  ближе к 5'-концу от мышинного TCR $\alpha$ V из мышинного клона ВАС RP23-117i19. Эту мышиную-человеческую химерную ВАС использовали в качестве нацеливающего вектора (MAID 1626) для выполнения начальной вставки человеческих сегментов гена TCR $\alpha$  и кассеты loxP-ub-hygromycin-loxP ближе к 5'-концу в мышинных локусах TCR $\alpha$ . 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 мышинное плечо 5', которое включало эндогенную последовательность TCR $\alpha$  ближе к 5'-концу от мышинного TCR $\alpha$ V, из мышинного клона ВАС RP23-117i19 с чередующимися кассетами селекции loxP-неомицин-loxP и loxP-гигромицин-loxP (или frt-гигромицин-frt в случае MAID 1979). Конкретные конструкторы 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 TCR $\alpha$  содержал кассету loxP-ub-неомицин-loxP 5' и всего 54 человеческих сегмента гена TCR $\alpha$ V (45 функциональных) и 61 человеческий сегмент гена TCR $\alpha$ J, функционально связанных с мышинными константными генами и энхансерами TCR $\alpha$ . 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 TCR $\delta$  может быть повторно внедрен в последовательность TCR альфа.

35 Пример 2.2. Гуманизация варибельного локуса TCR $\beta$

0,6 м.п.н. ДНК в мышинном локусе TCR $\beta$ , соответствующих мышинным 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 TCR $\beta$ , 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 TCR $\beta$ , приведены в таблице 6 и включены в перечень последовательностей.

**Таблица 6. Соединительные последовательности нуклеиновых кислот для различных нацеливающих векторов для локуса TCR $\beta$**

№ MAID	SEQ ID NO	Описание
1625	59	Соединительная последовательность нуклеиновых кислот между 3'-концом мышинной последовательности, расположенной ближе к 5'-концу от варибельного локуса TCR $\beta$ (рядом с мышинными генами трипсиногена, расположенными ближе к 5'-концу), и 5'-концом кассеты <i>frit-Ub-Neo-frit</i> .
	60	Соединительная последовательность нуклеиновых кислот между 3'-концом кассеты <i>frit-Ub-Neo-frit</i> и 5'-концом вставки человеческого TCRV $\beta$ 18-TCRV $\beta$ 29-1.
	61	Соединительная последовательность нуклеиновых кислот между 3'-концом вставки человеческих TCRV $\beta$ 18-TCRV $\beta$ 29-1 и 5'-концом мышинной последовательности, расположенной ближе к 3'-концу от мышинных сегментов TCRV $\beta$ (рядом с мышинными генами трипсиногена, расположенными ближе к 3'-концу).
1715	62	Соединительная последовательность нуклеиновых кислот между 3'-концом нижележащих мышинных генов трипсиногена и 5'-концом вставки человеческих TCRD $\beta$ 1-TCRJ $\beta$ 1-1-TCRJ $\beta$ 1-6, включая сайт I $\kappa$ euI.

№ МАИД	SEQ ID NO	Описание
	63	Соединительная последовательность нуклеиновых кислот между 3'-концом вставки человеческих TCRD $\beta$ 1-TCRJ $\beta$ 1-1-TCRJ $\beta$ 1-6 и 5'-концом кассеты <i>loxP</i> -Ub-Hyg- <i>loxP</i> .
	64	Соединительная последовательность нуклеиновых кислот между 3'-концом кассеты <i>loxP</i> -Ub-Hyg- <i>lox</i> и 5'-концом мышиной последовательности рядом с мышинным геном C $\beta$ 1.
	65	Соединительная последовательность нуклеиновых кислот между 3'-концом мышиной последовательности рядом с мышинным геном C $\beta$ 1 и 5'-концом вставки человеческих TCRD $\beta$ 2-TCRJ $\beta$ 2-1-TCRJ $\beta$ 2-7, включая сайт NotI.
	66	Соединительная последовательность нуклеиновых кислот между 3'-концом вставки человеческих TCRD $\beta$ 2-TCRJ $\beta$ 2-1-TCRJ $\beta$ 2-7 и 5'-концом мышиной последовательности, расположенной ближе к 3'-концу от человеческого варибельного локуса TCR $\beta$ (рядом с мышиной последовательностью C $\beta$ 2).
1791	67	Соединительная последовательность нуклеиновых кислот между 3'-концом мышиной последовательности, расположенной ближе к 5'-концу от варибельного локуса TCR $\beta$ (рядом с мышинными генами трипсиногена, расположенными ближе к 5'-концу), и 5'-концом кассеты <i>frt</i> -Ub-Hyg- <i>frt</i> .
	68	Соединительная последовательность нуклеиновых кислот между 3'-концом кассеты <i>frt</i> -Ub-Hyg- <i>frt</i> и 5'-концом вставки человеческих TCRV $\beta$ 6-5-TCRV $\beta$ 17.
1792	69	Соединительная последовательность нуклеиновых кислот между 3'-концом мышиной последовательности, расположенной ближе к 5'-концу от варибельного локуса TCR $\beta$ (рядом с мышинными генами трипсиногена, расположенными ближе к 5'-концу), и 5'-концом кассеты <i>frt</i> -Ub-Neo- <i>frt</i> .
	70	Соединительная последовательность нуклеиновых кислот между 3'-концом кассеты <i>frt</i> -Ub-Hyg- <i>frt</i> и 5'-концом вставки человеческих TCRV $\beta$ 1-TCRV $\beta$ 12-2.

№ MAID	SEQ ID NO	Описание
6192	71	Соединительная последовательность нуклеиновых кислот между 3'-концом мышинной последовательности рядом с мышинным геном C $\beta$ 2 и 5'-концом человеческой последовательности экзона 2 TCRBV30.
	72	Соединительная последовательность нуклеиновых кислот между 3'-концом человеческой последовательности экзона 1 TCRBV30 и 5'-концом мышинной последовательности, расположенной ближе к 3'-концу от локуса TCR $\beta$ .

Человеческие сегменты переменного участка TCR $\beta$  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 мышинного 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 мышинном локусе TCR $\beta$ , кассетой PGK-неомицин с последующим сайтом loxP. ДНК из мышинного 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 мышинном локусе TCR $\beta$ , кассетой Ub-гигромицин с последующим сайтом loxP. ЭС-клетки, несущие дважды нацеленную хромосому (т.е. один эндогенный мышинный локус TCR $\beta$ , нацеленный обоими нацеливающими векторами), идентифицировали с помощью кариотипирования и способов скрининга (например, TAQMAN<sup>TM</sup>), известных в данной области. Модифицированные ЭС-клетки обрабатывали рекомбиназой CRE, опосредуя делецию области между сайтами loxP 5' и 3' (состоящими из эндогенного мышинного локуса TCR $\beta$  от TCRBV2 до TCRBV30) и оставляя только один сайт loxP, гигромициновую кассету и мышинные TCRBD, TCRBJ, константную и энхансерную последовательности. Один мышинный TCRV $\beta$  был оставлен ближе к 5'-концу от кластера 5' генов трипсиногена, и один мышинный TCRV $\beta$  был оставлен ближе к 3'-концу от мышинного E $\beta$ , как показано на Фиг. 4В.

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

Для замещения мышинных сегментов TCR $\beta$  D и J человеческими сегментами TCR $\beta$  D и J ДНК из мышинного 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 TCR $\beta$ V, 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 мышинный TCRBD1-J1, мышинный константный 1 и мышинный TCRBD2-J2) в

эндогенном мышинном локусе TCR $\beta$ , 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 $\beta$ , нацеленный обоими

нацеливающими векторами), идентифицировали с помощью кариотипирования и способов скрининга (например, TAQMAN<sup>TM</sup>), 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

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 мышинное плечо 5', которое содержало эндогенную последовательность TCR $\beta$ , окружающую мышинные гены трипсиногена, расположенные ближе к 5'-концу, из мышинного клона ВАС RP23-461h15 с чередующимися кассетами селекции. Конкретные конструкторы 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 $\beta$ , содержащий всего 66 человеческих сегментов TCRPV (47 функциональных) и человеческих сегментов TCR $\beta$  D и J (MAID 1792), функционально связанных с мышинными константными генами и энхансерами TCR $\beta$ . Соединительные последовательности нуклеиновых кислот (SEQ ID NO: 69 и 70) для нацеливающего вектора MAID 1792 описаны в таблице 6.

Мышиный TCRBV31 расположен приблизительно на 9,4 т.п.н. ближе к 3'-концу от 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 мышиный клон ВАС, содержащий мышиный TCRBV31, модифицировали путем бактериальной гомологичной рекомбинации с получением LTVEC MAID 6192. Весь кодирующий регион, начинающийся со старт-кодона в экзоне 1, интрон, 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 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 мышинного аллеля TCRB31 и приобретение человеческого аллеля TCRB30.

Аналогичная генно-инженерная стратегия используется для необязательной делеции оставшегося 5' мышинного сегмента V TCR $\beta$ .

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

Мышей, гомозиготных по гуманизированному вариабельному локусу TCR $\alpha$ , скрещивали с мышами, гомозиготными по гуманизированному вариабельному локусу TCR $\beta$ , с получением потомства, содержащего гуманизированные вариабельные локусы TCR $\alpha$  и TCR $\beta$ . Потомство разводили до достижения гомозиготности по гуманизированным локусам TCR $\alpha$  и TCR $\beta$ .

Подтверждали, что у мышей, содержащих гуманизированные вариабельные локусы TCR $\alpha$  и TCR $\beta$ , 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, мышинный локус CD4 гуманизировали за один этап путем конструирования уникального нацеливающего вектора из ДНК человеческой и мышинной 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, линейаризовывали с помощью NotI и электропорировали в мышинные 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 мышинного 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 интрона 3 с кассетой lox-нео (5'-конец кассеты) представлена в SEQ ID NO: 75, а последовательность участка соединения кассеты lox-нео (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-нео, показанную на Фиг. 5А, представлена в SEQ ID NO: 77. Кассета pgk-нео 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).

40

45

**Таблица 7. Соединительные последовательности нацеливающего вектора, содержащего химерный CD4**

Соединение	Последовательность	SEQ ID NO
Мышиный/ человеческий участок соединения ближе к 5'-концу	AGGGGAAACCCGCAAAGGATGGGACATAGGGAGA CAGCTGTTAACATCTGAAACATGACCTTCTTTCTG TGCAGCACAACCTCCTAGCTGTCACTCAAGGG(AAGA AAGTGGTGCTGGGCAAAAAGGGGATACAGTGGA CTGACCTGTACAGCTTCCCAGAAGAAGAGCATACA ATTCCACTGGAAAACTCCAACCAGAT)	73
Человеческий/ мышинный участок соединения ближе к 3'-концу	(CTGGTCACCTGGATGAAGTGAGGGAGGGCCCTCTG GGTTTGGGGCTGGTTTGAAGTGAAGACATCCATGAG CCAGCCTGGGGCTGGCTTCACTGAAGATC) <b>ATCTAT</b> <b>GTCGGGTGCGGAGAAAGAGGTAATGAAATGGCA</b> CATGCTATGTACAACTCTATTGCTGAGCAGCACCC AGTCCTGAGCTGGCTCTGAATTGAGGGTGAAATTCA CACATTCTCCCCCAACATCTATAATCTGG	74
Человеческая последовательность/ сайт lox 5'	(TATGGAGTGAAAGCCTTTGGTGTCTGAGATCTGGT CTTAGTTAAACTCTGGGATC) <b>GGCGCGCCGAATTCCT</b> <b>GCAGCCCGGGCTCGAGATAACTTCGTATAATGTATGCT</b> <b>ATACGAAGTTATATGCATCCGGGTAGGGGAGGCGCTTT</b> <b>TCCC</b>	75
Сайт lox 3'/ человеческий	<b>AGTATTGTTTTGCCAAGTTCTAATTCCATCAGACCTCGA</b> <b>CCTGCAGCCCTAGATAACTTCGTATAATGTATGCTATAC</b> <b>GAAGTTATCCTAGG</b> (CCAGAGGGCTTGGGTTGACAGA AACTCAGTGGCATTCTTATCCAGAGTTTCTCTACAC 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 плазмиды, 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 мышинового гена CD4.

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

5 Мышей VELOCIMOUSE® (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 $\alpha$  и CD8 $\beta$  колокализуют в геноме, например, на мышинной 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 $\beta$ , с последующим внедрением второго гена, например, CD8 $\alpha$ . Конкретные подробные этапы гуманизации описаны в публикации заявки на патент США №20140245466, включенной в настоящий документ путем ссылки.

20 Вкратце, мышинный локус CD8 $\beta$  гуманизировали за один этап путем конструирования уникального нацеливающего вектора из ДНК мышинной бактериальной искусственной хромосомы по технологии VELOCIGENE®. ДНК из BAC RP23-431M6 модифицировали путем BHR с получением большого нацеливающего вектора (LTVEC) (MAID 1737), содержащего замещение мышинных экзонов 2-3, кодирующих эктодомен CD8 (от участка  
25 соединения 5' в интроне 1 до участка соединения 3' в интроне 3), гомологичными человеческими последовательностями (ФИГ. 5B). Кассету loxp-Ub-Hyg вставляли на участке соединения 3' в интроне 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 $\beta$  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 $\beta$**

Соединение	Последовательность	SEQ ID NO
Мышиная/человеческая в интроне 1	TGTTTGCCTGTGACATGAACTCATTGTGACACAAA CCACTGTGCTAGGGGGGATCCACTAGTAACGGC CGCCAGTGTGCTGGAATTGCCCC(TCGCAAGGG CCAGGCATATAAGTACACAATAAACAATGGCAG CTCTCTCC)	80



Человеческая/5'-конец сайта lox в интроне 3	(CCCCTCCTTCCTTCCCCAGGCACTTTCCAAGTGTC AACTCTAGAGCCTAT)CGCGGCCGCAACCGGTATA ACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTAT	81
3'-конец сайта lox/мышинная в интроне 3	ATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTATGTCG ACGTAGCCTATTTCTCTAGATCCAAAATGATGACA 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 мышинные ЭС-клетки F1H4. Нацеленные ЭС-клетки, несущие гуманизированный локус CD8 $\beta$ , выявляли путем генотипирования с использованием анализа на модификацию аллеля (Valenzuela et al.), который обнаруживал присутствие человеческого гена CD8 $\beta$ .

Мышинный локус CD8 $\alpha$  гуманизировали за один этап путем конструирования уникального нацеливающего вектора из ДНК мышинной бактериальной искусственной хромосомы по технологии VELOCIGENE®. ДНК из BAC RP23-431M6 модифицировали путем BHR с получением большого нацеливающего вектора (LTVEC) (MAID 1738), содержащего замещение мышинных экзонов 1-2, кодирующих эктодомен CD8 $\alpha$  (от участка соединения 5' в кодоне 27 Ala в мышинном экзоне 1 до участка соединения 3' в мышинном интроне 2), гомологичными человеческими последовательностями (от участка соединения 5' в человеческом экзоне 2 до участка соединения 3' в интроне 3 (Фиг. 5А)). Это обеспечивает сохранение мышинной лидерной последовательности в начале экзона 1. Кассету lox2372-Ub-Neo вставляли на участке соединения 3' человеческой/мышинной последовательностей. Нуклеотидные последовательности в различных участках соединения полученного вектора перечислены в таблице 9 и представлены в перечне последовательностей. Полные аминокислотные последовательности гуманизированного полипептида CD8 $\alpha$  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 $\alpha$**

Соединение	Последовательность	SEQ ID NO
------------	--------------------	--------------

5	Мышиная/человеческая в экзоне 1 (мышинная) и экзоне 2 (человеческая)	TGAACCTGCTGCTGCTGGGTGAGTCGATTATCCTGGG GAGTGGAGAAGCT(AGGCCGAGCCAGTTCCGGGTGTC GCCGCTGGATCGGACCTGGAACCTGGG)	85
10	Человеческая/5'-конец сайта lox 2372	(ATGCCAGGGACAGCCCTGATACTGTAGGTAGAGTCA AGGGCTGTCCAAGT) <b>ACCGGTATAACTTCGTATAAGGT</b> <i>ATCCTATACGAAGTTAT</i>	86
15	3'-конец сайта lox 2372/мышинная	<i>ATAACTTCGTATAAGGTATCCTATACGAAGTTATCTCGAC</i> CTGATCTTGGAGGGAGACCTGGACCGGGAGACGTGC TGGGGGCAGGGTT	87

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 $\alpha$ , описанный выше, электропорировали в мышинные ЭС-клетки, которые содержали гуманизированный локус CD8b, для получения модифицированных ЭС-клеток, которые содержат гуманизированные локусы CD8b и CD8a (Фиг. 5B). Нацеленные ЭС-клетки, несущие гуманизированные локусы CD8a и CD8b, выявляли путем генотипирования с использованием анализа на модификацию аллеля (Valenzuela et al.).

Нацеленные ЭС-клетки, описанные выше, использовали в качестве донорских ЭС-клеток и внедряли в мышинный 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.

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

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  $\alpha$  и  $\beta$ , TCR $\alpha$  и  $\beta$ , CD4, CD8 $\alpha$  и  $\beta$ , а также P2M, 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 p2M, для получения мыши, экспрессирующей гуманизированный МНС I/p2M. Мышей, гомозиготных по гуманизации различных компонентов, например МНС I, МНС II  $\alpha$  и  $\beta$ , TCR $\alpha$  и  $\beta$ , CD4, CD8 $\alpha$  и  $\beta$ , а также P2M, скрещивают друг с другом способами, известными в данной области, для получения

мышь, содержащей все девять гуманизации (мышь «ТМ I/II В С4/8»). Мышей разводят до достижения гомозиготности способами, известными в данной области. Альтернативно нацеливающие векторы, содержащие каждый гуманизованный 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 мышинный эмбрион на стадии 8 клеток по способу VELOCBVIOUSE®, описанному в примерах 1-3 выше.

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

Определяли характеристики мышей, гомозиготных по гуманизованным МНС I, МНС II  $\alpha$  и  $\beta$ , TCR $\alpha$  и  $\beta$ , CD4, CD8 $\alpha$  и  $\beta$  и по гуманизованному 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) 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 $\alpha$ , показанную на ФИГ. 6А-С и ФИГ. 9А-С, анализировали с помощью цитометрии посредством сортировки клеток с активацией флуоресценции (FACS) с использованием антител, конъюгированных с флуорохромом: против мышинового CD3 (17A2, BD), против мышинового CD19 (1D3, BD), против мышинового F4/80 (BM8, Biolegend), против мышинового CD8 $\alpha$  (53-6.7, BD), против мышинового CD4 (RM4-5, eBioscience), против человеческого CD8 $\alpha$  (SK1, BD) и против человеческого CD4 (RPA-T4, BD). Экспрессию на клеточной поверхности мышинового H2Db, человеческих молекул HLA (HLA-A2, B2m и HLA-DR) и мышинных молекул МНС I<sup>AIE</sup>, показанных на ФИГ. 7А-В и 10А-В, анализировали с помощью FACS с использованием антител, конъюгированных с флуорохромом: против мышинового CD 19 (6D5, Biolegend), против мышинового F4/80 (BM8, Biolegend), против мышинового H2Db (KH95, Biolegend), против человеческого HLA-A2 (BB7.2, BD), против человеческого HLA-DR (G46-6, BD), против человеческого В2-микροглобулина (2M2, Biolegend) и против мышинового I<sup>AIE</sup> (M5/114.15.2, eBioscience). Экспрессию на клеточной поверхности мышинового и человеческого CD4 и CD8, изображенных на ФИГ. 7G и ФИГ. 10G, анализировали с помощью FACS с использованием антител, конъюгированных с флуорохромом: против мышинового CD3 (17A2, Biolegend), против мышинового CD4 (GK1.5, eBiosciences), против мышинового CD8 $\alpha$  (53-6.7, BD 2), против мышинового CD80 (H35-17.2, eBioscience), против человеческого CD4 (OKT4, eBioscience), против человеческого CD8 $\alpha$  (RPA-T8, BD 6), против человеческого CD8 $\beta$  (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 CD25 (PC61, Biolegend). Экспрессию на клеточной поверхности CD44 и CD62L, показанных на ФИГ. 9D-9E, 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.

Экспрессия в тимусе показана на ФИГ. 6А-С, 7А-В и 8. Абсолютные количества тимоцитов и клеток CD3+ и общее развитие Т-клеток тимуса были сопоставимы у контрольных мышей и гуманизованных 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 гуманизованную 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 девяти генам клеточного иммунитета (ТМ I/II В С4/8), аналогично экспрессии мышинных CD4 и CD8 у негуманизированных контрольных мышей (ФИГ. 6С). Гуманизированный  $\beta 2\text{M}$  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 7D), а мышинные молекулы МНС класса I и II не были обнаружены (ФИГ. 7Е и 7F). Гуманизированные CD4, CD8 $\alpha$  и CD8 $\beta$  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. 9A-D и 10A-10G. Селезенки мышей, гуманизированных 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 $\alpha$  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  $\beta 2\text{M}$  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 мышинных 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 мышинные молекулы МНС класса I и II не были обнаружены (ФИГ. 10Е и 10F). Гуманизированные CD4, CD8 $\alpha$  и CD8 $\beta$  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 содержатся в 200 мкл эмульсии. 50 мкл эмульсии вводят в 4 зоны на каждом животном. Две зоны находятся в заднем паху и 2 зоны  
 5 находятся рядом с каждым плечом мышей, гомозиготных по гуманизированным MHC I, MHC II  $\alpha$  и  $\beta$ , TCR $\alpha$  и  $\beta$ , CD4, CD8 $\alpha$  и  $\beta$ , а также  $\beta$ 2M (TM I/II B CD4/8), или контрольных мышей, которые экспрессируют эндогенные MHC I, MHC II  $\alpha$  и  $\beta$ , TCR $\alpha$  и  $\beta$ , CD4, CD8 $\alpha$  и  $\beta$ , а также  $\beta$ 2M.

Получают и разделяют суспензии селезенки от иммунизированных мышей.

10 Эритроциты лизируют в лизирующем буферном растворе ACK (Life Technologies), а спленоциты суспендируют в полной среде RPMI.  $2 \times 10^5$  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 мышинового захватного антитела ИФН- $\gamma$  (BD Biosciences) в анализе ELISPOT. После 16-20 часов  
 15 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  
 20 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 MHC I, MHC II  $\alpha$  и  $\beta$ , TCR $\alpha$  и  $\beta$ , CD4, CD8 $\alpha$  и  $\beta$ , а также  $\beta$ 2M (TM I/II B CD4/8), реагировали секрецией ИФН- $\gamma$  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  
 30 клеточной иммунной системы, формировать нормальный ответ на инфекцию, исследовали способность гуманизированных мышей уничтожать вирус лимфоцитарного хориоменингита (LCMV). LCMV представляет собой вирус, воздействующий 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.  
 35 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 MHC класса I, штаммом Армстронга приводит к сохранению высоких титров вируса (J. Virol. 68:8056-63 (1994)).  
 40 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 MHC I, MHC II  $\alpha$  и  $\beta$ , TCR $\alpha$  и  $\beta$ , CD4, CD8 $\alpha$  и  $\beta$ , а также  $\beta$ 2M, нормальной Т-клеточной функцией, контрольных и  
 45 гуманизированных (TM I/II B C4/8) мышей инфицировали  $2 \times 10^5$  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  $2 \times 10^5$  БОЕ штамма Армстронга, а в день 17 суперинфицировали  $4,5 \times 10^5$  БОЕ штамма Clone 13 (по 2 каждой из гуманизированных и контрольных мышей ложно 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  $2 \times 10^5$  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<sup>b</sup>. В частности, Т-клетки CD8+ выделяли из собранных селезенок и активировали пептидами. Клетки CD8+, продуцирующие интерферон- $\gamma$  (ИФН $\gamma$ ), измеряли посредством ELISpot (ФИГ. 15А-В) или посредством мечения для определения внутриклеточного ИФН $\gamma$  (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 $\gamma$  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 эпитопом LCMV, тогда как иммунодоминантный рестриктированный по HLA-A2 эпитоп 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 осуществления изобретения, описанных в настоящем документе. Подразумевается, что

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	
	<151> 2015-06-30	
20	<160> 91	
	<170> PatentIn, версия 3.5	
	<210> 1	
	<211> 19	
	<212> ДНК	
25	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> синтетический	
	<400> 1	
	сagaacgcca ggctgtaac	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	сaccgccact cacagtcct 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	
	cttcctttcc aggggtgtgac tc	22
	<210> 6	
15	<211> 23	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> синтетический	
20	<400> 6	
	aggcctgcga tcagggtggca 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	tgggcacaac agacaatcgg ctg	23
	<210> 10	
	<211> 140	
	<212> ДНК	



	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> синтетический	
	<400> 10	
5	tttgtaaaca aagtctaccc agagacagat gacagacttc agctccaatg ctgattgggt	60
	cctcacttgg gaccaaccct accggtataa cttcgtataa ggtatcctat acgaagttat	120
	atgcatggcc tccgcgcggg	140
	<210> 11	
	<211> 140	
10	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> синтетический	
	<400> 11	
15	cgacctgcag ccggcgcgcc ataacttcgt ataaggatc ctatacgaag ttatctcgag	60
	cacaggcatt tgggtgggca gggatggacg gtgactggga caatcgggat ggaagagcat	120
	agaatgggag ttagggaaga	140
	<210> 12	
	<211> 17	
20	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> синтетический	
	<400> 12	
25	cgaggagccc cggtaga	17
	<210> 13	
	<211> 20	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
30	<220>	
	<223> синтетический	
	<400> 13	
	aagcgcacga actccttggt	20
	<210> 14	
35	<211> 17	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> синтетический	
40	<400> 14	
	ctctgtcggc tatgtgg	17
	<210> 15	
	<211> 22	
	<212> ДНК	
45	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> синтетический	
	<400> 15	

	ggactcccag aatctcctga ga	22
	<210> 16	
	<211> 25	
	<212> ДНК	
5	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> синтетический	
	<400> 16	
	gagtcatgaa ccatcactgt 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 gtatgtagg	90
	<210> 19	
	<211> 80	
	<212> ДНК	
30	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> синтетический	
	<400> 19	
	caagggtttcc tcctatgatg cttgtgtgaa actcggggcc 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 ccccatcttc atattagcga	60
	ttttaattta ttctagcctc	80
45	<210> 21	
	<211> 80	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	

<220>  
 <223> синтетический  
 <400> 21  
 tcttccttaa ctccattct atgctcttcc atcccgcaccg cggcccaatc tctctccact 60  
 5 acttcctgcc tacatgtatg 80  
 <210> 22  
 <211> 100  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
 10 <220>  
 <223> синтетический  
 <400> 22  
 gagttcctcc atcacttcac tgggtagcac agctgtaact gtccagcctg tcctgggctg 60  
 cagggtggtgg gcgttgccggg tggggccggt taagggtcca 100  
 15 <210> 23  
 <211> 100  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 20 <223> синтетический  
 <400> 23  
 tccacatcc tattttaatt tgctccatgt tctcatctcc atcagcacag ctcgagataa 60  
 cttcgtataa tgtatgctat acgaagttat atgcatggcc 100  
 <210> 24  
 25 <211> 100  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <223> синтетический  
 30 <400> 24  
 atacgaagt atgctagtaa ctataacggt cctaaggtag cgagtggctt acaggtaggt 60  
 gcgtgaagct tctacaagca cagttgcccc ctgggaagca 100  
 <210> 25  
 <211> 17  
 35 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <223> синтетический  
 <400> 25  
 40 tgcggccgat cttagcc 17  
 <210> 26  
 <211> 18  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
 45 <220>  
 <223> синтетический  
 <400> 26  
 ttgaccgatt ccttgccg 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	
		ccccacagca cgtttcct	18
	<210>	29	
	<211>	23	
	<212>	ДНК	
20	<213>	Искусственная последовательность	
	<220>		
	<223>	синтетический	
	<400>	29	
		cgtccattg 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		ccccacagca cgtttcct	18
	<210>	32	
	<211>	17	
	<212>	ДНК	
	<213>	Искусственная последовательность	
45	<220>		
	<223>	синтетический	
	<400>	32	
		acccgctccg tcccatt	17

	<210>	33	
	<211>	18	
	<212>	ДНК	
	<213>	Искусственная последовательность	
5	<220>		
	<223>	синтетический	
	<400>	33	
		agcctaagag ggagtgtc	18
	<210>	34	
10	<211>	20	
	<212>	ДНК	
	<213>	Искусственная последовательность	
	<220>		
	<223>	синтетический	
15	<400>	34	
		agaccctggt gatgctgga	20
	<210>	35	
	<211>	18	
	<212>	ДНК	
20	<213>	Искусственная последовательность	
	<220>		
	<223>	синтетический	
	<400>	35	
		cgcttggtg ctccactt	18
25	<210>	36	
	<211>	18	
	<212>	ДНК	
	<213>	Искусственная последовательность	
	<220>		
30	<223>	синтетический	
	<400>	36	
		tcgaagtgga gaggttta	18
	<210>	37	
	<211>	21	
35	<212>	ДНК	
	<213>	Искусственная последовательность	
	<220>		
	<223>	синтетический	
	<400>	37	
40		tggaatggag tgagcagctt t	21
	<210>	38	
	<211>	20	
	<212>	ДНК	
	<213>	Искусственная последовательность	
45	<220>		
	<223>	синтетический	
	<400>	38	
		gcacggtccc 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	
		ctggcggcctt gaagaatttg g	21
	<210>	41	
	<211>	24	
	<212>	ДНК	
20	<213>	Искусственная последовательность	
	<220>		
	<223>	синтетический	
	<400>	41	
		catgatttcc aggttggtt 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	
		ttgtcccagt caccgtccat	20

	<210>	45	
	<211>	24	
	<212>	ДНК	
	<213>	Искусственная последовательность	
5	<220>		
	<223>	синтетический	
	<400>	45	
		tgcattctcga gcacagggcat ttgg	24
	<210>	46	
10	<211>	100	
	<212>	ДНК	
	<213>	Искусственная последовательность	
	<220>		
	<223>	синтетический	
15	<400>	46	
		atggagtagt cagaacacac tcttcagaag ggactcctga tttcaaaggg ggtaccgggc	60
		ccccctcga ggtcgacata acttcgtata gcatacatta	100
	<210>	47	
	<211>	108	
20	<212>	ДНК	
	<213>	Искусственная последовательность	
	<220>		
	<223>	синтетический	
	<400>	47	
25		ggccatgcat ataacttcgt atagcataca ttatacgaag ttataccggg gcgatcgcg	60
		gcttccctct tctaaccact aattcaaaaa ggattgtaag taatgttt	108
	<210>	48	
	<211>	145	
	<212>	ДНК	
30	<213>	Искусственная последовательность	
	<220>		
	<223>	синтетический	
	<400>	48	
		agacagaccc ctaaacacct ccaaattaaa agcggcaaag agataagggt ggagctccac	60
35		cgcggtggcg gccgcccaccg cggtggagct cgagggtttcc ggtacttaac aacagagcac	120
		agatttagtg gtgagggact ctctc	145
	<210>	49	
	<211>	100	
	<212>	ДНК	
40	<213>	Искусственная последовательность	
	<220>		
	<223>	синтетический	
	<400>	49	
		atggagtagt cagaacacac tcttcagaag ggactcctga tttcaaaggg ggtaccgggc	60
45		ccccctcga ggtcgacata acttcgtata gcatacatta	100
	<210>	50	
	<211>	109	
	<212>	ДНК	

<213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <223> синтетический  
 <400> 50  
 5 ggccatgcat ataacttcgt atagcataca ttatacgaag ttataccggt gcgatcgctc 60  
 aagcatgcaa gggtaacata tggtatgaga ttatatcttc tttatctca 109  
 <210> 51  
 <211> 100  
 <212> ДНК  
 10 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <223> синтетический  
 <400> 51  
 atggagtagt sagaacacac tcttcagaag ggactcctga tttcaaaggg gggtagcggg 60  
 15 cccccctcga agaagttcct attccgaagt tcctattctc 100  
 <210> 52  
 <211> 108  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
 20 <220>  
 <223> синтетический  
 <400> 52  
 gttcctattc cgaagttcct attctctaga aagtatagga acttcctagg gcgatcgctc 60  
 ctctccaggc tcgaattagt attacagttg aggcacgttg tcctcccc 108  
 25 <210> 53  
 <211> 100  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 30 <223> синтетический  
 <400> 53  
 atggagtagt sagaacacac tcttcagaag ggactcctga tttcaaaggg ggtaccgggc 60  
 cccccctcga ggtcgcacata acttcgtata gcatacatta 100  
 <210> 54  
 35 <211> 108  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <223> синтетический  
 40 <400> 54  
 ggccatgcat ataacttcgt atagcataca ttatacgaag ttataccggt gcgatcgccg 60  
 cctccatttc cttcatagga aacatgaagt gaatggggct gtgtgtgt 108  
 <210> 55  
 <211> 100  
 45 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <223> синтетический



	<400>	55		
			atggagtagt cagaacacac tcttcagaag ggactcctga tttcaaagg ggtaccgggc	60
			ccccctcga ggtcgacata acttcgtata gcatacatta	100
	<210>	56		
5	<211>	108		
	<212>	ДНК		
	<213>	Искусственная последовательность		
	<220>			
	<223>	синтетический		
10	<400>	56		
			ggccatgcat ataacttcgt atagcataca ttatacgaag ttataccggt gcgatcgctg	60
			ggagcacgtt ccattattat aacaactttc tgaacacaag agggcagt	108
	<210>	57		
	<211>	100		
15	<212>	ДНК		
	<213>	Искусственная последовательность		
	<220>			
	<223>	синтетический		
	<400>	57		
20			atggagtagt cagaacacac tcttcagaag ggactcctga tttcaaagg ggtaccgggc	60
			ccccctcga ggtcgacata acttcgtata gcatacatta	100
	<210>	58		
	<211>	108		
	<212>	ДНК		
25	<213>	Искусственная последовательность		
	<220>			
	<223>	синтетический		
	<400>	58		
			ggccatgcat ataacttcgt atagcataca ttatacgaag ttataccggt gcgatcgctt	60
30			taaggtagg aggcaggcaa taccctctt ccaccgcatt ctcaatcc	108
	<210>	59		
	<211>	100		
	<212>	ДНК		
	<213>	Искусственная последовательность		
35	<220>			
	<223>	синтетический		
	<400>	59		
			gggggggtgg ggtggaggag gagggtagag catctcctct ccttcctctc tggtaccgaa	60
			gttcctattc cgaagttcct attctctaga aagtatagga	100
40	<210>	60		
	<211>	108		
	<212>	ДНК		
	<213>	Искусственная последовательность		
	<220>			
45	<223>	синтетический		
	<400>	60		
			gaagttccta ttctctagaa agtataggaa cttcctaggg tttcaccggt gcgatcgctg	60
			gaatatacta aaaaccactt aattatatat ttgaaagggt ggatgtta	108

<210> 61  
 <211> 108  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
 5 <220>  
 <223> синтетический  
 <400> 61  
 ctctctccta cccagctcct ctcacacgag cctgaaggcc ctgccaaggt ggcgcgcctt 60  
 tcaaattggt gttgagttca aagtgggcaa cagaaaaggg ggtgtgag 108  
 10 <210> 62  
 <211> 130  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 15 <223> синтетический  
 <400> 62  
 aataaatagt aaatttctgt agaatcataa tgagggtctag acccccgggc tcgataacta 60  
 taacggtcct aaggtagcga aatggcgcgt aatcaagccc agctcttcat gctgcatttt 120  
 tatcttcttt 130  
 20 <210> 63  
 <211> 100  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 25 <223> синтетический  
 <400> 63  
 ttgactcggg ggtgcctggg tttgactgca atgatcagtt gctgggaagg accggtataa 60  
 cttcgtataa tgtatgctat acgaagttat atgcatggcc 100  
 <210> 64  
 30 <211> 100  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <223> синтетический  
 35 <400> 64  
 ccggcgcgcc ataacttcgt ataatgtatg ctatacgaag ttatgtcgac ataaggtaag 60  
 acagagtcgt cccttcccat ctggaaccct ctacctttct 100  
 <210> 65  
 <211> 107  
 40 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <223> синтетический  
 <400> 65  
 45 gttgatgaat cataaaagaa gagatattca agaaaaggat ggccacactg cggccgcaga 60  
 ggtattcaag gaaaatgcag actcttcacg taagagggat gaggggc 107  
 <210> 66  
 <211> 100

<212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <223> синтетический  
 5 <400> 66  
 tccccggagt cggaggggtgg accggagctg gaggagctgc cgcggtggcg gccgatgcca 60  
 ttccattacc tctttctccg cacccgacat agataaagct 100  
 <210> 67  
 <211> 100  
 10 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <223> синтетический  
 <400> 67  
 15 ggggggggtgg ggtggaggag gagggtacag catctcctct ccttcctctc tggtagcgaa 60  
 gttcctattc cgaagttcct attctctaga aagtatagga 100  
 <210> 68  
 <211> 108  
 <212> ДНК  
 20 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <223> синтетический  
 <400> 68  
 gaagttccta ttctctagaa agtataggaa cttcctaggg tttcaccggt gcgatcgca 60  
 25 agcaattaac tgccctgggt ccagttgcct cctctgataa tgcattgt 108  
 <210> 69  
 <211> 100  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
 30 <220>  
 <223> синтетический  
 <400> 69  
 ggggggggtgg ggtggaggag gagggtacag catctcctct ccttcctctc tggtagcgaa 60  
 gttcctattc cgaagttcct attctctaga aagtatagga 100  
 35 <210> 70  
 <211> 108  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 40 <223> синтетический  
 <400> 70  
 gaagttccta ttctctagaa agtataggaa cttcctaggg tttcaccggt gcgatcgct 60  
 tatctagtag acttaattaa ggatcgatcc ggcgcgccaa tagtcatg 108  
 <210> 71  
 45 <211> 100  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>

	<223> синтетический	
	<400> 71	
	gttttccaga cttcaacttg actatcagcc agaaattcag tggcaaaccs ccaccagtc	60
	cctaagtga ggccccctggg gagtatgggtt agggctcagg	100
5	<210> 72	
	<211> 100	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
10	<223> синтетический	
	<400> 72	
	сacccaccaа agaaagtgcc caggagaagg gcaaggagag agcagagcat agttcaagat	60
	gggtctttgtc taggcttgtc tactctgcac ttgtacttcc	100
	<210> 73	
15	<211> 202	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> синтетический	
20	<400> 73	
	aggggaaacc cgcaaaggat gggacatagg gagacagctg ttaacatctg aaacatgacc	60
	ttcttttctg tgcagcacaа ctccatagctg tcaactcaagg gaagaaagtg gtgctgggca	120
	aaaaagggga tacagtggaa ctgacctgta cagcttccca gaagaagagc atacaattcc	180
	actggaaaaa ctccaaccag at	202
25	<210> 74	
	<211> 240	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
30	<223> синтетический	
	<400> 74	
	ctgggtcacct ggatgaagtg agggagggcc ctctggggtt ggggctgggtt ttgaactgag	60
	acatccatga gccagcctgg ggctggcttc actgaagatc atctatgtcg ggtgcggaga	120
	aagaggtaat gaaatggcac atgctatgta caaactctat tgctgagcag caccagtc	180
35	tgagctggct ctgaattgag ggtgaaattc acacattctc cccaacatc tataatctgg	240
	<210> 75	
	<211> 151	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
40	<223> синтетический	
	<400> 75	
	tatggagtga aagccttttg tgtctgagat ctggctcttag ttaaactctg ggatcggcgc	60
	gccgaattcc tgcagcccgg gctcgagata acttcgtata atgtatgcta tacgaagtta	120
45	tatgcatccg ggtaggggag gcgcttttcc c	151
	<210> 76	
	<211> 151	
	<212> ДНК	

	<213>	Искусственная последовательность	
	<220>		
	<223>	синтетический	
	<400>	76	
5		agtattgttt tgccaagttc taattccatc agacctcgac ctgcagccct agataacttc	60
		gtataatgta tgctatacga agttatccta ggccagaggg cttgggttga cagaaactca	120
		gtggcattct tatccagagt ttctctacac c	151
	<210>	77	
	<211>	18263	
10	<212>	ДНК	
	<213>	Искусственная последовательность	
	<220>		
	<223>	синтетический	
	<220>		
15	<221>	прочие приложения	
	<222>	(2957) .. (2957)	
	<223>	n = А, Т, С или G	
	<220>		
	<221>	прочие приложения	
20	<222>	(3193) .. (3193)	
	<223>	n = А, Т, С или G	
	<400>	77	
		aagaaagtgg tgctgggcaa aaaaggggat acagtggaac tgacctgtac agcttcccag	60
		aagaagagca tacaattcca ctggaaaaaac tccaaccaga taaagattct gggaaatcag	120
25		ggctccttct taactaaagg tagggttgcc tggctcccca tccagggagg aaaacacact	180
		atggagtgaag agccttttgt gtctgagatc tggctcttagt taaactctgg gatcggcgcg	240
		ccgaattcct gcagcccggg ctcgagataa cttcgtataa tgtatgctat acgaagttat	300
		atgcatccgg gtaggggagg cgcttttccc aaggcagtct ggagcatgcg ctttagcagc	360
		cccgttgggc acttggcgct acacaagtgg cctctggcct cgcacacatt ccacatccac	420
30		cggtaggcgc caaccggctc cgttcttttg tggcccttc cgcaccctt ctactcctcc	480
		cctagtccagg aagttccccc ccgccccgca gctcgcgtcg tgcaggacgt gacaaatgga	540
		agtagcacgt ctactagtc tcgtgcagat ggacagcacc gctgagcaat ggaagcgggt	600
		aggccttttg ggcagcggcc aatagcagct ttgctccttc gctttctggg ctgagaggct	660
		gggaaggggg ggggtccggg gcgggctcag gggcgggctc aggggcgggg cgggcgcccg	720
35		aaggtcctcc ggaggccccg cattctgcac gcttcaaaaag cgcacgtctg ccgcgctgtt	780
		ctcctcttcc tcactctccg gccttttcgac ctgcagccaa ttgttgacaa ttaatcatcg	840
		gcatagtata tcggcatagt ataatacgac aaggtaggga actaaaccat gggatcggcc	900
		attgaacaag atggattgca cgcaggttct ccggccgctt gggtaggagag gctattcggc	960
		tatgactggg cacaacagac aatcggctgc tctgatgccg ccgtgttccg gctgtcagcg	1020
40		caggggcgcc cggttctttt tgtcaagacc gacctgtccg gtgccctgaa tgaactgcag	1080
		gacgaggcag cgcggctatc gtggctggcc acgacgggag ttccttgccg agctgtgctc	1140
		gacgttgtca ctgaagcggg aagggactgg ctgctatttg gcgaagtgcc ggggcaggat	1200
		ctcctgtcat ctacacctgc tcctgccgag aaagtatcca tcatggctga tgcaatgcgg	1260
		cggctgcata cgcttgatcc ggctacctgc ccattcgacc accaagcgaa acatcgcac	1320
45		gagcagcac gtactcggat ggaagccggt cttgtcgatc aggatgatct ggacgaagag	1380
		catcaggggg tcgcgccagc cgaactgttc gccaggctca aggcgcgcat gcccgacggc	1440
		gatgatctcg tcgtgaccca tggcgatgcc tgcttgccga atatcatggg ggaatggc	1500
		cgcttttctg gattcatcga ctgtggccgg ctgggtgtgg cggaccgcta tcaggacata	1560

	gcgttggcta	cccgtgatat	tgctgaagag	cttggcggcg	aatgggctga	ccgcttcctc	1620
	gtgcttttacg	gtatcgccgc	tcccgattcg	cagcgcacgc	ccttctatcg	ccttcttgac	1680
	gagttcttct	gaggggatcc	gctgtaagtc	tgcagaaatt	gatgatctat	taaacaataa	1740
	agatgtccac	taaaatggaa	gtttttcctg	tcatactttg	ttaagaaggg	tgagaacaga	1800
5	gtacctacat	tttgaatgga	aggattggag	ctacgggggt	gggggtgggg	tgggattaga	1860
	taaatgcctg	ctctttactg	aaggctcttt	actattgctt	tatgataatg	tttcatagtt	1920
	ggatatcata	atttaaacaa	gcaaaaccaa	attaagggcc	agctcattcc	tcccactcat	1980
	gatctataga	tctatagatc	tctcgtggga	tcattgtttt	tctcttgatt	cccactttgt	2040
	ggttctaagt	actgtggttt	ccaaatgtgt	cagtttcata	gcctgaagaa	cgagatcagc	2100
10	agcctctggt	ccacatacac	ttcattctca	gtattgtttt	gccaaagtct	aattccatca	2160
	gacctcgacc	tgcagcccta	gataacttcg	tataatgtat	gctatacgaa	gttatccctag	2220
	gccagagggc	ttgggttgac	agaaactcag	tggcattctt	atccagagtt	tctctacacc	2280
	aactgctggg	ggcccaggga	aagggtggat	gtgaatttca	atattttaat	atttaaatatt	2340
	catgaactta	tttttagtgag	ttttagaaca	atcactatca	cttaaaaccc	gtgatttctt	2400
15	gagtattggt	gctacagacc	tatgtagata	atactttgca	cagtgactca	tatgtataat	2460
	cctagcactg	tgggaggctg	aggccggagg	attgcttgag	tccaggagtt	caagaccagc	2520
	ctgaacaaca	tagtgagact	ctgtctctat	gaaaaaaaaa	atatatatat	tttttttgga	2580
	gacaaggctc	agttctatca	cccaggctcc	agtgcagtgg	tgtgatctcg	gctcactgca	2640
	atctccacct	cccaggctca	agtcacatc	ccacctcagc	ctcccaagta	gctgggacta	2700
20	caggcatgca	ccaccatgcc	aggctaattt	ttgtattttt	tatagagaca	gggtttcacc	2760
	atgttggcca	ggctggtctc	gaactcatga	gctcaagtga	tccactcacc	ttggcctctc	2820
	agagtgtctg	aattacaggt	gtgtgtcact	atgcctagcc	aaaaaaaaatt	tttttaatta	2880
	aaaaaaaaaa	ggccggctgt	agtggctcac	acctgtaatc	cagaactttg	ggagtttgag	2940
	gtgggagat	caccggnggt	caggagttca	agaccagtct	ggccaacatg	gtgaaacccg	3000
25	gtctctacta	aaaatacaaa	aattagccag	gtgtgggggt	gcagtcctgt	acttccagct	3060
	actcaggagg	ctgaggcagg	agactcgctt	gaacctggga	ggcaaaggct	gcagtgcagt	3120
	gagattgcac	cactgcactc	cagcctgggt	gacagagcaa	gacttcatct	caaaaaaaaaa	3180
	aaaaaagctg	canatttatt	attattatta	ttagtttatt	tattttattt	tttgagacag	3240
	agtctcgttc	tgtcgcccag	gctggagtg	ggtggcgtga	tcttggctca	ttgcaacctc	3300
30	cacctcccg	gttcaagtga	ttctcctgcc	tcagcctccc	gagtagctgg	gactacaggc	3360
	gtatgccacc	atgcctggct	aattttttgt	acttttagta	gagacagagt	ttcacggtgt	3420
	tagccaggct	ggtcttgatc	tcctgacctc	gtgatttacc	ctccttggcc	tcccaaagtg	3480
	ctgggattac	aggcgtgagt	cactgtgccc	ggcccagaat	catttttttc	tacttttttt	3540
	tttttgaggc	aaactctcga	tctgttgccc	aggctggagt	gcagtgggca	tgatcttggc	3600
35	tcactgcaag	ctctgcctcc	caggttcaag	caattctcct	gcctcagcct	cctgagtagc	3660
	tgggactaca	ggcgtgtgcc	accatgccc	gctaatttgc	gtatttttag	tagagaccgg	3720
	ttttcatcat	attggccagg	ctggctctga	actcctgacc	tcaagtgatt	ctcccacctt	3780
	agcctcccaa	agtgtctggga	ttacaggcat	gagctactgc	acttggcctt	ttctcctggt	3840
	tttaaaacta	ttatatgctc	attacaaaat	atttgggtcaa	tgaagaaaag	aatatggaag	3900
40	aaaatcaaat	gcatgcatac	ttctatcact	cagagatatc	ctctgctaac	attttgattg	3960
	attttcttcc	aatctttttt	tttttttttc	tttttgagac	agggtctcac	tctgctgccc	4020
	aggctggagt	acagtggcat	gaccacaaca	catcacagcc	tcaagtgatc	ttcccacttc	4080
	agccttccca	gtagctggga	ctacagggtc	acgccaccat	gttcacctaa	ttttttactt	4140
	ttttagtaga	tgagacttca	ccatgttgct	caggctggtc	ttgaattcct	aggctcaagt	4200
45	gatcttcccg	ctttggcctc	ccaaagtgt	gggattatag	gtatgagcca	ctgcatgtgg	4260
	cctattttct	tccactgttg	ttcggcgtgg	agaatattat	atacataatt	acgtaaataa	4320
	tatcatactg	tatatacctt	ttttcctact	ccttccttaa	gttatatcat	aatgagacta	4380
	ccaattatta	gacttttttt	cttttttttg	agacggagtc	tcgggtctgtc	acctaggctg	4440

	gagtgcaatg	gcgcgatctc	agctcgctgc	aacctctgcc	tcccaggttc	aagcaattct	4500
	gcctcagcct	cccagagtagc	tgggactaca	gacacgtgcc	accatgcca	gctaactttt	4560
	ttattttttt	attagagaca	gggttccacc	atgctagcag	gatggctctca	atctctcgac	4620
	ttcgtgatca	gcccggcttg	gcctcccaaa	gtgctgggag	tacaggtgtg	agccaccgca	4680
5	ctcggcctag	actaactatt	taaagtaatc	tggcaatgtt	taacgaatac	aaaactctaa	4740
	aacccttgga	cctaataata	gctatttttg	aaagtctact	tgacagaaat	aaaattgtga	4800
	atattctttt	ttgttgtttt	tttgagacag	agtctcattt	ggacgcctag	gctggagtg	4860
	agtggcatga	tctcggctaa	ctgcaacctc	cacctcctgg	gttcaagtga	ttctcctgcc	4920
	tcagcctcct	gagcagctgg	gattacaggt	gtgcaccacc	atgtctggct	aatttttgca	4980
10	tttttagtag	atggggtttc	accatgttga	ccaggggtgt	ctggaacttc	taccctcaag	5040
	tgatctaccc	accttggcct	cccaaagtgc	tgggattaca	ggtgtgagcc	accacgcctg	5100
	accagtgaac	acttaataat	atctatggaa	aggtgttatt	ataagaattg	cttgtggggc	5160
	cgggctgtgt	ggctcacgcc	tghtaatcca	gcactttggg	aggctgtggc	aggcggtatca	5220
	cgaggtcagg	agatcaagat	catcctggct	aacacggtga	aaccccgctc	ctactaaaaa	5280
15	taccaaaaaa	ttagccaggc	gtgggtggcg	gcacttgtaa	tcccagctat	ccaggaggct	5340
	gaggcaggag	aattgcgtga	accaggagg	cggaggtcgc	agtgaagtga	gaccgtgcca	5400
	ttgcactcca	gcctgagtg	cagagtgaga	ctccatcaca	aaaaataaat	aaataaataa	5460
	ataaaatata	aataagtaaa	taaaggtcag	gagtgggtgg	tcacgcctgt	aatcccagca	5520
	ctttggggagg	ccgaggtgga	cagatcatga	ggtcatgaga	tcaagaccat	cctggctaac	5580
20	acagtgaac	cctgcctcta	ctaaaaatac	aaaaagtc	ccaggtgtgg	tggcacacac	5640
	ctatagtccc	agctacttgg	gaggctgagg	caggagaatc	acttgaaccc	aggaggcaga	5700
	ggttgcagtg	agctgagatc	gcgccactac	actccagcct	aggcgacaga	gcaagactct	5760
	gtctcaaaat	aaataaataa	ataaaataat	aaataaataa	ataaataaaa	taaaaagcac	5820
	acacacacac	acacacacac	acacacaatg	caaaaagacc	accctactac	aactaacatt	5880
25	atattttaatg	gtgaaaaact	gaattctttc	tccctaagt	caggaataag	acaaagatgt	5940
	ctgctcttac	tactcttatt	caacataata	ctgcaatccc	ttgccagtgc	aataaggcaa	6000
	gaaaaatgaa	ataaaaggaa	aactgatcag	aaagaaagaa	ataaaaactgt	tcctatttgt	6060
	ggatgacatg	attacataga	aaatctcaaa	gaatctgtaa	gaaacttctt	agaattaata	6120
	aatgaattca	tcaagggttg	agaatataag	ataaacataa	aaaatctatt	gtatttctat	6180
30	atattagcaa	ggaacatgtg	tacacagaaa	ttaaaactac	aataccattt	ataattgctc	6240
	aaaaaggcca	ggcatgggtg	ctcacacctg	taattcctgc	actttgggag	gccaagggtg	6300
	gaagattgct	taagcccagg	agttcaagac	cagcccgggc	aacatagtga	gaccttgtct	6360
	ctacaaaaag	taaaaaatta	gctgagcatg	gccgggtgca	gtggctcact	cctgtaaccc	6420
	caacactttg	ggaggctgag	gcgggaggat	catgaggtca	ggagatcgag	accatcctgg	6480
35	ctaacacggt	gaaaccctgt	ctctactaaa	aacacaaaaa	attagctgga	tgtgggtggca	6540
	ggcgctgtga	gacccagcta	ctcgggaagc	tgaggcagga	gaatggcgtg	aacctgggag	6600
	gcggagcttg	cagtgaagt	agattgtgcc	actgcactcc	agcctgggtg	acacagtga	6660
	actacgtctc	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	tagctgagca	ttatgggtga	tgctgtagt	6720
	cccagctact	ggggaggctg	aggtggggag	attgcttgag	ccctaggagg	gcaaggctgc	6780
40	agtgagccat	gatcacacca	ctgctttcca	gcctcggtag	gagagcaaga	ccctatctca	6840
	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	agaaaagaaa	agaaaagaaa	agaaaagaaa	agagagaaa	6900
	aaatacttag	gtgtaaatct	aaaaaacatg	cgtaggggcca	ggtgcagtgg	ctcatgcctg	6960
	taatcccagc	actttgggaa	gttgaggctg	gcggatcact	tgaagtcggg	agtttgagac	7020
	cagcctggcc	aacatgggtga	aaccccgctc	ctactaaaaa	tgcaaaaatt	aggcagggtg	7080
45	tgtggcgcat	gcctgatccc	agctactttg	gaggctgagg	caggagaatt	gcttcaaccc	7140
	gggaggcaga	ggttgacagt	agccaagact	gttccactgc	actccagcct	gggcaacaga	7200
	gtaagagtct	gtctcccga	aaaaaaaaaa	agaaaaaaga	aagcattgaa	ttgtatgcta	7260
	aaaactacac	gatgctgatt	aaagaagtca	aagaagatct	aaatatatgg	agagacatgc	7320

	tgtactcatg	gattgatgga	ttggaagact	caacataaga	cagatatcaa	ttttcccca	7380
	attaatatac	aagtttaatc	caattcctat	aaaaatacca	gcaagatttt	ttgtagatat	7440
	aaacaagttg	gccaggtgta	gtggcttaca	cctgtaatcc	tagcactttg	ggaggctgag	7500
	gtgggaagat	cgcttgagcc	caggtgttca	cgactgcagt	gagctatgat	tgtgtcactg	7560
5	cattccagct	ggcactccag	cctaagtgac	aaagggagac	cctgtctcaa	aaacaaaaac	7620
	aaaacaaaa	taattttgct	ctgcaaaatc	cctattaaga	agaagaaaag	aggctgggca	7680
	cagtggctca	ccgctgtaat	cccagcacgt	tgggaggctg	aggcaggctg	atcacttcag	7740
	cccagaagtt	tgagatcagc	ctgggcaaca	tgaggaaacc	ccgtctctac	caaaaaaaaa	7800
	aaaaggtaca	tacacacaca	cacacacaca	cacacacata	cacaagtata	tacacatata	7860
10	tatacacata	caggtgaata	gatgtatata	catctattta	ttgtgaatat	acatctatac	7920
	acacacgtgt	gtgtacacat	atattttaaaa	tttattttta	tttattttatt	tattttttgag	7980
	acagagtctt	gctctgtcac	ccaggctggg	tgcacctgta	ttcccaacga	cacaggaggc	8040
	tgagggtggg	gaatcactga	gccagggagg	cagaggttgc	agtgagccaa	gatgttgctt	8100
	ggttgcttgg	gcaacagagc	gagaccctat	atcaaaaaag	aagaataata	agaaaagaca	8160
15	gtttacagaa	tataagaaaa	tatattcaca	atccacatac	ttagcaaagg	actggtatct	8220
	agaatatgat	aaacaactct	caaaactcaa	aaccaaaaaa	atgaacaatt	caattagaaa	8280
	acaggccgaa	aaggacatac	agttggcaaa	taagcacatg	aaaagttgtt	caacatcatt	8340
	aatcattagg	gatatgtaca	ttaaaaccac	aataggctat	cactaaacct	atcagaatgg	8400
	ctaaatacaa	aattggaaca	ccaccaaagt	ctgatgagga	tgtggagaaa	ctgggtcatt	8460
20	cttccaatat	tgggtgggagg	ctaaaatggc	aaagccactc	tggaaaacag	tttgatagtt	8520
	tcttataaaa	caaaacatgc	ggccggggcg	ggtagctcac	gcctgtaatc	ccagcacttt	8580
	gggaggccga	ggcgggtgga	tcacgaggtc	aggagatcga	gaccatcctg	gctaacacgg	8640
	tgaaaccctg	tctctactaa	aaatacaaaa	aattagccgg	gcgtggtggc	gggcgcctgt	8700
	agtcccagct	actcgggagg	ctgaggcagg	agaatggtgt	gaaccgggga	ggcggagctt	8760
25	gcagtgagcc	gagatcgcg	cattgcactc	caacctggga	gacggaggga	gactccgtct	8820
	caaaaaaaca	aaaacaaaca	aacaaaaaac	atgcaacaat	ccagcaatat	tgcacccta	8880
	ggcattttatc	ctagagcaat	gaagacttat	gccacacaaa	aaagctgcac	acaaatgttc	8940
	atagcagctt	tattcatggt	agccaacaat	tagaaacaat	ctagatgtcc	ttcaactggt	9000
	gaatgattac	atccatacca	cgaaatactt	ttcagcaata	aaaaggatga	atcatagtag	9060
30	acaccacaac	ctggatgaat	ctccagggaa	ttatgctgag	tgaaaaaaag	ccaatctcaa	9120
	aaggtaatat	actgtattaa	tccattttata	taacatttctt	aaaataacta	attatagaaa	9180
	tggagaacag	atgagtgatt	gccaggggtt	aaggggctca	gggatgggga	ggggaagggg	9240
	tatggctaca	aaaagcaaca	accttatggc	gccggaaatg	ttctgtattc	tgattgtgtc	9300
	aatgtgagca	tactggttga	gatatagtg	tacagttttg	caagttatta	ccatcagagt	9360
35	aaactggata	gagggcacat	aggattttctc	tgtattactt	cttacaactg	caagtgaatc	9420
	tacaattatc	tcaaaataat	aagtttagtt	taatgctagg	cgtggtggct	cacatctgta	9480
	atctcagctc	tttgggaggc	tgagacgggt	ggatggcttg	agtccaggag	ttcgagacca	9540
	gcctggccaa	catggcaaaa	ccggtctcta	ctaaaaatac	aaaaattagc	tgggcgtggt	9600
	ggcaagtgcc	tgtagtccca	gctactcggg	aggctgaggc	aggagaattg	cttgaaccgc	9660
40	ggagggtggag	gttgcagtga	gccgagatca	cgccactaca	ctgtagcttg	ggcgacagag	9720
	tgaggctctt	tctcaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaagc	aggcaggcag	ggccaggaaa	9780
	gcgtataatt	tttgtagtgc	aaatgactaa	cctaaaaagt	gaagattggc	caggcgagct	9840
	ggctcacgcc	tgtaatccca	gcactttggg	aggccaaggc	gggtggatca	cgaggtcagg	9900
	agattgagcc	actctggcta	acacagtga	accccgctct	tactaaaata	caaaaaatta	9960
45	gctgggcgtg	gtggcacccg	cctgtagttg	cagctacttg	ggaggctgag	gcaggagaat	10020
	cacttgaaac	caggaggcga	agttgcagcg	agccgagatc	acactactgc	actccagcct	10080
	gggtgacaaa	gtgagattct	gtctcaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaagt	10140
	aagtttacct	ttttttttta	atttttcttc	ttttccttcc	ctactttgtg	agataatttt	10200



	cttcttttta	aaaagccaag	agcttacttc	tgtaagtaaa	gattatctta	agacaactta	10260
	gaaatgtata	ttattagtat	tttctatttc	attgtaagtt	atttgtaaatt	attgggttttg	10320
	gtgctaacct	agaattccat	caaattaatt	gtcccctaatt	atatggccat	tatcatttttg	10380
	tctaacattg	tatcctatta	acaatgctgt	aagtattatt	tttgtagcta	aattatgggt	10440
5	tgcattttta	aattattggt	ttaaggataa	agttccagaa	atgaaattaa	ggatatgaac	10500
	tttttgagca	catcttggtca	gcaactgagta	gtattatttta	aaactttttg	gggggggcaat	10560
	tttataattg	aaaaatatat	cattgttttta	atttgcatth	ctttcactgc	ctatgagatt	10620
	aaaacaatgc	actactttcc	aaaaattctt	aagtcttttg	tggtgatgct	ttgtttctgt	10680
	ttctatggat	ctcatcttcc	ttcagaacag	ctccccttcc	caacttcctg	atttctaaca	10740
10	ataacagtat	caccctcctt	gttctcccaa	tttctgaaac	acagagtcac	gtttttttct	10800
	ctgcttcaat	ccctgggttt	ctatcgctac	caattatgac	ctttccttgc	tttgaaagtg	10860
	ttttggggccg	ggcatgatgt	ctgccaccta	ttgtaatcct	agcacttttg	gaggctgagg	10920
	cggctggatg	acttgacctg	aggattttcga	gaccagcctg	ggcaacaggg	cgaacacctg	10980
	tctctacaaa	aaatacaaaa	gttagtcggg	agtgggtggca	catgcttgta	gtcccagtta	11040
15	cttgggggggc	tgagggtggca	ggatctcttg	agcccacgag	gtagatgttg	cagtgaagccg	11100
	tgattgcgcc	actgcacccc	agcctaggtg	acagagtggg	accctgtctc	aaaaaaaaaa	11160
	aaatgttcta	gtttcttctc	cttctttgtt	cccatgggaa	tgccaccatc	accagccaag	11220
	gctcacatac	ctcccacctg	gattacagtg	agcttccagg	taatttggtc	tgctactagt	11280
	ctcgccctact	tggattttccc	ttccccctgc	tgcagcattg	ccttccaaag	ccatgctttg	11340
20	cacatgccac	atcctagccc	attagactaa	gcctagaagc	ctctgcagga	cgttcacccct	11400
	ctcagcgcca	ctgctcagtt	tcccagtgga	aacctctgca	cccaggaggt	ttccccacag	11460
	cttgccctgtg	ctgcctctct	ggagcttttt	tcccttccctg	taatgtcctt	gctgctcccc	11520
	gtctctagtc	cattgcctat	acctcttttt	tttttttttt	ttgagatgga	gtctctctct	11580
	ctcatccagg	ctggagtgca	gtggcgcgat	ctcggtccac	tgcaaccttt	gtctcctggg	11640
25	ttcaagggat	tctcctgcct	cagcctcccg	agtaactggg	attacaggcg	tgcaccacca	11700
	ttcctggcta	atttttgtat	ttttagtaaa	gactgggttt	caccatgttg	gccaggctgg	11760
	tcttgaactc	ctgccctcag	gtgatccacc	tgctcgggcc	tcccagagtg	ctgggattac	11820
	aggcgtgagc	caccgcacct	gccacaggcc	catacctctt	ttaagtcttc	attcaatacc	11880
	agttgtccca	tgaatttggt	ccagactcac	tcatatgctt	agacctttca	tattatcttg	11940
30	ccatagcttt	ttcaaaagtat	gggacagcat	ggacaagcag	gccatgggtt	tcttttgaag	12000
	agaagcaagg	aggcagagtt	attttaggag	gagggttata	catttcattt	tgaaccaatt	12060
	gcgtttgggg	tgatggcagg	atattaacat	aaacttattt	cttggaccat	tggaaatgtg	12120
	tgccctagaac	tgaggagaga	ggtcagggct	ggcagtaaca	acttggccac	aatctgcaga	12180
	gctgactggg	gatgaggtgg	aattttagaat	gtctgtagaa	acggggaaga	gaaccaaaga	12240
35	cagagtctgg	gacaacacct	aaatgtagat	gtcagagcaa	gagttcaaga	cgaagaaaaa	12300
	cgaatcatac	ttagaaatgg	aggggaggaa	caaaaagggc	ggagcaaagt	ggggcagaac	12360
	cagagtaggc	cacgctttta	agaagtttg	taaaggaaact	gtgaaaggaa	tgtagttgaa	12420
	tttcagggtta	agctggggaa	ttaaagcagt	gtgtagatcc	agggcaaaca	gcaagtaggg	12480
	caggaaccac	tgaaggaaca	aataaaaggg	gagggttggt	ccagggtgtc	ttgagtaggg	12540
40	aagttttttt	aaaaagtgtg	aaactgaagg	tgtggggtgg	attgggtgcc	tgccgtgctc	12600
	tgaggaagct	tggggcaact	gtgtgctgag	gctgtgaggt	tgtctggaag	gggctcctgg	12660
	acagtaagag	ctgagcagtg	gggaagagga	ctgtgtggct	tggaaagagga	gagaaaggag	12720
	agtgaagtac	tgaactggta	tccaggctcc	cacaccaagg	cagaaagagg	gagaggacct	12780
	gggcatctca	gggaggcaga	ggcagtacca	agcagggtga	gaggctttag	tcttagccac	12840
45	ctttgccccca	ttcctccaaa	tatacattct	aagtaaaaaac	aaaacaaaaac	agaactgttt	12900
	gctatgtaaa	tttagcttct	aaagccctgt	tctacagaga	ttttggagct	tccactgcac	12960
	ccagaaaatg	cacagctaaa	gagaaaactt	cccttggtga	tggttattag	attttacaag	13020
	aagaggccaa	aggagacaca	tacttatgcc	agaagaactt	tccagagata	gcattgcata	13080

	gcgaaatagc	ctgaattatt	tttatttttt	aaaacatttt	ttctttttctt	ttttcttttc	13140
	tttttctttt	tttttttttt	tttttgagac	agagtctcac	tctgtcaccc	aggctggagt	13200
	gcagtggcgt	gatcttggct	cactgcaatc	tccacctccc	gggttcaagc	cattctcctc	13260
	cctcagcctc	ccaagtagct	gggattacag	gcatgctgca	ctatgctctg	gctaattttt	13320
5	tttttctttt	tttttttggg	attttttagta	gagatggggg	ttcaccatgt	tggccaggct	13380
	gggtcttgaa	tcctgacctc	aagtgatcca	ccgccttggc	ctcccaaagt	gctgggattt	13440
	caggcgtgag	ccaccgcacc	cggccaaaaa	tttcttttct	ttaagatgag	gcctcactct	13500
	gttgcccagg	ctggagtgca	gtgttacaat	catagctcac	tgtaactttg	aactcctggg	13560
	ctcaagtgat	cctcctgctt	cagcctctca	agtagctggg	attacaggca	tgtgccacca	13620
10	caccagctta	atttttttta	aaataatttt	tttttagagac	gagggctctcg	attggctgcc	13680
	taggtttggg	ccagactcct	gacgggctgc	attttaatcc	tagctccacc	acttacggga	13740
	gtcaaaattc	aaaagataga	aaagggcata	taggctgggt	gcagtggctc	acacctgcaa	13800
	tcccagcaat	ttgggagggt	gaggtgggct	gggtgcttga	ggtcaggagt	tcgagatcag	13860
	cctgggcaac	atggcaaaac	ttgtatctac	taaaaataca	aaaattagcc	agatgtgggt	13920
15	gtgtacacct	gtaatcccag	ctactccgaa	ggctgaggca	agagaatccc	ttgaactcag	13980
	gaggcagagg	ttacaatgag	cagagatcga	acactcgact	ccataaaaaa	aaacaaacaa	14040
	aaaaagaaag	caggctgggt	gtgggtggctc	acgcctgtaa	ccccagcact	tcgggaggcc	14100
	aaggcgagcg	gatcacctga	ggttgggcat	tcgagaccag	cctgaccaac	aaggagaaac	14160
	cctgtctcta	ctgaaaatac	aaaattagcc	gggcttgggt	gcgcatgcct	gtaatctcag	14220
20	ctactcggga	ggcagaggca	agataattgc	ttgaaccgga	gaggcggagg	ttgcgggtgag	14280
	ccaagatcat	gccattgcac	tccaacctgg	gcaacaatag	cgaaactcca	tctcaaaaaa	14340
	aaaaaagcaa	agggcatata	gtgaaaagct	ttcttcctac	acatgagtat	tcacttcctc	14400
	ttcctagagg	caaccaaggt	tattttttgtg	tgtgtgtgtg	tgtgtgtgtg	tgtgtgtgtg	14460
	tgttttggga	cagtctcact	ctctcaccaa	ggctggaatg	cagtgggtgcg	atctcactgc	14520
25	aaactctgcc	tcccagtcct	aagcgatctt	gtgcctcagc	ctcccagttt	ttttttcttt	14580
	taaatggggg	ctcattctgt	cgcccagggt	ggagtgcagt	ggcatgatca	tagctcactg	14640
	cagcctcgac	ctcctgggtc	aggttatcct	cccacctcag	cctccggcat	agctggggct	14700
	actggcatgc	accaccacac	tcagtttaatt	ttttttcttt	tttgagacag	agtctcactc	14760
	tgtcacctag	actggagtg	agtggtgcca	tctcatttgt	ttcactgcaa	cctttgactt	14820
30	ctgggctcaa	gtgattctcc	cacctcagcc	tcccaaggcg	gctaattaaa	aaaaattttt	14880
	tttttttttt	tttttagagat	gggggtttcgc	catgttgccc	aggctgatct	cgaactcctg	14940
	ggcacaaaca	atctttccac	ctcgatcttt	caaagagctg	ggatgagaga	tttccaccat	15000
	gcctggcctc	atttttcttt	ttaatttttt	tttagacatt	atagctcttt	ttaatggcct	15060
	cattttctta	tgtttaattc	gagaattatt	cttttcatat	acaaagaata	tattttctcc	15120
35	acctttaaaa	acaaatagta	gactgtttta	catctcgctt	tattcagtta	gtgatgtttc	15180
	ttagatacgg	gtccaaatta	gtacacaaag	cacttcctca	ttcctctctt	acggctgcat	15240
	agcagtccac	tgaatgggtg	agctatgatc	tatttaacct	attctttatt	gatggacatt	15300
	tggttttgta	tatacatttg	taattctgta	tagattacaa	atcaccatcc	aaagaaattg	15360
	tactggttta	ttctcctaca	atgtgtgaga	gttgggtaat	tacttaatct	caatatgtga	15420
40	gagtttaggc	agttacctaa	tctctctgag	tctcagtttc	tctatctgca	aaataaacia	15480
	aacagtgttg	acagtatcta	tttctcggaa	ttattgtgga	gattactgag	atgatgcttg	15540
	taaagtattt	ggcatgtagg	agttgggtgct	ctccaaataa	ggatatgatt	ttatttgtat	15600
	ttgtgagcta	ctgtcccagc	caggtaaatg	gatatgatga	gacctccttg	ccagaccggg	15660
	tttctctgat	tagaacgagg	agcagatggt	gcaggaaatt	agcaactgat	atcagaagag	15720
45	ccgtgggcat	tctcttgcca	gaggtgccct	gtctccaggg	cgctcagtc	ccccccata	15780
	tgtcttctgc	tcccagggtcc	atccaagctg	aatgatcgcg	ctgactcaag	aagaagcctt	15840
	tgggaccaag	gaaactttcc	cctgatcatc	aagaatctta	agatagaaga	ctcagatact	15900
	tacatctgtg	aagtggagga	ccagaaggag	gaggtgcaat	tgctagtgtt	cggatgtgag	15960

5	tgggggcaggt	gggggatgagg	atacctcctg	cctgggttccc	ttccccacta	ctccccacccc	16020
	tgcaccaaatt	ccagcctgag	ctggtgatac	cgcagcagcc	ccaagaggac	caggctgtca	16080
	aactggcctc	caaattgtctt	aaaacccttc	ttgatcaggt	gaggggatgct	ggtgggcgga	16140
	ggaggggaaga	ggccttgggga	aaaggaaaga	aaaggggaagg	aggcaaggga	aggagggaga	16200
	gagactgggg	aagagaggat	gaggggagag	gaggaaagaa	gagagagagg	aggggagagg	16260
	gaaaccctat	cttggctggg	ggtgcgcagc	tgggtgctgg	gaggaaggag	atgttgggac	16320
	ggcgataatg	gagagatggt	gttgggtttcc	tgttgtctgc	ccttctcctt	ggggatggta	16380
	tgtgtgtgac	acagctggcc	tttcctcca	cagtgactgc	caactctgac	accacactgc	16440
10	ttcaggggca	gagcctgacc	ctgaccttgg	agagcccccc	tggtagtagc	ccctcagtgc	16500
	aatgtaggag	tccaaggggt	aaaaacatac	aggggggggaa	gaccctctcc	gtgtctcagc	16560
	tggagctcca	ggatagtggc	acctggacat	gcactgtctt	gcagaaccag	agaaggtgg	16620
	agttcaaaat	agacatcgtg	gtgctaggta	aggggaagccc	ctcttcgcgc	agtctcctcc	16680
15	ctgccccagg	ggctgacagc	ccctccctct	gctctgactg	ccctgtttct	ggttctgggtg	16740
	ctgggaggtc	aggagtggag	aagactaggt	cccctagagc	tgaggcctgt	cttgaaggac	16800
	tcactggggc	cctcatcctc	agggggctga	ttggcagcca	cccctcagtg	tggtggacat	16860
	ggagaaagga	aaggctgggg	aaggtaagga	tgctagaggc	ccgagtctcc	tttgagggcc	16920
	ccaaaggagg	aatgtcaggg	agcttacttt	ctttgttgcc	tcagctccac	accctacca	16980
	agttggcaaa	tccacttact	cagggacact	aacaccagta	agccaaccct	gatgatgttc	17040
	tatgttgtac	ctctggacct	ctaagccagg	ccactgtggg	gagaccaagg	tcctacccca	17100
	20	gacctgttcc	cctgggtgct	tatgtgactt	aaggtagaca	taaggtagtg	tgccagttta
gtgcatgtac		gctgattgaa	atcctgggtc	tgccacaacc	atgtgacctt	gggtgagtta	17220
ctaaacctct		ctgcaccttg	gtttcagcct	ctgtgaaatg	gggatgatgt	taactgccat	17280
agtgactacc		tcgtattaaag	ttgaggactg	atatacgtaa	ggcactgaaa	atgggtgcctg	17340
25	gcacagagta	agccctagtt	aagtgttcgc	tgttattttg	tgaaggggtga	tgaatacgcc	17400
	tctaaggagt	ggaggccaaa	tggcttctgt	ggtccaggaa	tcctaaggac	agcaaggatc	17460
	ccctgtggct	gggctgctct	gtgatggctt	ccgggaggag	ggaggtggcc	tgctgtagga	17520
	aaatgctggg	tggaagaagg	gagagaaggc	tggagaggta	ggaaggaact	gaagtatctg	17580
30	aagtgacaag	gtgggtgtct	ggactcgtcg	ggtcccccttc	catctccctg	ctgcctccac	17640
	atgccaaacc	cactcgtgca	ccctcatctt	cctatctcct	caccaggggt	ctctcccttc	17700
	ccacctccag	ctttccagaa	ggcctccagc	atagtctata	agaaagaggg	ggaacagggtg	17760
	gagttctcct	tccactcgc	ctttacagtt	gaaaagctga	cgggcagtgg	cgagctgtgg	17820
	tggcaggcgg	agagggtctc	ctcctccaag	tcttggatca	cctttgacct	gaagaacaag	17880
	gaagtgtctg	taaaacgggt	taccagggac	cctaagctcc	agatgggcaa	gaagctcccg	17940
	ctccacctca	ccctgccccca	ggccttgccct	cagtatgctg	gctctggaaa	cctcaccttg	18000
	35	gcccttgaag	cgaaaacagg	aaagttgcat	caggaagtga	acctggtgggt	gatgagaggt
gagggggccag		gccagggagg	ggtgggcagg	ggaaggagtt	ggaggggcct	ggcccagggc	18120
tccctctgag		gcaagccagg	ccccaagagg	ggatgcctag	gccctggtca	cctggatgaa	18180
gtgagggagg		gccctctggg	tttggggctg	gttttgaact	gagacatcca	tgagccagcc	18240
40	tggggctggc	ttcactgaag	atc				18263
	<210>	78					
	<211>	458					
	<212>	PRT					
	<213>	Искусственная последовательность					
45	<220>						
	<223>	синтетический					
	<400>	78					

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

15

RU 2 732 628 C2

	Leu	Ser	Gln	Leu	Leu	Ala	Val	Thr	Gln	Gly	Lys	Lys	Val	Val	Leu	Gly
				20					25					30		
	Lys	Lys	Gly	Asp	Thr	Val	Glu	Leu	Thr	Cys	Thr	Ala	Ser	Gln	Lys	Lys
			35					40					45			
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	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

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 20 25 30  
Gln Ile Lys Ile Leu Gly Asn Gln Gly Ser Phe Leu Thr Lys Gly Pro  
35 40 45  
Ser Lys Leu Asn Asp Arg Ala Asp Ser Arg 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 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

	260	265	270
	Thr Leu Ala Leu Glu Ala Lys	Thr Gly Lys Leu His Gln	Glu Val Asn
	275	280	285
	Leu Val Val Met Arg		
5	290		
	<210> 80		
	<211> 142		
	<212> ДНК		
	<213> Искусственная последовательность		
10	<220>		
	<223> синтетический		
	<400> 80		
	tgtttgcttg tgacatgaac tcattgtgac 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		
	ccccctcttc cttccccagg cactttccaa gtgtcaactc tagagcctat cgcggccgca		60
	ccggtataac ttcgtataat gtagtgctata cgaagttag		99
25	<210> 82		
	<211> 90		
	<212> ДНК		
	<213> Искусственная последовательность		
	<220>		
30	<223> синтетический		
	<400> 82		
	ataacttcgt ataatgtatg ctatacgaag ttatgtcgac gtagcctatt tctctagatc		60
	caaaatgatg acaacaaaag gtaccttggtg		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		

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 Leu Ala Phe Leu Gly Val Ala Val Tyr  
180 185 190  
Phe Tyr Cys Val Arg 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>  
 5 <223> синтетический  
 <400> 85  
 tgaacctgct gctgctgggt gagtcgatta tcctggggag tggagaagct aggccgagcc 60  
 agttccgggt gtcgccgctg gatcggacct ggaacctggg 100  
 <210> 86  
 10 <211> 90  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <223> синтетический  
 15 <400> 86  
 atgccaggga cagccctgat actgtaggta gagtcaaggg ctgtccaagt accggtataa 60  
 cttcgtataa ggtatcctat acgaagtatt 90  
 <210> 87  
 <211> 89  
 20 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <223> синтетический  
 <400> 87  
 25 ataacttcgt ataaggatc ctatacgaag ttatctcgac ctgatcttgg agggagacct 60  
 ggaccgggag acgtgctggg ggcagggtt 89  
 <210> 88  
 <211> 243  
 <212> PRT  
 30 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <223> синтетический  
 <400> 88  
 Met Ala Ser Pro Leu Thr Arg Phe Leu Ser Leu Asn Leu Leu Leu Leu  
 35 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  
 40 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  
 45 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					160
	Ala	Ser	Gln	Pro	Leu	Ser	Leu	Arg	Pro	Glu	Ala	Cys	Arg	Pro	Ala	Ala
					165					170					175	
	Gly	Gly	Ala	Val	Lys	Gly	Thr	Gly	Leu	Asp	Phe	Ala	Cys	Asp	Ile	Tyr
				180				185						190		
10	Ile	Trp	Ala	Pro	Leu	Ala	Gly	Ile	Cys	Val	Ala	Leu	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						240
	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					15	
	Gly	Glu	Thr	Val	Glu	Leu	Lys	Cys	Gln	Val	Leu	Leu	Ser	Asn	Pro	Thr
				20					25					30		
	Ser	Gly	Cys	Ser	Trp	Leu	Phe	Gln	Pro	Arg	Gly	Ala	Ala	Ala	Ser	Pro
		35					40				45					
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					80	
	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	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/мышинного локуса МНС I в участке соединения 5' мышинной/человеческой последовательностей

<400> 90

agtgtcgccg cggacgctgg atataaagtc cacgcagccc gcagaactca gaagtcgcga 60

5 atcgccgaca ggtgcgatgg ccgtcatggc gcccgaacc ctgctcctgc tactctcggg 120

ggctctggcc ctgacccaga cctgggagg 149

<210> 91

<211> 159

<212> ДНК

10 <213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Последовательность химерного человеческого/мышинного локуса МНС I в участке соединения 3' человеческой/мышинной последовательностей

<400> 91

15 ggtggtgcct tctggacagg agcagagata cacctgccat gtgcagcatg agggtttgcc 60

caagcccctc accctgagat ggggtaagga gagggtgggt gcagagctgg ggtcagggaa 120

agctggagct ttctgcagac cctgagctgc tcaggggctg 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

25 мыши,

при этом мышь экспрессирует химерный корецептор CD4;

(b) вторую нуклеотидную последовательность и третью нуклеотидную последовательность, соответственно кодирующие химерный полипептид CD8 $\alpha$  и химерный полипептид CD8 $\beta$ ,

30 при этом химерный полипептид CD8 $\alpha$  содержит внеклеточный участок человеческого полипептида CD8 $\alpha$  и по меньшей мере трансмембранный и цитоплазматический домены полипептида CD8 $\alpha$  мыши,

при этом химерный полипептид CD8 $\beta$  содержит внеклеточный участок человеческого полипептида CD8 $\beta$  и по меньшей мере трансмембранный и цитоплазматический домены полипептида CD8 $\beta$  мыши, и

35 при этом мышь экспрессирует химерный корецептор CD8, содержащий химерный полипептид CD8 $\alpha$  и химерный полипептид CD8 $\beta$ ;

(с) первую последовательность нуклеиновой кислоты и вторую последовательность нуклеиновой кислоты, соответственно кодирующие химерный полипептид МНС II  $\alpha$  и химерный полипептид МНС II  $\beta$ ,

40 при этом химерный полипептид МНС II  $\alpha$  содержит внеклеточный участок человеческого полипептида HLA класса II  $\alpha$  и по меньшей мере трансмембранный и цитоплазматический домены полипептида МНС II  $\alpha$  мыши,

при этом химерный полипептид МНС II  $\beta$  содержит внеклеточный участок человеческого полипептида HLA класса II  $\beta$  и по меньшей мере трансмембранный и цитоплазматический домены полипептида МНС II  $\beta$  мыши,

45 при этом у мыши экспрессируется химерный комплекс МНС II, содержащий химерный полипептид МНС II  $\alpha$  и химерный полипептид МНС II  $\beta$ ; 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)  $\alpha$ , содержащую по меньшей мере один человеческий сегмент V $\alpha$  и по меньшей мере один человеческий сегмент J $\alpha$ , которые перестраиваются в Т-клетке с образованием перестроенной человеческой последовательности V $\alpha$ /J $\alpha$ , функционально связанной с последовательностью константного участка TCR $\alpha$  мыши; и

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

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

при этом перестроенная человеческая последовательность V $\beta$ /D $\beta$ /J $\beta$ , функционально  
 25 связанная с последовательностью константного участка TCR $\beta$  мыши, кодирует гуманизированную цепь TCR $\beta$ , содержащую человеческий вариабельный домен TCR $\beta$ , функционально связанный с константным доменом TCR $\beta$  мыши, и

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

30 гуманизированную цепь TCR $\beta$ , 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 $\alpha$  и химерный полипептид CD8 $\beta$ ;

(c) первую и вторую последовательности нуклеиновых кислот, соответственно  
 40 кодирующие химерный полипептид МНС II  $\alpha$  и химерный полипептид МНС II  $\beta$ ;

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

(e) неперестроенную последовательность вариабельного участка TCR $\alpha$ , содержащую по меньшей мере один человеческий сегмент V $\alpha$  и по меньшей мере один человеческий  
 45 сегмент J $\alpha$ , которые перестраиваются в Т-клетке с образованием перестроенной человеческой последовательности V $\alpha$ /J $\alpha$ , функционально связанной с последовательностью константного участка TCR $\alpha$  мыши, и неперестроенную последовательность вариабельного участка TCR $\beta$ , содержащую по меньшей мере один

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

5 3. Генетически модифицированная мышь по п. 1, у которой:

(а) первая нуклеотидная последовательность находится в эндогенном локусе Т-клеточного корцептора CD4;

10 (b) вторая нуклеотидная последовательность находится в эндогенном локусе Т-клеточного корцептора CD8 $\alpha$  и третья нуклеотидная последовательность находится в эндогенном локусе Т-клеточного корцептора CD8 $\beta$ ;

(с) первая последовательность нуклеиновой кислоты находится в эндогенном локусе MHC II  $\alpha$  мыши и вторая последовательность нуклеиновой кислоты находится в эндогенном локусе MHC II  $\beta$  мыши;

15 (d) третья последовательность нуклеиновой кислоты находится в эндогенном локусе MHC I мыши; и/или

(е) неперестроенная последовательность варибельного участка TCR $\alpha$  находится в эндогенном локусе варибельного участка TCR $\alpha$  и неперестроенная последовательность варибельного участка TCR $\beta$  находится в эндогенном локусе варибельного участка TCR $\beta$ .

20 4. Генетически модифицированная мышь по п. 3, у которой:

(а) первая нуклеотидная последовательность экспрессируется под регуляторным контролем эндогенных промоторных и регуляторных элементов корцептора CD4 мыши;

25 (b) вторая нуклеотидная последовательность экспрессируется под регуляторным контролем эндогенных промоторных и регуляторных элементов полипептида CD8 $\alpha$  мыши и третья нуклеотидная последовательность экспрессируется под регуляторным контролем эндогенных промоторных и регуляторных элементов полипептида CD8 $\beta$  мыши;

30 (с) первая последовательность нуклеиновой кислоты экспрессируется под регуляторным контролем эндогенных промоторных и регуляторных элементов MHC II  $\alpha$  мыши и вторая последовательность нуклеиновой кислоты экспрессируется под регуляторным контролем эндогенных промоторных и регуляторных элементов MHC II  $\beta$  мыши;

35 (d) третья последовательность нуклеиновой кислоты экспрессируется под регуляторным контролем эндогенных промоторных и регуляторных элементов MHC I мыши; и/или

40 (е) неперестроенная последовательность варибельного участка TCR $\alpha$  экспрессируется под регуляторным контролем эндогенных промоторных и регуляторных элементов TCR $\alpha$  и неперестроенная последовательность варибельного участка TCR $\beta$  экспрессируется под регуляторным контролем эндогенных промоторных и регуляторных элементов TCR $\beta$ .

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

45 (а) химерный корцептор CD4 содержит домены D1, D2 и D3 человеческого полипептида CD4, функционально связанные с D4, трансмембранным и цитоплазматическим доменами эндогенного полипептида CD4 мыши,

(b) химерный полипептид CD8 $\alpha$  содержит IgV-подобный домен человеческого полипептида CD8 $\alpha$ , функционально связанный с трансмембранным и цитоплазматическим доменами эндогенного полипептида CD8 $\alpha$  мыши, и химерный

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

5 (с) химерный полипептид МНС II  $\alpha$  содержит домены  $\alpha 1$  и  $\alpha 2$  человеческого HLA класса II, функционально связанные с трансмембранным и цитоплазматическим доменами мыши эндогенного полипептида МНС II  $\alpha$  мыши, и химерный полипептид МНС II  $\beta$  содержит домены  $\beta 1$  и  $\beta 2$  человеческого HLA класса II, функционально связанные с трансмембранным и цитоплазматическим доменами эндогенного полипептида МНС II  $\beta$  мыши; и/или

10 (d) химерный полипептид МНС I содержит домены  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  и  $\alpha 3$  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  $\alpha$  кодируется геном 15 человеческого лейкоцитарного антигена (HLA) класса II, выбранным из группы, состоящей из любого гена цепи  $\alpha$  HLA-DR, HLA-DQ и HLA-DP;

при этом человеческий внеклеточный участок химерного полипептида МНС II  $\beta$  кодируется геном HLA класса II, выбранным из группы, состоящей из любого гена цепи  $\beta$  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  $\alpha$  и химерного полипептида 25 МНС II  $\beta$  соответственно кодируются геном цепи  $\alpha$  и геном цепи  $\beta$  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  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\beta 1$  и  $\beta 2$  человеческого белка HLA-DR2.

30 9. Генетически модифицированная мышь по п. 7, у которой химерный полипептид МНС I содержит домены  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  и  $\alpha 3$  человеческого белка HLA-A2.

10. Генетически модифицированная мышь по п. 1, у которой неперестроенная последовательность варибельного участка TCR $\alpha$  содержит набор человеческих 35 сегментов гена V $\alpha$  и набор человеческих сегментов гена J $\alpha$  и/или неперестроенная последовательность варибельного участка TCR $\beta$  содержит набор человеческих сегментов гена V $\beta$ , набор человеческих сегментов гена D $\beta$  и набор человеческих сегментов гена J $\beta$ .

11. Генетически модифицированная мышь по п. 1, причем в эндогенном варибельном локусе TCR $\alpha$  мыши отсутствуют все или по существу все функциональные эндогенные 40 сегменты гена V $\alpha$  и/или отсутствуют все или по существу все функциональные эндогенные сегменты гена J $\alpha$ ; и/или

причем в эндогенном варибельном локусе TCR $\beta$  мыши (a) отсутствуют все или по существу все функциональные эндогенные сегменты гена V $\beta$ , (b) отсутствуют все или по существу все функциональные эндогенные сегменты гена D $\beta$ , (c) отсутствуют все 45 или по существу все функциональные эндогенные сегменты гена J $\beta$  или (d) любая комбинация (a), (b) и (c).

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

(a) 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;

(b) вторая нуклеотидная последовательность содержит последовательность, кодирующую внеклеточный участок человеческого полипептида CD8 $\alpha$ , которая (i) замещает последовательность, кодирующую внеклеточный участок эндогенного полипептида CD8 $\alpha$  мыши, и (ii) функционально связана с эндогенными последовательностями, кодирующими трансмембранный и цитоплазматический домены CD8 $\alpha$  мыши, в эндогенном локусе полипептида CD8 $\alpha$  мыши, и

третья нуклеотидная последовательность содержит последовательность, кодирующую внеклеточный участок человеческого полипептида CD8 $\beta$ , которая (i) замещает последовательность, кодирующую внеклеточный участок эндогенного полипептида CD8 $\beta$  мыши, и (ii) функционально связана с эндогенными последовательностями, кодирующими трансмембранный и цитоплазматический домены CD8 $\beta$  мыши, в эндогенном локусе полипептида CD8 $\beta$ ;

(c) первая последовательность нуклеиновой кислоты содержит последовательность, кодирующую внеклеточный участок человеческого полипептида HLA класса II  $\alpha$ , которая (i) замещает последовательность, кодирующую внеклеточный участок эндогенного полипептида MHC II  $\alpha$  мыши, и (ii) функционально связана с эндогенными последовательностями, кодирующими трансмембранный и цитоплазматический домены полипептида MHC II  $\alpha$ , в эндогенном локусе MHC II  $\alpha$  мыши, и

вторая нуклеиновая кислота содержит последовательность, кодирующую внеклеточный участок человеческого полипептида HLA класса II  $\beta$ , которая (i) замещает последовательность, кодирующую внеклеточный участок эндогенного полипептида MHC II  $\beta$  мыши, и (ii) функционально связана с эндогенными последовательностями, кодирующими трансмембранный и цитоплазматический домены полипептида MHC II  $\beta$ , в эндогенном локусе MHC II  $\beta$  мыши;

(d) третья последовательность нуклеиновой кислоты содержит последовательность, кодирующую внеклеточный участок человеческого полипептида HLA класса I, которая (i) замещает последовательность, кодирующую внеклеточный участок эндогенного полипептида MHC I мыши, и (ii) функционально связана с эндогенными последовательностями, кодирующими трансмембранный и цитоплазматический домены полипептида MHC I, в эндогенном локусе MHC I мыши; и/или

(e) неперестроенная последовательность варибельного участка TCR $\alpha$  замещает один или более эндогенных сегментов гена V $\alpha$  и/или J $\alpha$  в эндогенном локусе варибельного участка TCR $\alpha$  и неперестроенная последовательность варибельного участка TCR $\beta$  замещает один или более эндогенных сегментов гена V $\beta$ , D $\beta$  и/или J $\beta$  в эндогенном локусе варибельного участка TCR $\beta$ .

13. Генетически модифицированная мышь по п. 1, причем у мыши не экспрессируется (a) функциональный эндогенный корецептор CD4 и/или CD8 мыши из эндогенных локусов корецептора CD4 и/или CD8 соответственно, (b) эндогенный варибельный домен TCR $\alpha$  из эндогенного локуса TCR $\alpha$ , (c) эндогенный варибельный домен TCR $\beta$  из эндогенного локуса TCR $\beta$  и/или (d) внеклеточный домен эндогенного полипептида классического MHC класса I и/или класса II из своего эндогенного локуса MHC 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  $\beta 2$ -микроглобулин.

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

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.

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/мышинный корецептор CD4, содержащий домены D1, D2 и D3 человеческого полипептида CD4, функционально связанные с по меньшей мере трансмембранным и цитоплазматическим доменами мышинного полипептида CD4, полипептиды корецепторов CD8 $\alpha$  и CD8 $\beta$ , каждый из которых соответственно содержит внеклеточный участок человеческого полипептида корецептора CD8 $\alpha$  и CD8 $\beta$ , функционально связанный с мышинными трансмембранным и цитоплазматическим доменами CD8 $\alpha$  и CD8 $\beta$ ;

химерный человеческий/мышинный Т-клеточный рецептор, содержащий человеческий вариабельный участок TCR $\alpha$  и человеческий вариабельный участок TCR $\beta$ , каждый из которых соответственно функционально связан с мышинным константным участком TCR $\alpha$  и мышинным константным участком TCR $\beta$  на поверхности Т-клетки;

химерные человеческие/мышинные полипептиды МНС II  $\alpha$ , МНС II  $\beta$  и МНС I, каждый из которых соответственно содержит внеклеточный участок человеческого полипептида HLA класса II  $\alpha$ , HLA класса II  $\beta$  и HLA класса I, функционально связанный с мышинными трансмембранным и цитоплазматическим доменами мышинного полипептида МНС класса II  $\alpha$ , МНС класса II  $\beta$  и МНС класса I; и

гуманизированный полипептид  $\beta 2$ -микроглобулин.

20. Генетически модифицированная мышь по п. 1, причем у мыши экспрессируются по меньшей мере 50% всех функциональных человеческих сегментов гена TCRV $\alpha$  и/или по меньшей мере 50% всех функциональных человеческих сегментов гена TCRV $\beta$ .

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

(а) химерный человеческий/мышинный корецептор CD4 содержит домены D1, D2 и D3 человеческого полипептида CD4, функционально связанные с D4, трансмембранным и цитоплазматическим доменами эндогенного мышинного полипептида CD4,

(б) химерный человеческий/мышинный полипептид CD8 $\alpha$  содержит IgV-подобный домен человеческого полипептида CD8 $\alpha$ , функционально связанный с трансмембранным и цитоплазматическим доменами эндогенного мышинного полипептида CD8 $\alpha$ , и химерный человеческий/мышинный полипептид корецептора CD8 $\beta$  содержит IgV-подобный домен человеческого полипептида CD8 $\beta$ , функционально связанный с трансмембранным и цитоплазматическим доменами эндогенного мышинного полипептида CD8 $\beta$ ;

(с) химерный человеческий/мышинный полипептид МНС II  $\alpha$  содержит домены  $\alpha 1$  и

$\alpha 2$  человеческого HLA класса II, функционально связанные с мышинными трансмембранным и цитоплазматическим доменами эндогенного мышинового полипептида МНС II  $\alpha$ , и химерный человеческий/мышинный полипептид МНС II  $\beta$  содержит домены  $\beta 1$  и  $\beta 2$  человеческого HLA класса II, функционально связанные с трансмембранным и цитоплазматическим доменами эндогенного мышинового полипептида МНС II  $\beta$ ,

(d) химерный полипептид МНС I содержит домены  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  и  $\alpha 3$  человеческого HLA класса I, функционально связанные с трансмембранным и цитоплазматическим доменами эндогенного мышинового полипептида МНС I; и/или

(e) гуманизированный полипептид  $\beta 2$ -микроглобулин, кодируемый нуклеотидной последовательностью, содержащей нуклеотидную последовательность, представленную в экзоне 1 эндогенного мышинового гена  $\beta 2$ -микроглобулина, функционально связанную с нуклеотидной последовательностью, представленной в экзоне 2, экзоне 3 и экзоне 4 человеческого гена  $\beta 2$ -микроглобулина.

22. Генетически модифицированная мышь по п. 21, у которой химерный человеческий/мышинный полипептид МНС II  $\alpha$  представляет собой химерный полипептид HLA-DR/H-2E  $\alpha$ , химерный полипептид МНС II  $\beta$  представляет собой химерный человеческий/мышинный полипептид HLA-DR/H-2E  $\beta$  и химерный полипептид МНС I представляет собой химерный человеческий/мышинный 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 CD8 $\alpha$  и химерный полипептид CD8 $\beta$ ;

(c) первой и второй последовательностей нуклеиновых кислот, соответственно кодирующих химерный полипептид МНС II  $\alpha$  и химерный полипептид МНС II  $\beta$ ;

(d) третьей последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей химерный полипептид МНС I;

(e) неперестроенной последовательности варибельного участка TCR $\alpha$ , содержащей по меньшей мере один человеческий сегмент V $\alpha$  и по меньшей мере один человеческий сегмент J $\alpha$ , которые перестраиваются в Т-клетке с образованием перестроенной человеческой последовательности V $\alpha$ /J $\alpha$ , функционально связанной с

последовательностью константного участка TCR $\alpha$  мыши, и неперестроенной последовательности варибельного участка TCR $\beta$ , содержащей по меньшей мере один человеческий сегмент V $\beta$ , по меньшей мере один человеческий сегмент D $\beta$  и по меньшей мере один человеческий сегмент J $\beta$ , которые перестраиваются в Т-клетке с образованием перестроенной человеческой последовательности V $\beta$ /D $\beta$ /J $\beta$ , функционально связанной с последовательностью константного участка TCR $\beta$  мыши; и

(f) необязательно локуса  $\beta 2$ -микроглобулина, кодирующего человеческий или гуманизированный полипептид  $\beta 2$ -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 варибельного участка TCR $\alpha$  и неперестроенную последовательность варибельного участка TCR $\beta$ , первую, вторую и третью



последовательность нуклеиновой кислоты и необязательно локус  $\beta 2$ -микроглобулина.

25. Способ по п. 24, дополнительно включающий создание мыши из эмбриональной стволовой клетки мыши, содержащей

первую, вторую и третью нуклеотидные последовательности, неперестроенную последовательность варибельного участка TCR $\alpha$  и неперестроенную последовательность варибельного участка TCR $\beta$ , первую, вторую и третью последовательность нуклеиновой кислоты и необязательно локус  $\beta 2$ -микроглобулина.

26. Способ получения клетки, которая экспрессирует белок TCR, который специфичен к антигену и содержит человеческий варибельный домен TCR,

причем способ включает

выделение из мыши по п. 1 Т-клетки, экспрессирующей белок TCR, который специфичен к антигену и содержит как человеческий варибельный домен TCR  $\alpha$ , так и человеческий варибельный домен TCR  $\beta$ .

27. Способ получения белка TCR, который специфичен к антигену и содержит человеческий варибельный домен TCR,

причем способ включает

получение из мыши по п. 1 Т-клетки, экспрессирующей белок TCR, который специфичен к антигену и содержит как человеческий варибельный домен TCR  $\alpha$ , так и человеческий варибельный домен TCR  $\beta$ , и выделение белка TCR.

28. Способ получения человеческого варибельного 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 варибельный домен TCR  $\alpha$ , так и человеческий варибельный домен TCR  $\beta$ , и выделение человеческого варибельного домена TCR  $\alpha$  и/или человеческого варибельного домена TCR  $\beta$ .

29. Способ получения последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей человеческий варибельный домен 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 варибельный домен TCR  $\alpha$ , так и человеческий варибельный домен TCR  $\beta$ , и выделение последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей человеческий варибельный домен TCR  $\alpha$ , и/или последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей человеческий варибельный домен TCR  $\beta$ .

30. Способ по любому из пп. 26-28, дополнительно включающий:

внедрение в клетку-хозяина одного или более экспрессионных векторов, содержащих (i) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую человеческий варибельный домен TCR  $\alpha$  в функциональной взаимосвязи с человеческим константным участком TCR  $\alpha$ , и/или (ii) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую человеческий варибельный домен TCR  $\beta$  в функциональной взаимосвязи с человеческим константным участком TCR  $\beta$ ,

культивирование клетки-хозяина в условиях, достаточных для экспрессии (i) и/или (ii),

причем последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие человеческий варибельный домен TCR  $\alpha$  и человеческий варибельный домен TCR  $\beta$  находятся на одном или разных экспрессионных векторах.

31. Способ по п. 30, в котором один или более экспрессионных векторов содержат последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую человеческий варибельный домен TCR $\alpha$ , функционально связанную с последовательностью, кодирующей

человеческий константный участок TCR $\alpha$ , и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую человеческий вариабельный домен TCR $\beta$ , функционально связанную с последовательностью, кодирующей человеческий константный участок TCR $\beta$ .

32. Способ по любому из пп. 26-31, в котором антиген представляет собой опухолевый 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 корцептор CD4, который содержит домены D1, D2 и D3 человеческого полипептида CD4 и по меньшей мере трансмембранный и цитоплазматический домены полипептида CD4 мыши,

(b) вторую нуклеотидную последовательность и третью нуклеотидную последовательность, соответственно кодирующие химерный полипептид CD8 $\alpha$  и химерный полипептид CD8 $\beta$ ,

при этом химерный полипептид CD8 $\alpha$  содержит внеклеточный участок человеческого полипептида CD8 $\alpha$  и по меньшей мере трансмембранный и цитоплазматический домены полипептида CD8 $\alpha$  мыши,

при этом химерный полипептид CD8 $\beta$  содержит внеклеточный участок человеческого полипептида CD8 $\beta$  и по меньшей мере трансмембранный и цитоплазматический домены полипептида CD8 $\beta$  мыши,

(с) первую последовательность нуклеиновой кислоты и вторую последовательность нуклеиновой кислоты, соответственно кодирующие химерный полипептид MHC II  $\alpha$  и химерный полипептид MHC II  $\beta$ ,

при этом химерный полипептид MHC II  $\alpha$  содержит внеклеточный участок человеческого полипептида HLA класса II  $\alpha$  и по меньшей мере трансмембранный и цитоплазматический домены полипептида MHC II  $\alpha$  мыши,

при этом химерный полипептид MHC II  $\beta$  содержит внеклеточный участок человеческого полипептида HLA класса II  $\beta$  и по меньшей мере трансмембранный и цитоплазматический домены полипептида MHC II  $\beta$  мыши,

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

при этом химерный полипептид MHC I содержит внеклеточный участок человеческого полипептида HLA класса I и трансмембранный и цитоплазматический домены полипептида MHC I мыши, и

(е) перестроенную человеческую последовательность V $\alpha$ /J $\alpha$ , функционально связанную с последовательностью константного участка TCR $\alpha$  мыши, которая кодирует гуманизованную цепь TCR $\alpha$ , содержащую человеческий вариабельный домен TCR $\alpha$ , функционально связанный с константным доменом TCR $\alpha$  мыши; и перестроенную человеческую последовательность V $\beta$ /D $\beta$ /J $\beta$ , функционально связанную с последовательностью константного участка TCR $\beta$  мыши, которая кодирует гуманизованную цепь TCR $\beta$ , содержащую человеческий вариабельный домен TCR $\beta$ , функционально связанный с константным доменом TCR $\beta$  мыши, и где белок TCR содержит гуманизованную цепь TCR $\alpha$  и гуманизованную цепь TCR $\beta$ .

34. Гибридома, экспрессирующая белок TCR, содержащий человеческий вариабельный 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 (b) вторую и третью нуклеотидные последовательности, соответственно кодирующие химерный полипептид CD8 $\alpha$  и химерный полипептид CD8 $\beta$ ;

при этом химерный полипептид CD8 $\alpha$  содержит внеклеточный участок человеческого полипептида CD8 $\alpha$  и по меньшей мере трансмембранный и цитоплазматический домены полипептида CD8 $\alpha$  мыши,

10 при этом химерный полипептид CD8 $\beta$  содержит внеклеточный участок человеческого полипептида CD8 $\beta$  и по меньшей мере трансмембранный и цитоплазматический домены полипептида CD8 $\beta$  мыши, и

(с) перестроенную человеческую последовательность V $\alpha$ /J $\alpha$ , функционально связанную с последовательностью константного участка TCR $\alpha$  мыши, которая кодирует гуманизированную цепь TCR $\alpha$ , содержащую человеческий варибельный домен TCR $\alpha$ , функционально связанный с константным доменом TCR $\alpha$  мыши, и перестроенную человеческую последовательность V $\beta$ /D $\beta$ /J $\beta$ , функционально связанную с последовательностью константного участка TCR $\beta$  мыши, которая кодирует гуманизированную цепь TCR $\beta$ , содержащую человеческий варибельный домен TCR $\beta$ , функционально связанный с константным доменом TCR $\beta$  мыши, и

20 при этом гибридома экспрессирует Т-клеточный рецептор на своей поверхности, причем Т-клеточный рецептор содержит гуманизированную цепь TCR $\alpha$  и гуманизированную цепь TCR $\beta$ .

35. Композиция для оценки гуманизированного Т-клеточного иммунного ответа среди мышинных клеток, причем композиция содержит первую и вторую клетку мыши по п. 1, причем первая и вторая клетки, каждая, содержат:

(а) первую нуклеотидную последовательность, кодирующую химерный корецептор CD4;

30 (b) вторую и третью нуклеотидные последовательности, соответственно кодирующие химерный полипептид CD8 $\alpha$  и химерный полипептид CD8 $\beta$ ;

(с) первую и вторую последовательности нуклеиновых кислот, соответственно кодирующие химерный полипептид МНС II  $\alpha$  и химерный полипептид МНС II  $\beta$ ;

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

35 (е) неперестроенную последовательность варибельного участка TCR $\alpha$ , содержащую по меньшей мере один человеческий сегмент V $\alpha$  и по меньшей мере один человеческий сегмент J $\alpha$ , которые перестраиваются в Т-клетке с образованием перестроенной человеческой последовательности V $\alpha$ /J $\alpha$ , функционально связанной с последовательностью константного участка TCR $\alpha$  мыши, и неперестроенную последовательность варибельного участка TCR $\beta$ , содержащую по меньшей мере один человеческий сегмент V $\beta$ , по меньшей мере один человеческий сегмент D $\beta$  и по меньшей мере один человеческий сегмент J $\beta$ , которые перестраиваются в Т-клетке с образованием перестроенной человеческой последовательности V $\beta$ /D $\beta$ /J $\beta$ , функционально связанной с последовательностью константного участка TCR $\beta$  мыши, и

40 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 $\alpha$  и химерный полипептид CD8 $\beta$ , и

(b) химерный TCR человека/мыши, содержащий одну или обе из (i) химерной цепи TCR $\alpha$  человека/мыши, кодируемой перестроенной человеческой последовательностью V $\alpha$ /J $\alpha$ , функционально связанной с последовательностью константного участка TCR $\alpha$  мыши, и (ii) химерной цепи TCR $\beta$  человека/мыши, кодируемой перестроенной человеческой последовательностью V $\beta$ /D $\beta$ /J $\beta$ , функционально связанной с последовательностью константного участка TCR $\beta$  мыши, и

причем у второй клетки экспрессируется химерный полипептид МНС I и, необязательно, человеческий или гуманизированный  $\beta$ 2-микроглобулин.

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  $\alpha$  и химерный полипептид МНС II  $\beta$ .

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 меньшей мере трансмембранный и цитоплазматический домены полипептида CD4 мыши,

(b) вторую нуклеотидную последовательность и третью нуклеотидную последовательность, соответственно кодирующие химерный полипептид CD8 $\alpha$  и химерный полипептид CD8 $\beta$ ,

при этом химерный полипептид CD8 $\alpha$  содержит внеклеточный участок человеческого полипептида CD8 $\alpha$  и по меньшей мере трансмембранный и цитоплазматический домены полипептида CD8 $\alpha$  мыши,

при этом химерный полипептид CD8 $\beta$  содержит внеклеточный участок человеческого полипептида CD8 $\beta$  и по меньшей мере трансмембранный и цитоплазматический домены полипептида CD8 $\beta$  мыши,

(c) первую последовательность нуклеиновой кислоты и вторую последовательность нуклеиновой кислоты, соответственно кодирующие химерный полипептид МНС II  $\alpha$  и химерный полипептид МНС II  $\beta$ ,

при этом химерный полипептид МНС II  $\alpha$  содержит внеклеточный участок человеческого полипептида HLA класса II  $\alpha$  и по меньшей мере трансмембранный и цитоплазматический домены полипептида МНС II  $\alpha$  мыши,

при этом химерный полипептид МНС II  $\beta$  содержит внеклеточный участок человеческого полипептида HLA класса II  $\beta$  и по меньшей мере трансмембранный и цитоплазматический домены полипептида МНС II  $\beta$  мыши,

(d) 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

(e) неперестроенную последовательность вариабельного участка Т-клеточного рецептора (TCR)  $\alpha$ , содержащую по меньшей мере один человеческий сегмент V $\alpha$  и по меньшей мере один человеческий сегмент J $\alpha$ , которые способны перестраиваться в Т-клетке с образованием перестроенной человеческой последовательности V $\alpha$ /J $\alpha$ ,

функционально связанной с последовательностью константного участка  $TCR\alpha$  мыши; и неперестроенную последовательность варибельного участка  $TCR\beta$ , содержащую по меньшей мере один человеческий сегмент  $V\beta$ , по меньшей мере один человеческий сегмент  $D\beta$  и по меньшей мере один человеческий сегмент  $J\beta$ , которые способны перестраиваться в Т-клетке с образованием перестроенной человеческой последовательности  $V\beta/D\beta/J\beta$ , функционально связанной с последовательностью константного участка  $TCR\beta$  мыши.

39. Эмбриональная стволовая клетка генетически модифицированной мыши по п. 38, у которой:

(a) первая нуклеотидная последовательность находится в эндогенном локусе Т-клеточного корцептора CD4;

(b) вторая нуклеотидная последовательность находится в эндогенном локусе Т-клеточного корцептора CD8 $\alpha$  и третья нуклеотидная последовательность находится в эндогенном локусе Т-клеточного корцептора CD8 $\beta$ ;

(c) первая последовательность нуклеиновой кислоты находится в эндогенном локусе МНС II  $\alpha$  мыши и вторая последовательность нуклеиновой кислоты находится в эндогенном локусе МНС II  $\beta$  мыши;

(d) третья последовательность нуклеиновой кислоты находится в эндогенном локусе МНС I мыши; и/или

(e) неперестроенная последовательность варибельного участка  $TCR\alpha$  находится в эндогенном локусе варибельного участка  $TCR\alpha$  и неперестроенная последовательность варибельного участка  $TCR\beta$  находится в эндогенном локусе варибельного участка  $TCR\beta$ .

40. Эмбриональная стволовая клетка генетически модифицированной мыши по п. 39, у которой:

(a) первая нуклеотидная последовательность функционально связана с эндогенными промоторными и регуляторными элементами корцептора CD4 мыши;

(b) вторая нуклеотидная последовательность функционально связана с эндогенными промоторными и регуляторными элементами полипептида CD8 $\alpha$  мыши и третья нуклеотидная последовательность функционально связана с эндогенными промоторными и регуляторными элементами полипептида CD8 $\beta$  мыши;

(c) первая последовательность нуклеиновой кислоты функционально связана с эндогенными промоторными и регуляторными элементами МНС II  $\alpha$  мыши и вторая последовательность нуклеиновой кислоты функционально связана с эндогенными промоторными и регуляторными элементами МНС II  $\beta$  мыши;

(d) третья последовательность нуклеиновой кислоты функционально связана с эндогенными промоторными и регуляторными элементами МНС I мыши; и/или

(e) неперестроенная последовательность варибельного участка  $TCR\alpha$  функционально связана с эндогенными промоторными и регуляторными элементами  $TCR\alpha$  и неперестроенная последовательность варибельного участка  $TCR\beta$  функционально связана с эндогенными промоторными и регуляторными элементами  $TCR\beta$ .

41. Эмбриональная стволовая клетка генетически модифицированной мыши по п. 38, у которой:

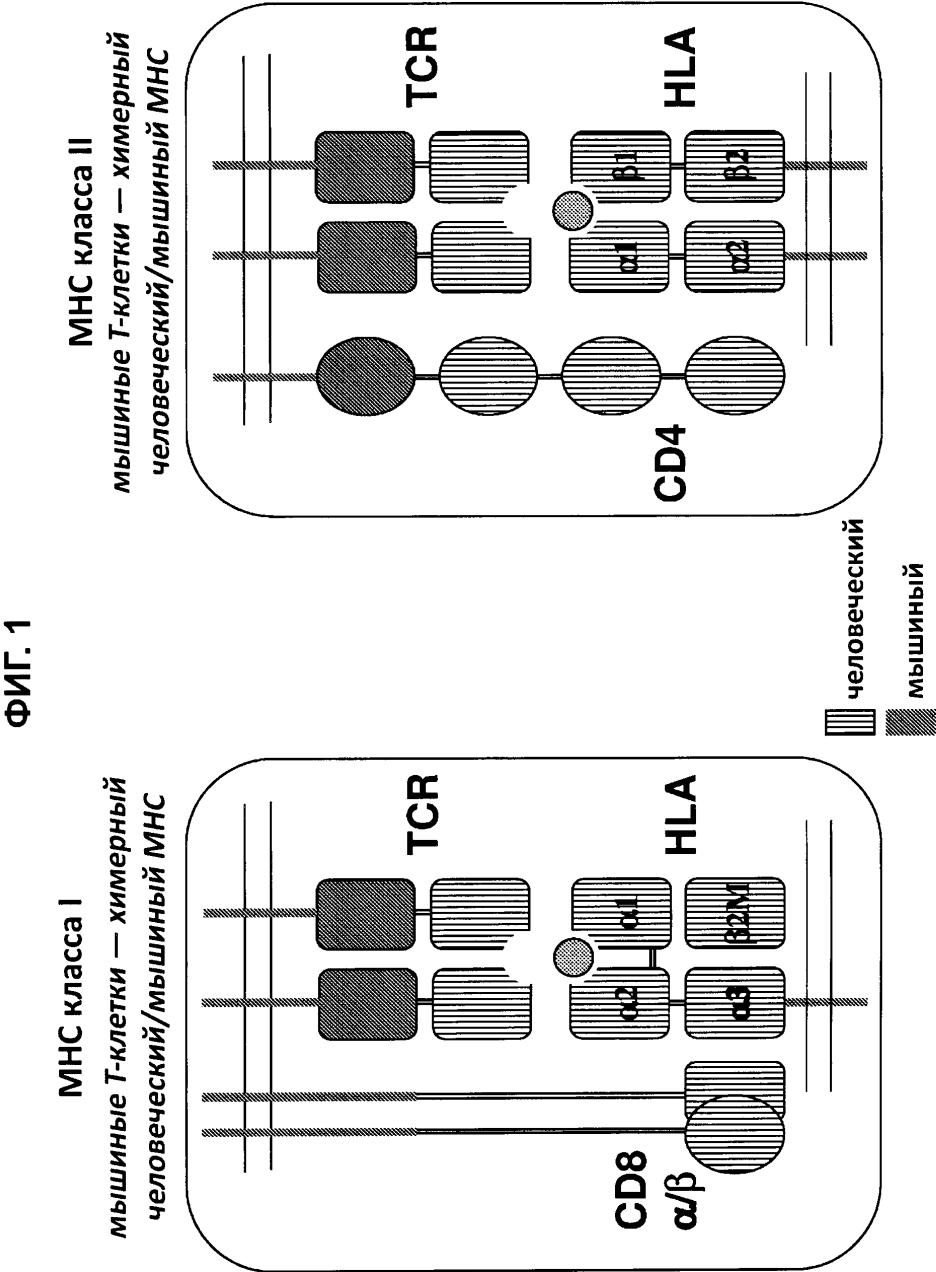
(a) первая нуклеотидная последовательность кодирует химерный корцептор CD4, содержащий домены D1, D2 и D3 человеческого полипептида CD4, функционально связанные с трансмембранным и цитоплазматическим доменами эндогенного полипептида CD4 мыши,

(b) вторая нуклеотидная последовательность кодирует химерный полипептид CD8 $\alpha$ ,

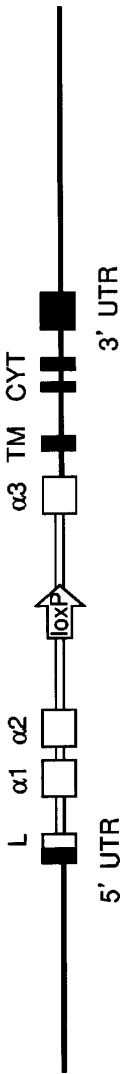
содержащий IgV-подобный домен человеческого полипептида CD8 $\alpha$ , функционально связанный с трансмембранным и цитоплазматическим доменами эндогенного полипептида CD8 $\alpha$  мыши, и третья нуклеотидная последовательность кодируют химерный полипептид CD8 $\beta$ , содержащий IgV-подобный домен человеческого полипептида CD8 $\beta$ , функционально связанный с трансмембранным и цитоплазматическим доменами эндогенного полипептида CD8 $\beta$  мыши;

(с) первая последовательность нуклеиновой кислоты кодирует химерный полипептид МНС II  $\alpha$ , содержащий домены  $\alpha 1$  и  $\alpha 2$  человеческого HLA класса II, функционально связанные с трансмембранным и цитоплазматическим доменами эндогенного полипептида МНС II  $\alpha$  мыши, и вторая последовательность нуклеиновой кислоты кодирует химерный полипептид МНС II  $\beta$ , содержащий домены  $\beta 1$  и  $\beta 2$  человеческого HLA класса II, функционально связанные с трансмембранным и цитоплазматическим доменами эндогенного полипептида МНС II  $\beta$  мыши; и/или

(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.



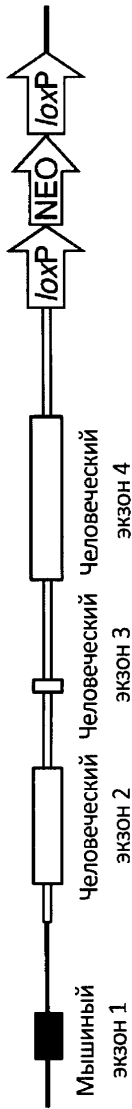
**ФИГ. 2А** Химерный локус HLA-A2/H-2K



**ФИГ. 2В** Химерный локус HLA-DR2/H-2E

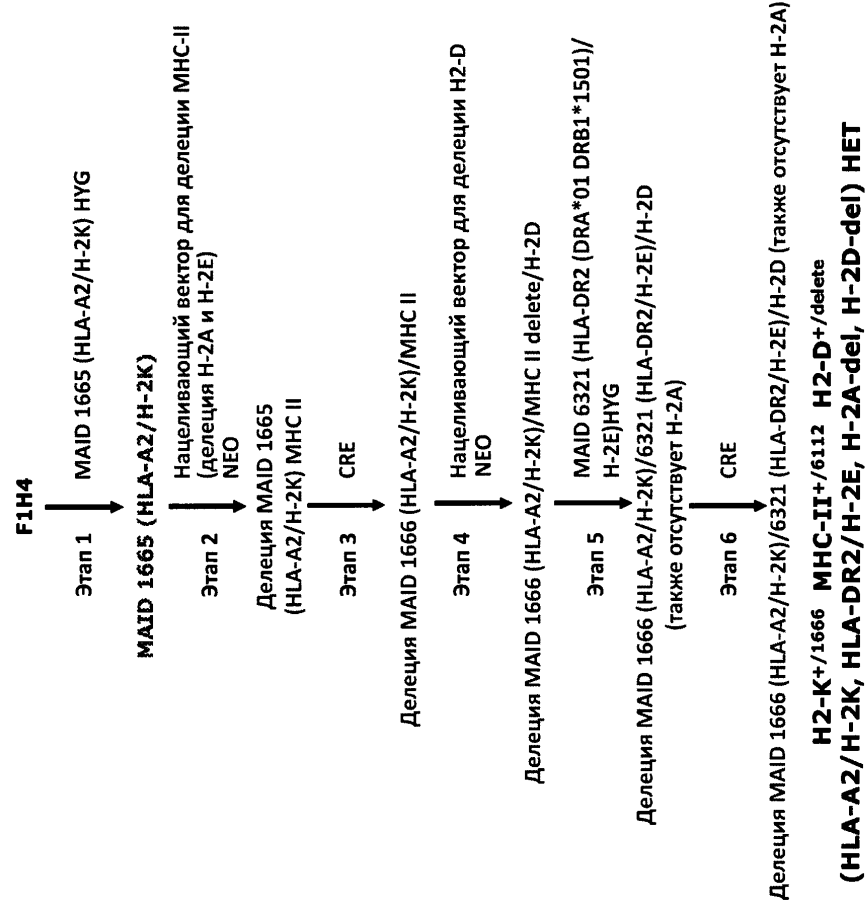


**ФИГ. 2С** Гуманизированный локус β2m

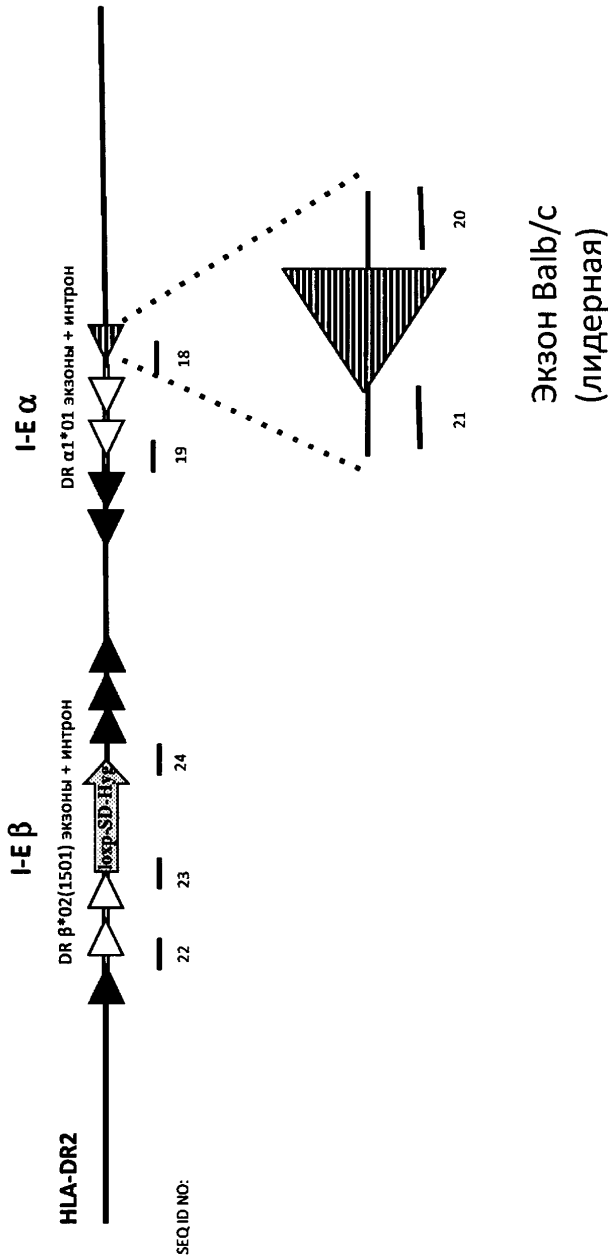




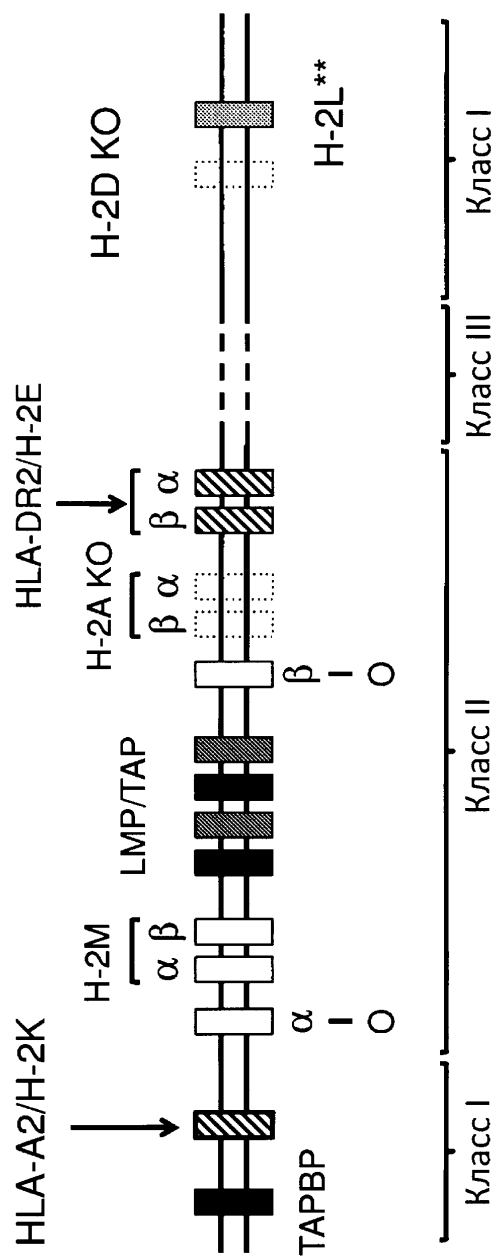
ФИГ. 3А



ФИГ. 3В

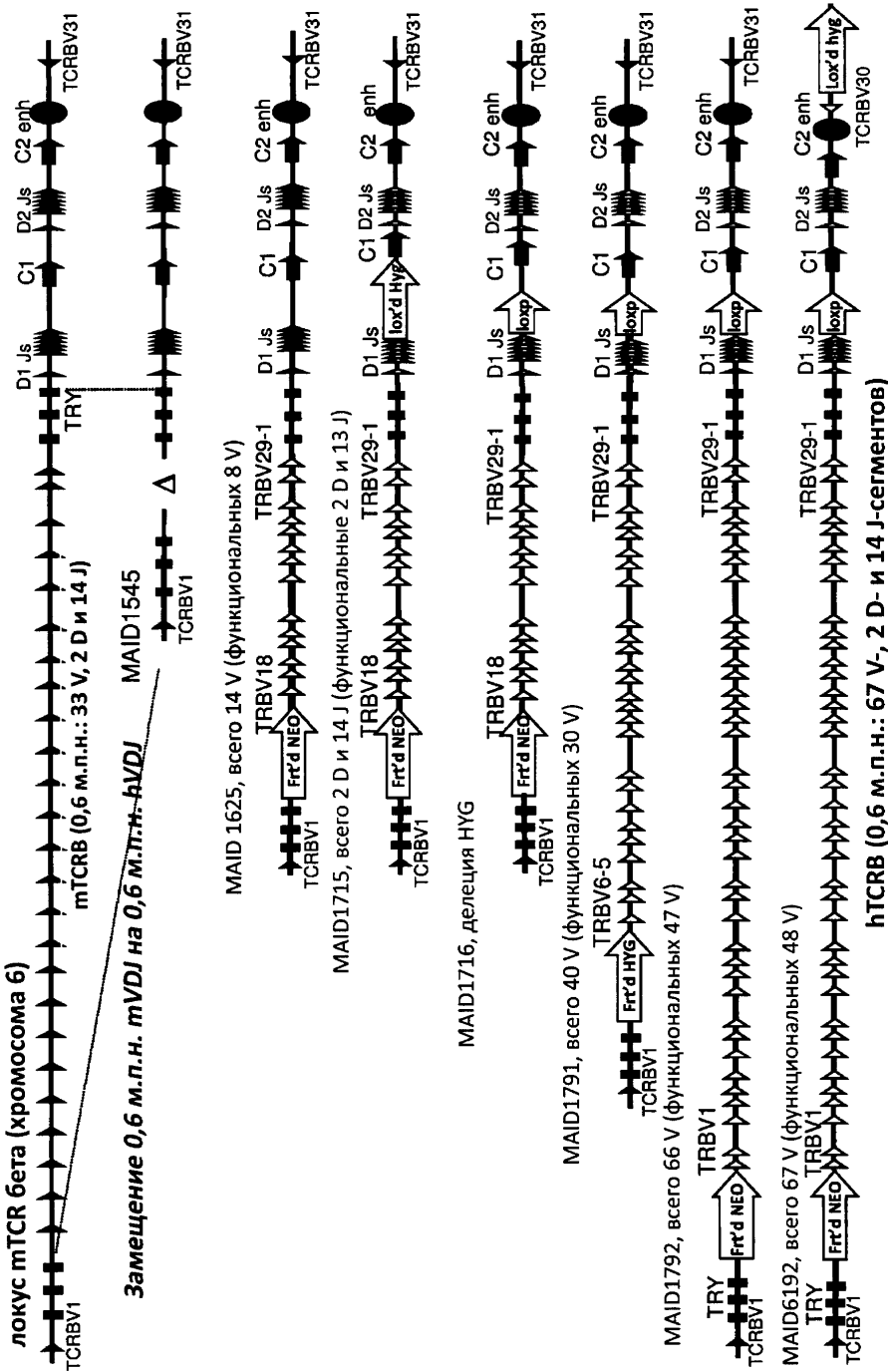


**ФИГ. 3С**



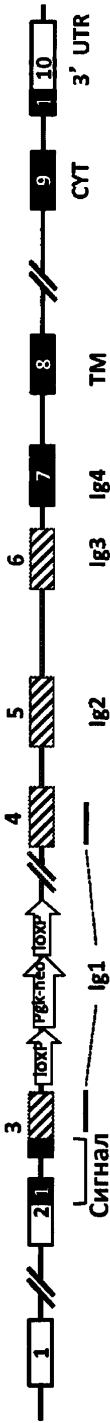
[illegible]

ФИГ. 4В



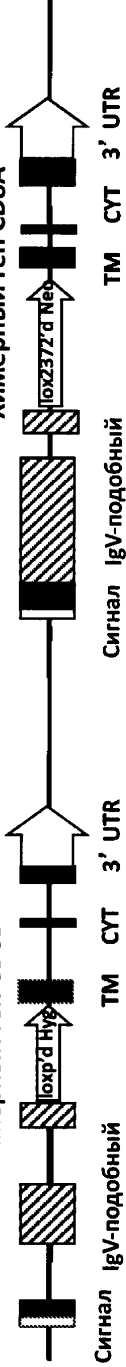
ФИГ. 5А

Химерный ген CD4

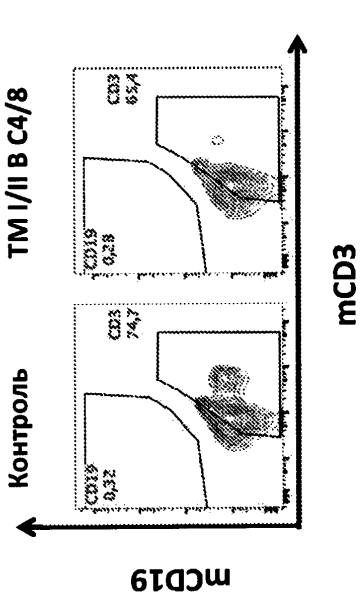


ФИГ. 5В

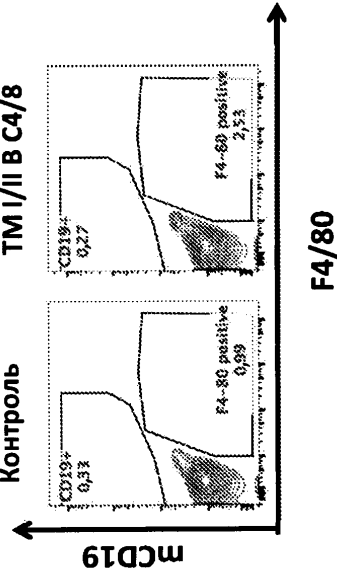
Химерный ген CD8В



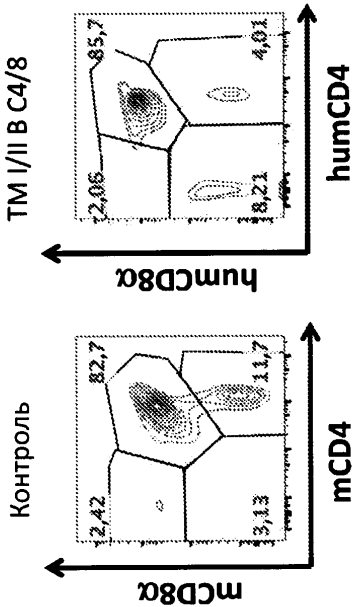
ФИГ. 6А Селекция по синглетам

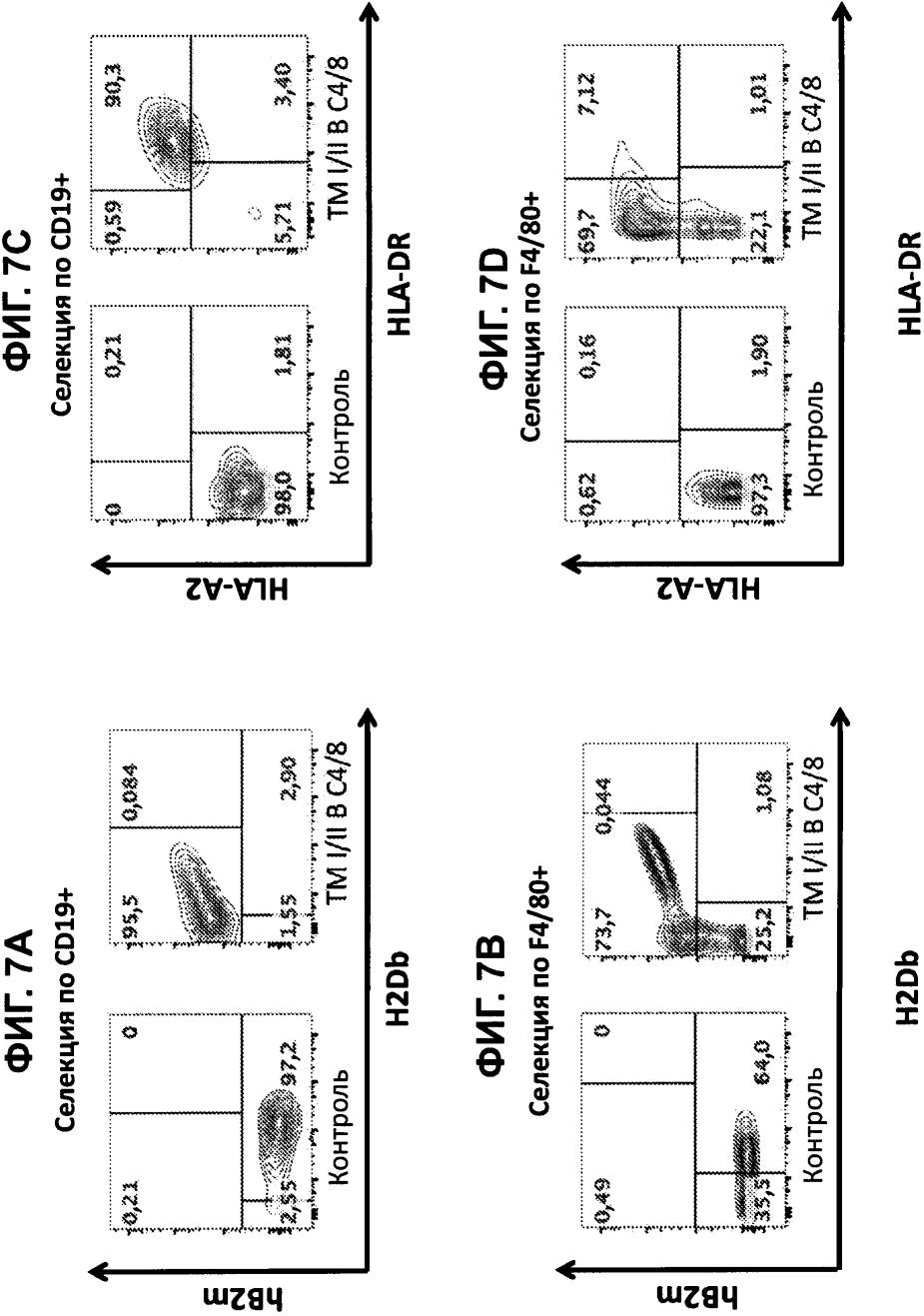


ФИГ. 6В Селекция по синглетам

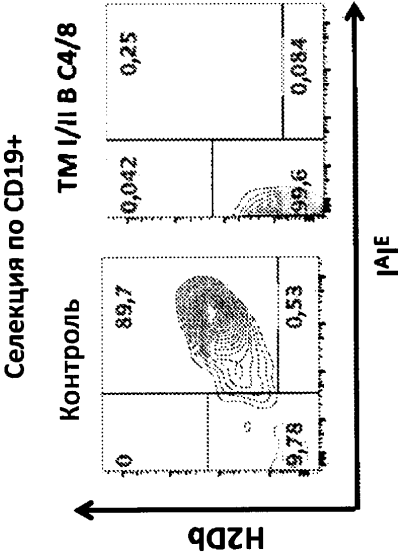


ФИГ. 6С Селекция по синглетам

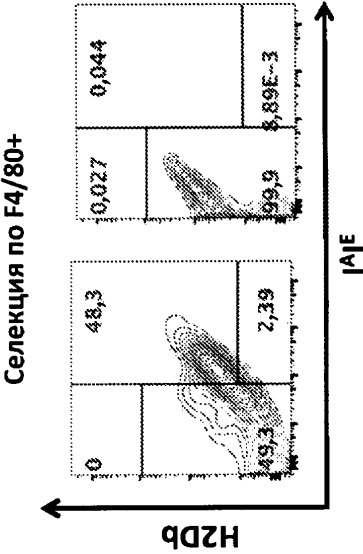




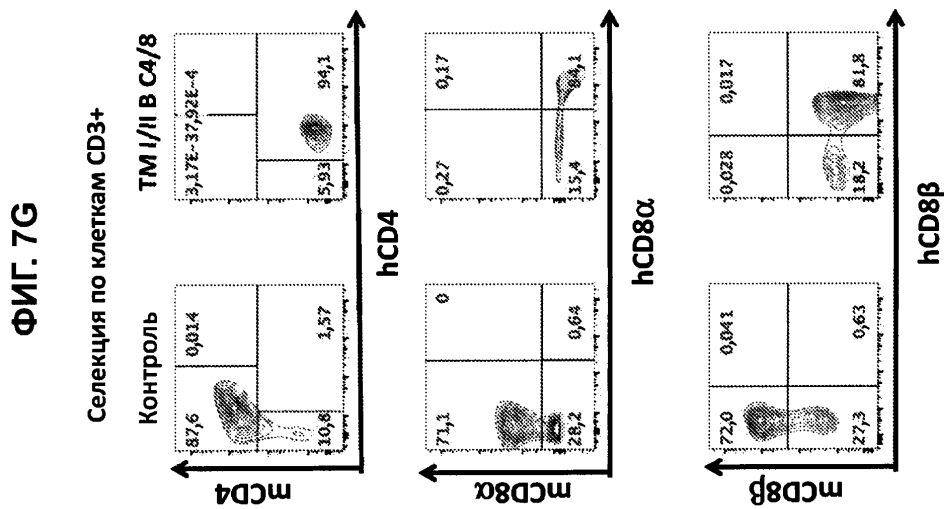




ФИГ. 7E

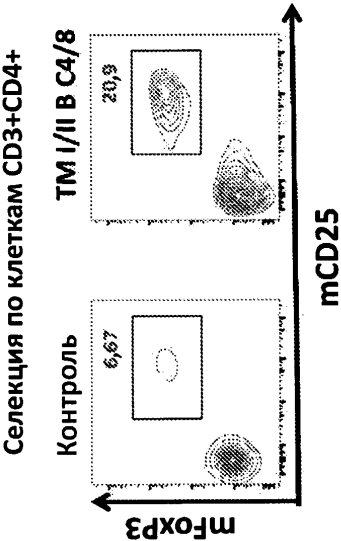


ФИГ. 7F



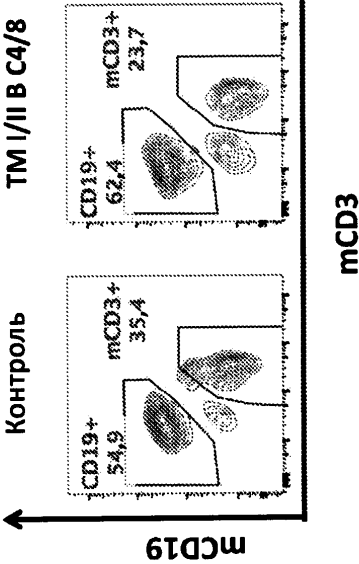
ФИГ. 8

Тимус

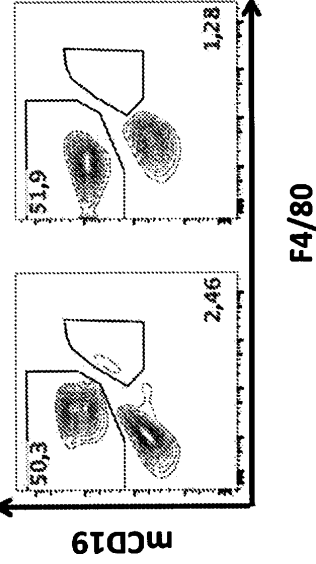


Селезенка

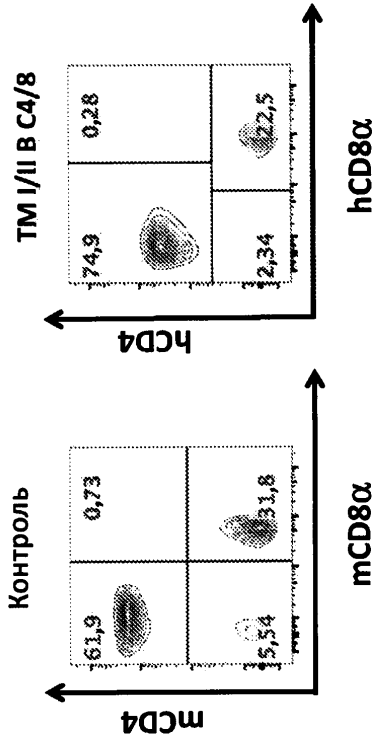
ФИГ. 9А Селекция по синглетам



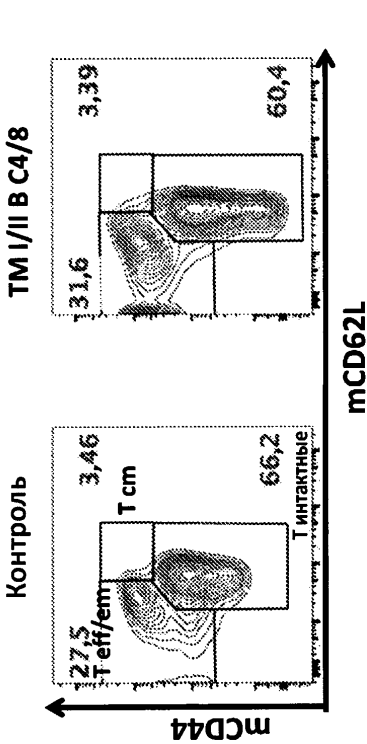
ФИГ. 9В Селекция по синглетам



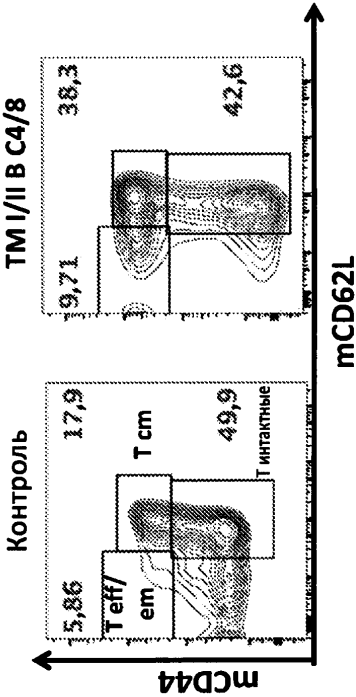
ФИГ. 9С Селекция по клеткам CD3+



ФИГ. 9D Селекция по Т-клеткам CD4+



ФИГ. 9E Селекция по Т-клеткам CD8+



ФИГ. 10С  
Селекция по CD19+

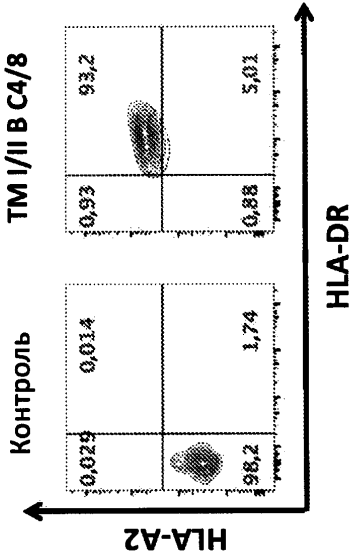
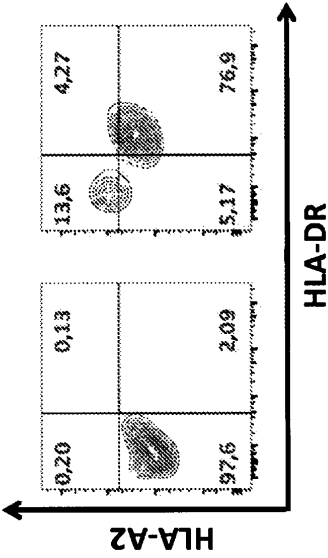
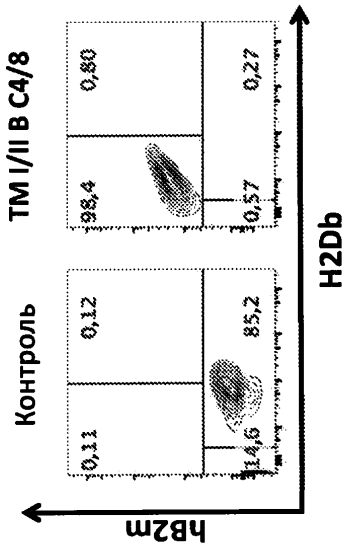


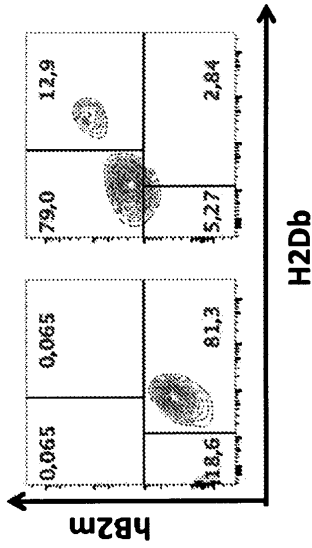
FIG. 10D  
Селекция по F4/80+

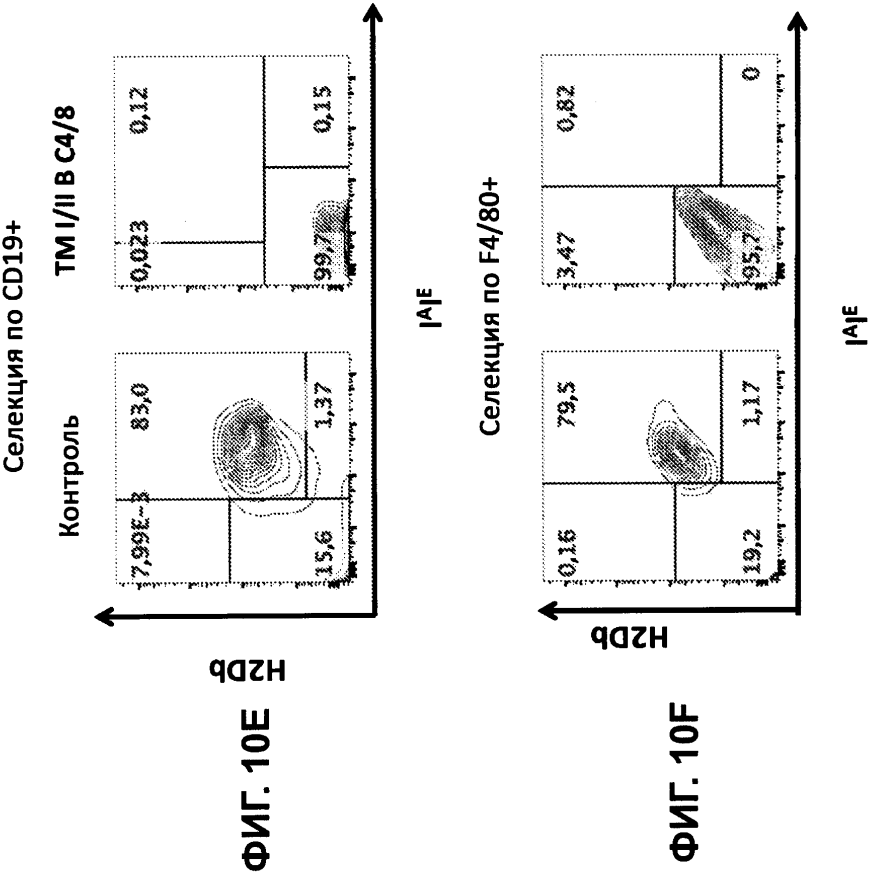


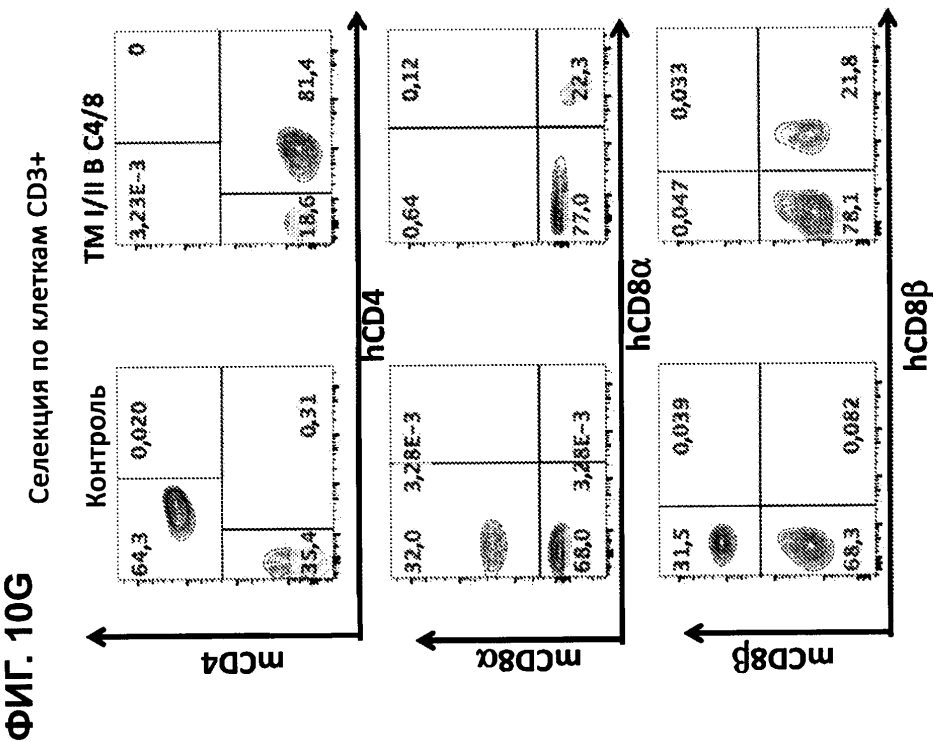
ФИГ. 10А  
Селекция по CD19+



ФИГ. 10В  
Селекция по F4/80+

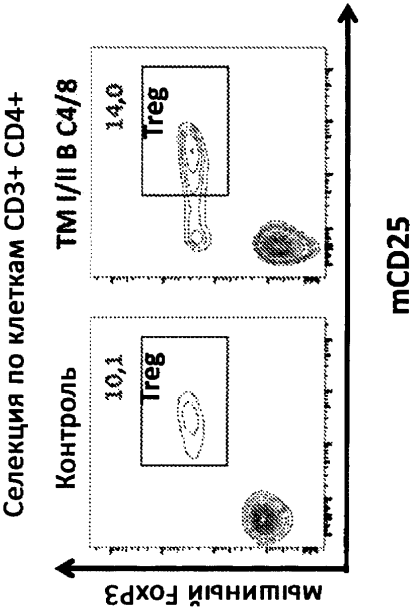


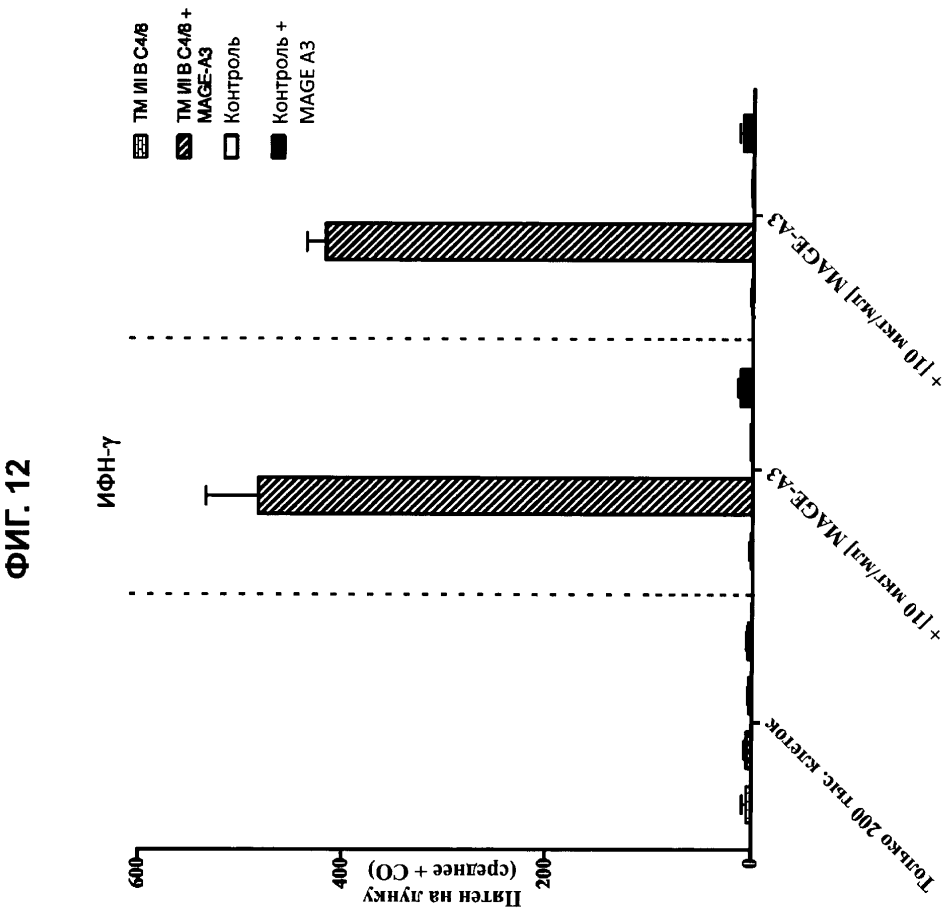




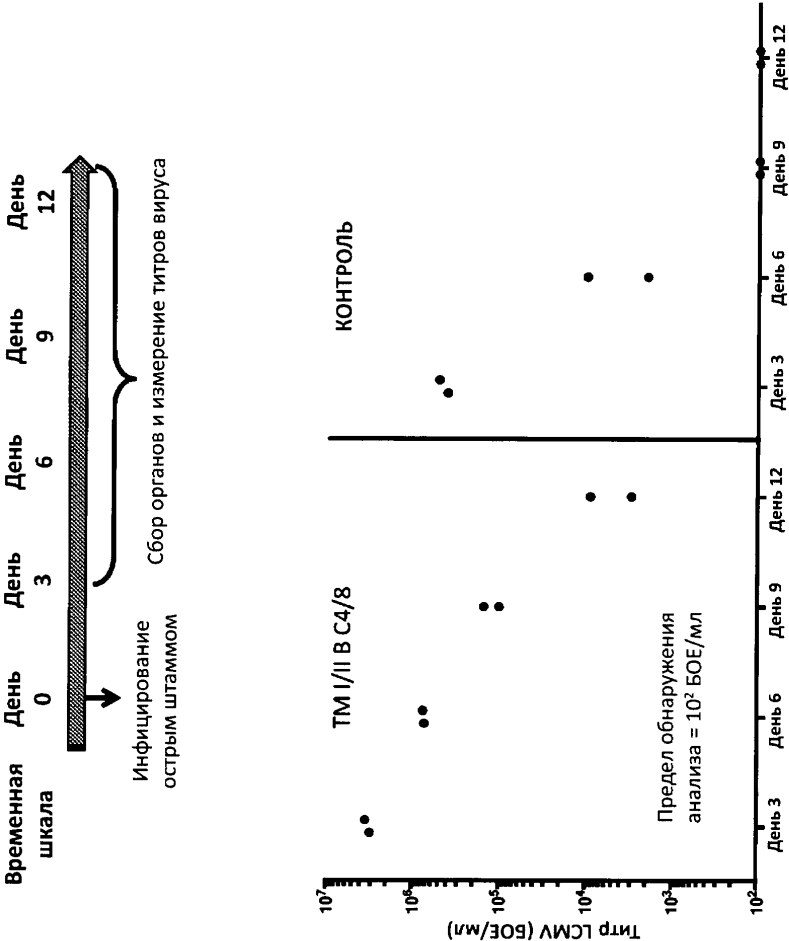


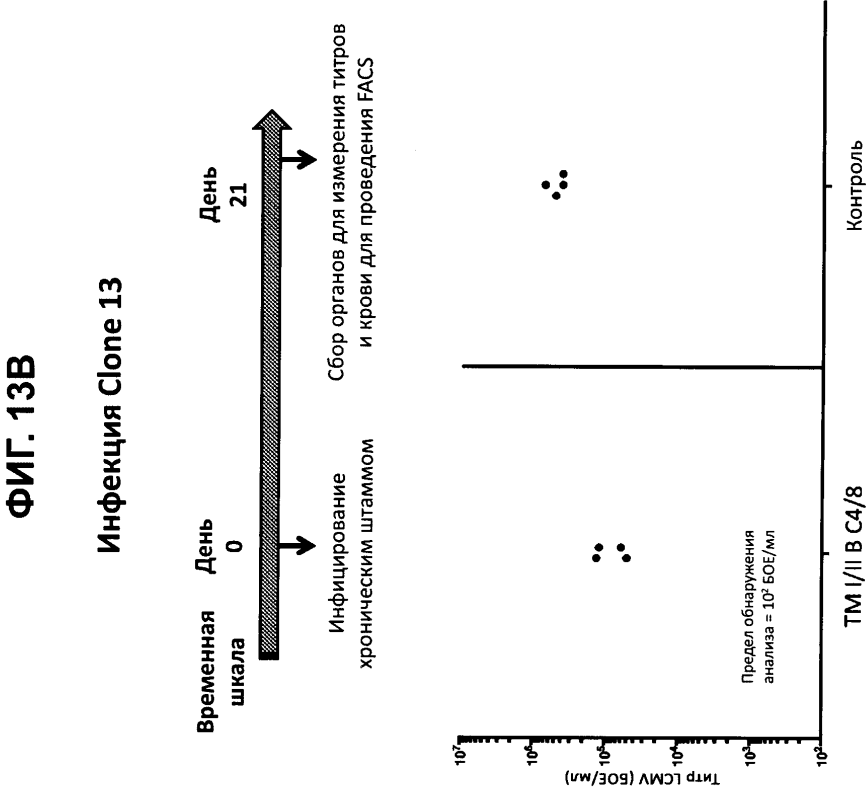
ФИГ. 11  
Селезенка



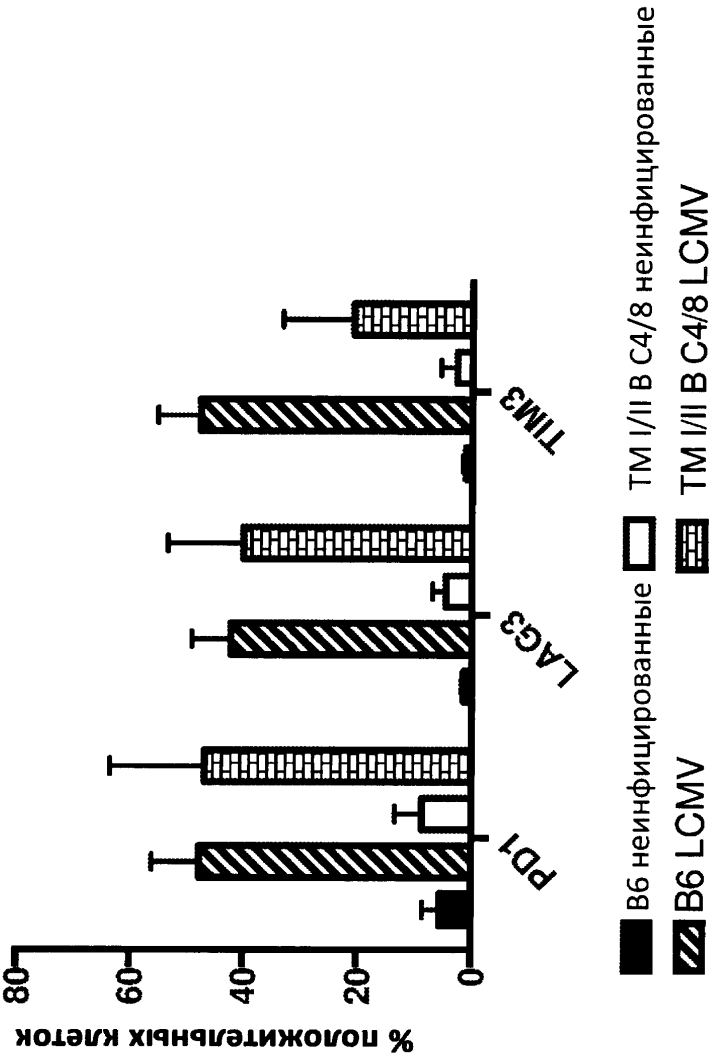


ФИГ. 13А  
Инфекция Армстронга

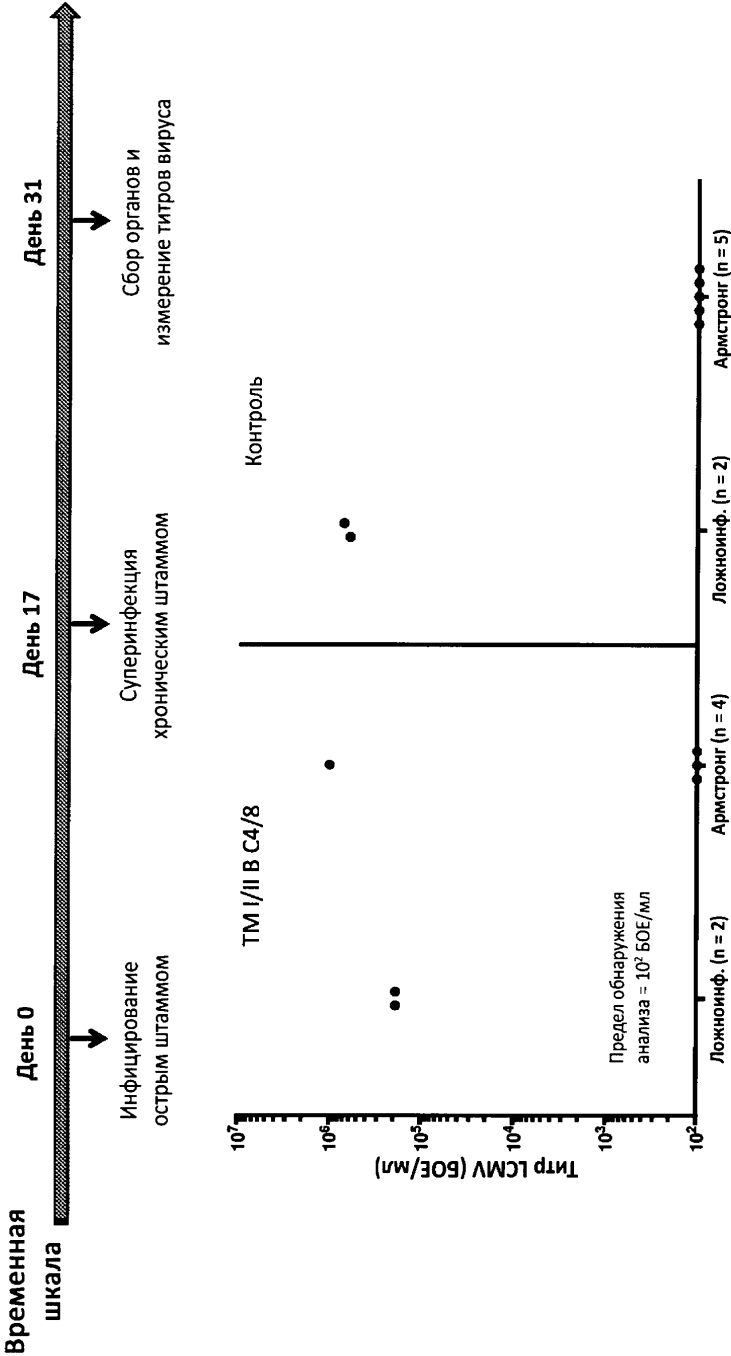




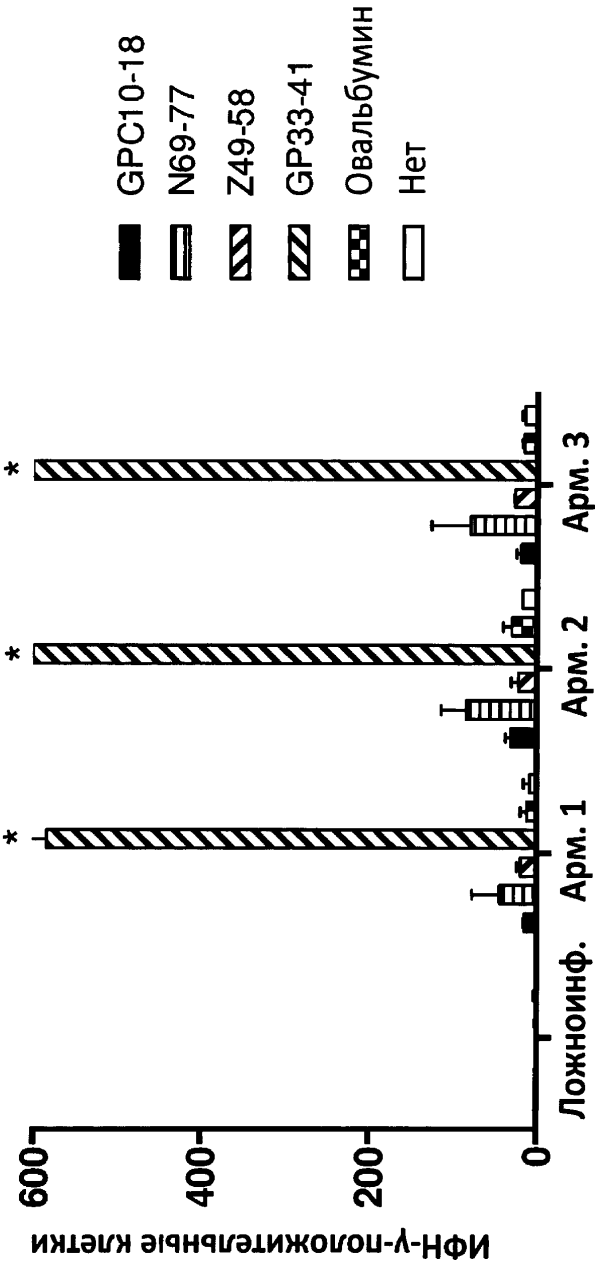
ФИГ. 13С



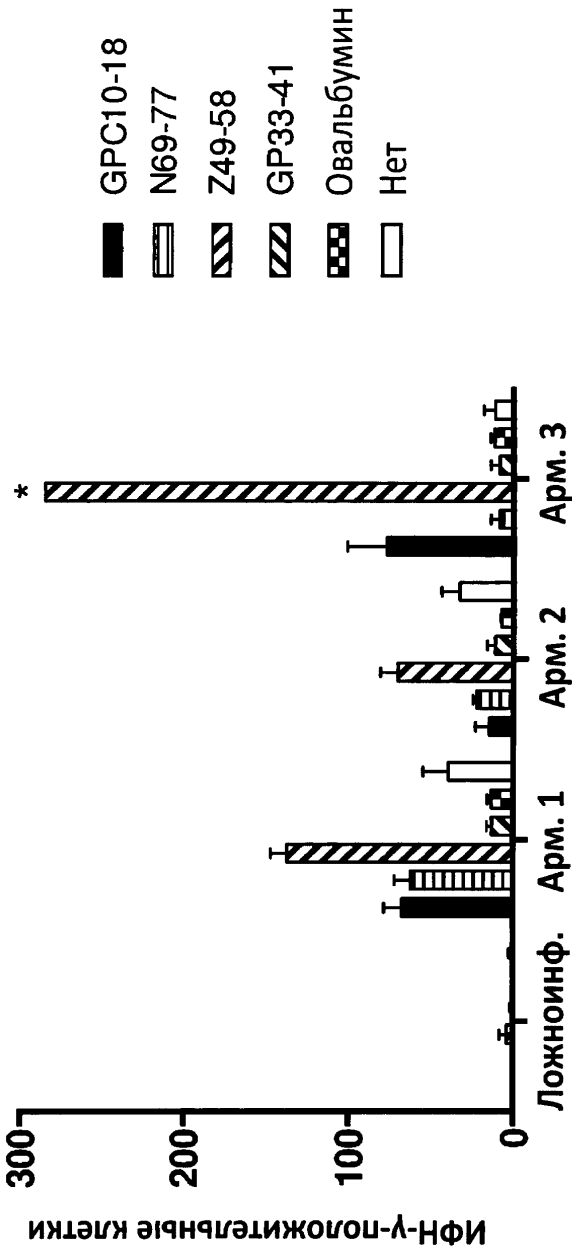
ФИГ. 14



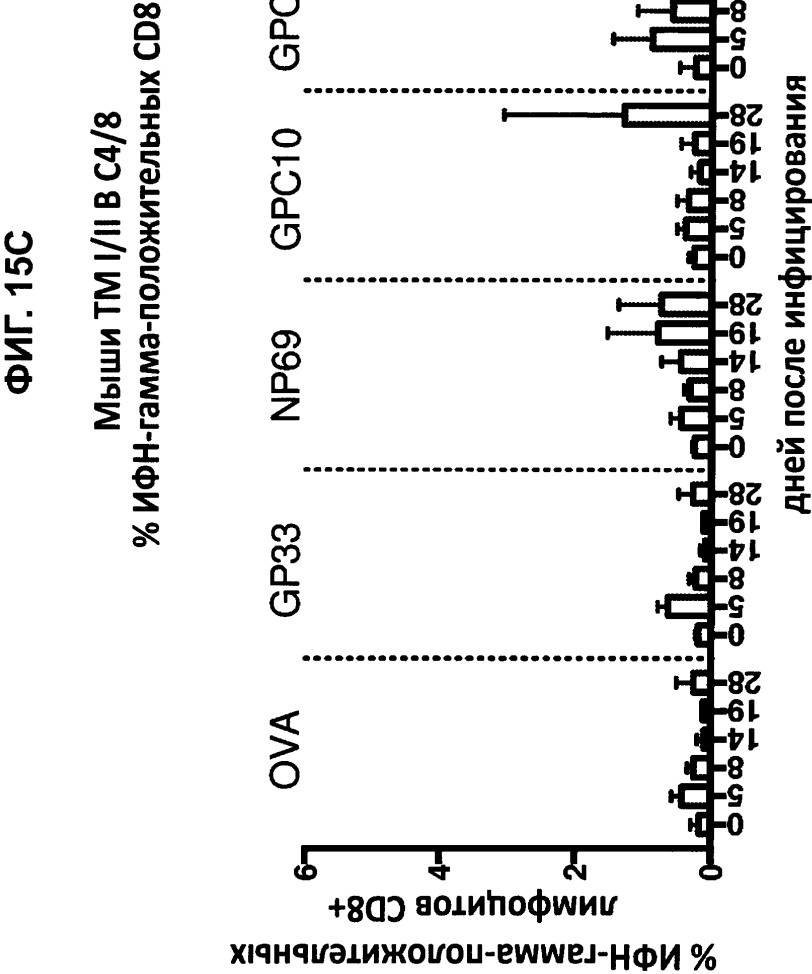
ФИГ. 15А



ФИГ. 15В







ФИГ. 15D

