



## (12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106604635 B

(45)授权公告日 2020.01.14

(21)申请号 201580033075.2

(22)申请日 2015.06.19

(65)同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 106604635 A

(43)申请公布日 2017.04.26

(30)优先权数据

62/014,181 2014.06.19 US

62/086,518 2014.12.02 US

62/138,221 2015.03.25 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日  
2016.12.19

(86)PCT国际申请的申请数据  
PCT/US2015/036649 2015.06.19

(87)PCT国际申请的公布数据  
WO2015/196051 EN 2015.12.23

(73)专利权人 瑞泽恩制药公司  
地址 美国纽约

(72)发明人 E·布罗瓦 A·O·穆吉卡  
K-M·V·赖 A·J·莫菲

(74)专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专  
利商标事务所 11038  
代理人 罗菊华

(51)Int.Cl.

A61K 45/06(2006.01)

C07K 14/705(2006.01)

A61K 39/395(2006.01)

A01K 67/027(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

(56)对比文件

JP 2012050451 A, 2012.03.15,

审查员 杨培歌

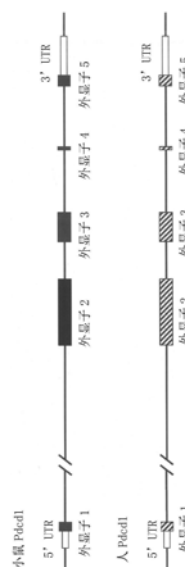
权利要求书2页 说明书43页  
序列表12页 附图11页

(54)发明名称

具有人源化程序性细胞死亡1基因的非人动物

(57)摘要

本发明提供了非人动物以及用于制备所述非人动物的组合物和方法,其中所述非人动物包含人源化的程序性细胞死亡1(Pdcd1)基因。在一些实施方案中,所述非人动物可被描述为具有对内源Pdcd1基因的遗传修饰,使得所述非人动物表达包含人部分和内源部分(例如非人部分)的PD-1多肽。



1. 一种啮齿动物基因组,其包含在内源程序性细胞死亡1 (Pdc1) 基因座上的人源化程序性细胞死亡1 (Pdc1) 基因,其中所述人源化Pdc1基因编码包含人部分和内源部分的人源化程序性细胞死亡1 (PD-1) 多肽,其中所述人部分包含人PD-1多肽的N端免疫球蛋白V结构域,并且所述内源部分包含内源啮齿动物PD-1多肽的胞内部分,所述人源化Pdc1基因包含人Pdc1基因的外显子2以及全部或部分的外显子3,并且其中所述啮齿动物是小鼠或大鼠。

2. 权利要求1所述的啮齿动物基因组,其中所述人源化PD-1多肽

(a) 与啮齿动物信号肽一起翻译;或

(b) 还包含内源啮齿动物PD-1多肽的跨膜部分。

3. 权利要求1所述的啮齿动物基因组,其中所述人部分包含人PD-1多肽的氨基酸26-169。

4. 权利要求1所述的啮齿动物基因组,其中所述人源化Pdc1基因包含内源Pdc1外显子1、4和5。

5. 权利要求4所述的啮齿动物基因组,其中所述人源化Pdc1基因还包含部分的内源Pdc1外显子3。

6. 权利要求1所述的啮齿动物基因组,其中所述人源化Pdc1基因有效连接至啮齿动物Pdc1启动子。

7. 权利要求6所述的啮齿动物基因组,其中所述Pdc1启动子为内源啮齿动物Pdc1启动子。

8. 一种制备啮齿动物的方法,所述方法包括:

修饰啮齿动物的基因组,使得所述经修饰的基因组包含在内源Pdc1基因座上的人源化Pdc1基因,其中所述啮齿动物从所述人源化Pdc1基因表达包含人部分和内源部分的人源化PD-1多肽,其中所述人部分包含人PD-1多肽的N端免疫球蛋白V结构域,并且所述内源部分包含内源啮齿动物PD-1多肽的胞内部分,所述人源化Pdc1基因包含人Pdc1基因的外显子2以及全部或部分的外显子3,并且其中所述啮齿动物是小鼠或大鼠。

9. 一种制备啮齿动物的方法,所述方法包括:

(a) 将人基因组片段插入啮齿动物胚胎干细胞的内源Pdc1基因座上的内源啮齿动物Pdc1基因中,以形成编码人源化PD-1多肽的人源化Pdc1基因,其中所述人源化PD-1多肽包含人部分和内源部分,其中所述人部分包含人PD-1多肽的N端免疫球蛋白V结构域,并且所述内源部分包含内源啮齿动物PD-1多肽的胞内部分,所述人源化Pdc1基因包含人Pdc1基因的外显子2以及全部或部分的外显子3,并且其中所述啮齿动物是小鼠或大鼠,

(b) 获得 (a) 中产生的所述啮齿动物胚胎干细胞;和

(c) 使用 (b) 的所述啮齿动物胚胎干细胞形成啮齿动物。

10. 权利要求8或9所述的方法,其中所述人源化PD-1多肽

(a) 与啮齿动物信号肽一起翻译;或

(b) 还包含内源啮齿动物PD-1多肽的跨膜部分。

11. 权利要求8或9所述的方法,其中所述人部分包含人PD-1多肽的氨基酸26-169。

12. 权利要求8或9所述的方法,其中所述人源化Pdc1基因包含内源Pdc1外显子1、4和5。

13. 权利要求12所述的方法, 其中所述人源化Pdccl1基因还包含部分的内源Pdccl1外显子3。

14. 权利要求8或9所述的方法, 其中所述人源化Pdccl1基因有效连接至啮齿动物Pdccl1启动子。

15. 权利要求14所述的方法, 其中所述Pdccl1启动子为内源啮齿动物Pdccl1启动子。

16. 一种制备啮齿动物胚胎干 (ES) 细胞的方法, 所述方法包括:

将人基因组片段插入啮齿动物ES细胞的内源Pdccl1基因座上的内源啮齿动物Pdccl1基因中, 以形成编码人源化PD-1多肽的人源化Pdccl1基因, 其中所述人源化PD-1多肽包含人部分和内源部分, 其中所述人部分包含人PD-1多肽的N端免疫球蛋白V结构域, 并且所述内源部分包含内源啮齿动物PD-1多肽的胞内部分, 所述人源化Pdccl1基因包含人Pdccl1基因的外显子2以及全部或部分的外显子3, 并且其中所述啮齿动物是小鼠或大鼠。

17. 一种评估靶向人PD-1的药物的药动学特性的方法, 所述方法包括下列步骤:

向啮齿动物施用所述药物, 所述啮齿动物包含根据权利要求1-7中任一项所述的啮齿动物基因组; 和

进行测定以确定所述靶向人PD-1的药物的一种或多种药动学特性, 其中所述药物任选是抗PD-1抗体。

18. 一种啮齿动物肿瘤模型, 其通过下列步骤获得:

(a) 提供啮齿动物, 所述啮齿动物包含根据权利要求1-7中任一项所述的啮齿动物基因组; 和

(b) 将一种或多种肿瘤细胞植入(a)的所述啮齿动物中;  
从而提供所述啮齿动物肿瘤模型。

## 具有人源化程序性细胞死亡1基因的非人动物

[0001] 相关专利申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2014年6月19日提交的美国临时申请No.62/014,181、2014年12月2日提交的No.62/086,518的权益和2015年3月25提交的No.62/138,221的优先权权益,这些申请的全部内容以引用方式并入本文中。

[0003] 序列表以引用方式并入

[0004] 序列表为2015年6月4日创建的名称为31969\_SEQ.txt、大小为23KB的ASCII文本文件,其经由EFS-Web提交给美国专利及商标局,并且以引用方式并入本文中。

### 背景技术

[0005] 尽管医学研究和开发的重点一直致力于癌症免疫疗法并且已获得重大改进,但癌症仍然是全球卫生保健行业中的一个重大挑战。这一重大挑战部分是由于癌细胞能够避开免疫系统的监测机制,这在一定程度上导致抗肿瘤免疫性的抑制和/或下调。仍然缺乏对这样的体内系统的开发,所述体内系统用于任选地确定被设计来激活和/或促进抗肿瘤免疫性的新癌症疗法的治疗潜力以及确定癌细胞如何向免疫细胞(例如T细胞)提供抑制信号的分子层面。此类系统提供用于评估促进体内抗肿瘤环境的候选药剂的治疗功效的测定源。

### 发明内容

[0006] 本发明涵盖以下认知,即,期望对非人动物进行工程化以允许改进的系统,所述改进的系统用于鉴定和开发可用于治疗癌症的新治疗剂。本发明还涵盖以下认知,即,期望对非人动物进行工程化以允许改进的系统,所述改进的系统用于鉴定和开发可用于治疗自体免疫(或炎性)疾病、障碍或病症的新治疗剂。另外,本发明还涵盖以下认知,即,期望将具有人源化Pdcd1基因和/或以其他方式表达、包含或产生人或人源化PD-1多肽的非人动物例如用于鉴定和开发上调抗肿瘤免疫性的癌症治疗剂。在一些实施方案中,本发明的非人动物提供改进的体内系统,所述改进的体内系统用于鉴定和开发包括靶向PD-1的联合疗法。

[0007] 在一些实施方案中,本发明提供具有包含Pdcd1基因的基因组的非人动物,所述Pdcd1基因包含来自两种不同物种(例如人和非人)的遗传物质。在一些实施方案中,如本文所述的非人动物的Pdcd1基因编码包含人和非人部分的PD-1多肽,其中所述人和非人部分连接在一起并且形成功能性PD-1多肽。在一些实施方案中,如本文所述的非人动物的Pdcd1基因编码PD-1多肽,所述PD-1多肽包含人PD-1多肽的全部或部分的胞外结构域。

[0008] 在一些实施方案中,本发明提供表达PD-1多肽的非人动物,所述PD-1多肽包含人部分和内源部分。在一些实施方案中,本发明的PD-1多肽在非人动物的细胞中由非人信号肽翻译;在某些实施方案中,由啮齿动物信号肽翻译。

[0009] 在一些实施方案中,内源部分包含内源PD-1多肽的胞内部分。在一些实施方案中,内源部分还包含内源PD-1多肽的跨膜部分。在一些实施方案中,内源部分具有与图8中呈现的小鼠PD-1多肽的相应氨基酸序列至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少95%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,内源部分具有与图8中呈现的小鼠PD-1多

肽的相应氨基酸序列基本上相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,内源部分具有与图8中呈现的小鼠PD-1多肽的相应氨基酸序列相同的氨基酸序列。

[0010] 在一些实施方案中,人部分包含人PD-1多肽的氨基酸35-145、27-145、27-169、26-169或21-170。在一些实施方案中,人部分包含与图8中呈现的人PD-1多肽的相应氨基酸序列至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少95%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,人部分包含与图8中呈现的人PD-1多肽的相应氨基酸序列基本上相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,人部分包含与图8中呈现的人PD-1多肽的相应氨基酸序列相同的氨基酸序列。

[0011] 在一些实施方案中,包含人部分和内源部分的PD-1多肽由内源Pdc1基因编码。在某些实施方案中,内源Pdc1基因包含内源Pdc1外显子1、4和5。在某些实施方案中,内源Pdc1基因还包含全部或部分的内源Pdc1外显子3。在某些实施方案中,内源Pdc1基因包含SEQ ID NO:21。在某些实施方案中,内源Pdc1基因包含SEQ ID NO:22。在某些实施方案中,内源Pdc1基因包含SEQ ID NO:21和SEQ ID NO:22。

[0012] 在一些实施方案中,如本文所述的非人动物所表达的PD-1多肽具有与SEQ ID NO:6至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少95%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,如本文所述的非人动物所表达的PD-1多肽具有与SEQ ID NO:6基本上相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,如本文所述的非人动物所表达的PD-1多肽具有与SEQ ID NO:6相同的氨基酸序列。

[0013] 在一些实施方案中,本发明提供包含非人Pdc1基因的一个或多个外显子的人源化Pdc1基因座,所述非人Pdc1基因的一个或多个外显子有效连接至人Pdc1基因的全部或部分的一个或多个外显子。在一些实施方案中,人源化Pdc1基因座还包含侧接人Pdc1基因的一个或多个外显子的5' 和3' 非人Pdc1非翻译区(UTR)。在一些实施方案中,人源化Pdc1基因座受啮齿动物启动子控制;在某些实施方案中,受内源啮齿动物启动子控制。

[0014] 在一些实施方案中,人源化Pdc1基因座包含非人Pdc1外显子1、3、4和5,所述非人Pdc1外显子1、3、4和5有效连接至人Pdc1外显子2。在一些实施方案中,人源化Pdc1基因座包含非人Pdc1外显子1、4和5、人Pdc1外显子2并且还包含Pdc1外显子3,所述Pdc1外显子3包含人部分和非人部分,并且其中所述非人和人外显子有效连接。在一些实施方案中,Pdc1外显子3的人部分包含核苷酸编码PD-1柄序列。在一些实施方案中,Pdc1外显子3的人部分包含约71bp的人Pdc1外显子3。在一些实施方案中,Pdc1外显子3的非人部分包含编码跨膜序列的核苷酸。在一些实施方案中,Pdc1外显子3的非人部分包含约91bp的啮齿动物Pdc1外显子3。

[0015] 在一些实施方案中,本发明提供非人动物包含含有内源部分和人部分的Pdc1基因,其中所述内源部分和人部分有效连接至啮齿动物Pdc1启动子。在一些实施方案中,啮齿动物Pdc1启动子为内源啮齿动物Pdc1启动子。

[0016] 在一些实施方案中,内源部分包含内源Pdc1外显子1、4和5。在一些实施方案中,内源部分还包含全部或部分的内源Pdc1外显子3。在一些实施方案中,内源Pdc1基因的外显子1、全部或部分的外显子3、外显子4和5与图8中呈现的内源Pdc1基因的相应外显子1、全部或部分的相应外显子3、相应外显子4和5至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少95%相同。在一些实施方案中,内源Pdc1基因的外显子1、全部或部分的外显

子3、外显子4和5与图8中呈现的内源Pdcd1基因的相应外显子1、全部或部分的相应外显子3、相应外显子4和5基本上相同。在一些实施方案中,内源Pdcd1基因的外显子1、全部或部分的外显子3、外显子4和5与图8中呈现的内源Pdcd1基因的相应外显子1、全部或部分的相应外显子3、相应外显子4和5相同。

[0017] 在一些实施方案中,人部分编码人PD-1多肽的氨基酸21-170、26-169、27-169、27-145或35-145。

[0018] 在一些实施方案中,人部分包含人Pdcd1基因的外显子2。在一些实施方案中,人部分还包含全部或部分的人Pdcd1外显子3。在一些实施方案中,人Pdcd1外显子2和全部或部分的人Pdcd1外显子3与图8中呈现的人Pdcd1基因的相应外显子2和全部或部分的相应外显子3至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少95%相同。在一些实施方案中,人Pdcd1外显子2和全部或部分的人Pdcd1外显子3与图8中呈现的人Pdcd1基因的相应外显子2和全部或部分的相应外显子3基本上相同。在一些实施方案中,人Pdcd1外显子2和全部或部分的人Pdcd1外显子3与图8中呈现的人Pdcd1基因的相应外显子2和全部或部分的相应外显子3相同。在一些实施方案中,人部分包含经密码子优化以在非人动物中表达;在一些实施方案中,在啮齿动物中表达;在某些实施方案中,在小鼠中表达;在某些实施方案中,在大鼠中表达的序列。

[0019] 在一些实施方案中,人部分包含与SEQ ID NO:23至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少95%相同的序列。在一些实施方案中,人部分包含与SEQ ID NO:23基本上相同的序列。在一些实施方案中,人部分包含与SEQ ID NO:23相同的序列。在一些实施方案中,人部分包含SEQ ID NO:23。

[0020] 在一些实施方案中,本发明提供由如本文所述的非人动物产生(或生成)的PD-1多肽。在某些实施方案中,由如本文所述的非人动物产生的PD-1多肽包含与SEQ ID NO:6至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少95%相同的氨基酸序列。在某些实施方案中,由如本文所述的非人动物产生的PD-1多肽包含与SEQ ID NO:6基本上相同的氨基酸序列。在某些实施方案中,由如本文所述的非人动物产生的PD-1多肽包含与SEQ ID NO:6相同的氨基酸序列。

[0021] 在一些实施方案中,本发明提供来自如本文所述的非人动物的分离的细胞或组织。在一些实施方案中,本发明提供包含如本文所述的Pdcd1基因的分离的细胞或组织。在一些实施方案中,细胞为淋巴细胞。在一些实施方案中,细胞选自B细胞、树突状细胞,巨噬细胞,单核细胞(例如活化的单核细胞)、NK细胞和T细胞(例如活化的T细胞)。在一些实施方案中,组织选自脂肪、膀胱、大脑、乳房、骨髓、眼、心、肠、肾、肝、肺、淋巴结、肌肉、胰腺、血浆、血清、皮肤、脾、胃、胸腺、睾丸、卵子以及它们的组合。

[0022] 在一些实施方案中,本发明提供非人胚胎干细胞,其基因组包含如本文所述的Pdcd1基因。在一些实施方案中,非人胚胎干细胞为小鼠胚胎干细胞并且来自129品系、C57BL/6品系或BALB/c品系。在一些实施方案中,非人胚胎干细胞为小鼠胚胎干细胞并且来自129品系、C57BL/6品系或它们的混合物。在一些实施方案中,非人胚胎干细胞为小鼠胚胎干细胞并且来自129和C57BL/6品系的混合物。

[0023] 在一些实施方案中,非人胚胎干细胞具有包含Pdcd1基因的基因组,所述Pdcd1基因包含SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22或它们的组合。

[0024] 在一些实施方案中,本发明提供如本文所述的非人胚胎干细胞用于制备非人动物的用途。在某些实施方案中,非人胚胎干细胞为小鼠胚胎干细胞并且用于制备包含如本文所述的Pdcd1基因的小鼠。在某些实施方案中,非人胚胎干细胞为大鼠胚胎干细胞并且用于制备包含如本文所述的Pdcd1基因的大鼠。

[0025] 在一些实施方案中,本发明提供非人胚胎包含含有如本文所述的Pdcd1基因的非人胚胎干细胞、由其制备、由其获得或由其产生。在某些实施方案中,非人胚胎为啮齿动物胚胎;在一些实施方案中,小鼠胚胎;在一些实施方案中,大鼠胚胎。

[0026] 在一些实施方案中,本发明提供如本文所述的非人胚胎用于制备非人动物的用途。在某些实施方案中,非人胚胎为小鼠胚胎并且用于制备包含如本文所述的Pdcd1基因的小鼠。在某些实施方案中,非人胚胎为大鼠胚胎并且用于制备包含如本文所述的Pdcd1基因的大鼠。

[0027] 在一些实施方案中,本发明提供如本文所述的靶向载体(或核酸构建体)。在一些实施方案中,本发明提供靶向载体(或核酸构建体),其包含如本文所述的人源化Pdcd1基因。在一些实施方案中,本发明提供包含Pdcd1基因的靶向载体(或核酸构建体),所述Pdcd1基因编码包含全部或部分的人胞外结构域的PD-1多肽;在某些实施方案中,包含人PD-1多肽的氨基酸21-170、26-169、27-169、27-145或35-145的PD-1多肽。

[0028] 在一些实施方案中,靶向载体(或核酸构建体)包含非人Pdcd1基因的全部或部分的一个或多个外显子,其有效连接至人Pdcd1基因的全部或部分的一个或多个外显子。在一些实施方案中,靶向载体(或核酸构建体)包含侧接人Pdcd1基因的一个或多个外显子的5'和3'非人Pdcd1非翻译区(UTR)。在一些实施方案中,靶向载体(或核酸构建体)包含一个或多个选择标志物。在一些实施方案中,靶向载体(或核酸构建体)包含一个或多个位点特异性重组位点。在一些实施方案中,靶向载体(或核酸构建体)包含人Pdcd1外显子2。在一些实施方案中,靶向载体(或核酸构建体)包含人Pdcd1外显子2和全部或部分的人Pdcd1外显子3。

[0029] 在一些实施方案中,本发明提供如本文所述的靶向载体(或核酸构建体)用于制备经修饰的非人胚胎干细胞的用途。在一些实施方案中,本发明提供如本文所述的靶向载体(或核酸构建体)用于制备经修饰的非人胚胎的用途。在一些实施方案中,本发明提供如本文所述的靶向载体(或核酸构建体)用于制备非人动物的用途。

[0030] 在一些实施方案中,本发明提供一种制备表达来自内源Pdcd1基因的PD-1多肽的非人动物的方法,其中所述PD-1多肽包含人序列,所述方法包括(a)将基因组片段插入啮齿动物胚胎干细胞中的内源Pdcd1基因中,所述基因组片段包含编码全部或部分的人PD-1多肽的核苷酸序列;(b)获得(a)中产生的啮齿动物胚胎干细胞;以及使用(b)的啮齿动物胚胎干细胞形成啮齿动物。

[0031] 在一些实施方案中,人序列包含人PD-1多肽的氨基酸35-145、27-145、27-169、26-169或21-170。

[0032] 在一些实施方案中,核苷酸序列包含人Pdcd1外显子2。在一些实施方案中,核苷酸序列还包含全部或部分的人Pdcd1外显子3。在一些实施方案中,核苷酸序列包含一个或多个选择标志物。在一些实施方案中,核苷酸序列包含一个或多个位点特异性重组位点。

[0033] 在一些实施方案中,本发明提供一种制备非人动物的方法,所述非人动物的基因

组包含编码具有人部分和内源部分的PD-1多肽的Pdc1基因,所述部分有效连接至啮齿动物Pdc1启动子,所述方法包括对非人动物的基因组进行修饰以使得其包含编码具有人部分和内源部分的PD-1多肽的Pdc1基因,所述部分有效连接至啮齿动物Pdc1启动子,从而制备所述非人动物。

[0034] 在一些实施方案中,啮齿动物Pdc1启动子为内源啮齿动物Pdc1启动子。

[0035] 在一些实施方案中,人部分包含人PD-1多肽的氨基酸35-145、27-145、27-169、26-169或21-170。

[0036] 在一些实施方案中,Pdc1基因经修饰以包含人Pdc1外显子2。在一些实施方案中,Pdc1基因经修饰以包含人Pdc1外显子2和全部或部分的人Pdc1外显子3。

[0037] 在一些实施方案中,对非人动物的基因组的修饰在非人胚胎干细胞中进行,然后产生具有所述非人胚胎干细胞的非人动物。在某些实施方案中,非人胚胎干细胞为啮齿动物胚胎干细胞;在一些实施方案中,为小鼠胚胎干细胞;在一些实施方案中,为大鼠胚胎干细胞。

[0038] 在一些实施方案中,本发明提供可通过如本文所述的方法获得的非人动物。

[0039] 在一些实施方案中,本发明提供一种减少非人动物中的肿瘤生长的方法,所述方法包括将靶向人PD-1的药物施用给非人动物的步骤,所述非人动物的基因组包含编码具有人部分和内源部分的PD-1多肽的Pdc1基因,所述部分有效连接至啮齿动物Pdc1启动子;所述施用进行的条件和持续时间足以使非人动物中肿瘤生长减少。

[0040] 在一些实施方案中,本发明提供一种杀灭非人动物中的肿瘤细胞的方法,所述方法包括将靶向人PD-1的药物施用给非人动物的步骤,所述非人动物的基因组包含编码具有人部分和内源部分的PD-1多肽的Pdc1基因,所述部分有效连接至啮齿动物Pdc1启动子;所述施用进行的条件和持续时间足以使药物介导非人动物中肿瘤细胞的杀灭。

[0041] 在一些实施方案中,本发明提供一种评估靶向人PD-1的药物的药理学特性的方法,所述方法包括下列步骤:将药物施用给非人动物,所述非人动物的基因组包含编码具有人部分和内源部分的PD-1多肽的Pdc1基因,所述部分有效连接至啮齿动物Pdc1启动子;以及进行测定以确定靶向人PD-1的药物的一种或多种药理学特性。

[0042] 在许多实施方案中,如本文所述的非人动物为啮齿动物,所述啮齿动物的基因组包含编码具有人部分和内源部分的PD-1多肽的Pdc1基因,所述部分有效连接至啮齿动物Pdc1启动子。在许多实施方案中,啮齿动物Pdc1启动子为内源啮齿动物Pdc1启动子。在许多实施方案中,人部分包含人PD-1多肽的氨基酸35-145、27-145、27-169、26-169或21-170。

[0043] 在一些实施方案中,靶向人PD-1的药物为PD-1拮抗剂。在一些实施方案中,靶向人PD-1的药物为PD-1激动剂。在一些实施方案中,靶向人PD-1的药物为抗-PD-1抗体。在一些实施方案中,靶向人PD-1的药物经静脉内、腹膜内或皮下施用。

[0044] 在一些实施方案中,本发明提供非人动物肿瘤模型,所述非人动物表达包含人部分和内源部分的PD-1多肽。

[0045] 在一些实施方案中,本发明提供非人动物肿瘤模型,所述非人动物具有包含Pdc1基因的基因组,所述Pdc1基因包含内源部分和人部分,其中所述内源部分和人部分有效连接至非人动物Pdc1启动子。



[0046] 在一些实施方案中,本发明提供非人动物肿瘤模型,其通过以下步骤获得:(a) 提供非人动物,所述非人动物的基因组包含含有内源部分和人部分的Pdcd1基因,所述内源部分和人部分有效连接至非人动物Pdcd1启动子;和(b) 将一种或多种肿瘤细胞植入(a)的啮齿动物中;从而提供所述非人动物肿瘤模型。

[0047] 在一些实施方案中,本发明的非人动物肿瘤模型为啮齿动物肿瘤模型。在一些实施方案中,非人动物Pdcd1启动子为啮齿动物Pdcd1启动子。

[0048] 在一些实施方案中,本发明提供一种用于鉴定或验证药物或疫苗的方法,所述方法包括下列步骤:将药物或疫苗递送给非人动物,所述非人动物的基因组包含编码PD-1多肽的Pdcd1基因,所述PD-1多肽包含人部分和内源部分;以及监测对药物或疫苗的免疫应答、药物或疫苗的安全特性或对疾病、障碍或病症的效应中的一种或多种。在一些实施方案中,监测安全特性包括确定非人动物是否由于药物或疫苗的递送而表现出副作用或不利反应。在一些实施方案中,副作用或不利反应选自发病率、死亡率、体重的改变、一种或多种酶(例如肝)的水平改变、一个或多个器官的体重的改变、功能(例如感觉、运动、器官等)的丧失、增加的对一种或多种疾病的易感性、非人动物的基因组的改变、食物消耗的增加或减少以及一种或多种疾病的并发症。在一些实施方案中,疾病、障碍或病症在非人动物中诱发。在一些实施方案中,在非人动物中诱发的疾病、障碍或病症与需要治疗的一个或多个患者所罹患的疾病、障碍或病症相关联。在某些实施方案中,药物为抗体。

[0049] 在一些实施方案中,本发明提供如本文所述的非人动物在开发用于医学例如用作药剂的药物或疫苗中的用途。

[0050] 在一些实施方案中,本发明提供如本文所述的非人动物在制备用于治疗癌症、瘤、传染病、炎症疾病、障碍或病症或自体免疫疾病、障碍或病症的药剂中的用途。

[0051] 在多个实施方案中,本发明的Pdcd1基因包括如本文所述的Pdcd1基因。在多个实施方案中,本发明的Pdcd1基因编码具有人部分和内源部分的PD-1多肽,所述部分有效连接至啮齿动物Pdcd1启动子。在多个实施方案中,啮齿动物启动子为内源啮齿动物启动子。在多个实施方案中,人部分包含人Pdcd1外显子2。在多个实施方案中,人部分包含人Pdcd1外显子2并且还包含全部或部分的人Pdcd1外显子3。

[0052] 在多个实施方案中,本发明的PD-1多肽包括如本文所述的PD-1多肽。在多个实施方案中,本发明的非人动物未可检测地表达全长内源非人PD-1多肽。在多个实施方案中,本发明的非人动物未可检测地表达内源PD-1多肽的胞外部分。在多个实施方案中,本发明的非人动物未可检测地表达内源PD-1多肽的N端免疫球蛋白V结构域。

[0053] 在多个实施方案中,本发明的非人动物为啮齿动物;在一些实施方案中,为小鼠;在一些实施方案中,为大鼠。在一些实施方案中,本发明的小鼠选自129品系、BALB/C品系、C57BL/6品系和混合129xC57BL/6品系;在某些实施方案中,选自50%129和50%C57BL/6;在某些实施方案中,选自25%129和75%C57BL/6。

[0054] 如本申请中所用,术语“约”和“大约”可等同使用。本申请中与或不与约/大约一起使用的任何数字意在涵盖由相关领域普通技术人员所理解的任何正常波动。

[0055] 本发明的其他特征、目的和优点在以下的某些实施方案的详细描述中是显而易见的。然而,应当理解,详细描述虽然指示本发明的某些实施方案,但其仅通过举例说明的方式给出,而不是限制性的。根据详细描述,本发明的范围内的各种变化和修改对于本领域技

术人员而言将变得明显。

[0056] 附图简述

[0057] 本文中包括的由以下各图组成的附图仅用于举例说明目的而非用于限制。

[0058] 图1示出非人(例如小鼠)和人程序性细胞死亡1(Pdcd1)基因的基因组组织的未按比例的示意图。外显子和非翻译区(UTR)在每个外显子下方和每个UTR上方进行编号。

[0059] 图2示出用于使非人程序性细胞死亡1(Pdcd1)基因人源化的示例性方法的未按比例的示意图。选定的核苷酸连接点位置在每个连接点下方用线条标记。这些选定的核苷酸连接点的序列通过SEQ ID NO指示。

[0060] 图3示出小鼠和人程序性细胞死亡1(Pdcd1)基因的基因组组织的未按比例的示意图,其指示出实施例1中所述测定中使用的探针的大致位置。

[0061] 图4示出在CD19和CD8上设门的T细胞的示例性柱状图,所述CD19和CD8分离自野生型小鼠和如实施例1中所述的针对内源Pdcd1基因的人源化杂合的表达小鼠和/或人源化PD-1的小鼠。指示出受刺激和未受刺激细胞群体,其为用同种型对照染色的细胞。

[0062] 图5示出如实施例1中所述的针对内源Pdcd1基因杂合的小鼠的在21天内的示例性肿瘤生长曲线。对照:对PD-1无特异性的抗体;α-hPD-1Ab:对人PD-1具有特异性的抗体。箭头指示抗体治疗的天数。示出每个治疗组21天时的无肿瘤小鼠的数量。

[0063] 图6示出在用抗-PD-1抗体治疗后,如实施例1中所述的针对内源Pdcd1基因的人源化杂合的小鼠的脾中的CD8b、CD3、IFN-γ和PD-1 mRNA表达的示例性实时PCR分析。A:每组五只小鼠的平均值。B:每个治疗组中单个小鼠表达水平。对照:对PD-1无特异性的抗体;α-PD-1:抗-PD-1抗体。

[0064] 图7示出如实施例1中所述的针对内源Pdcd1基因的人源化杂合的小鼠在60天内的示例性肿瘤生长曲线,向所述小鼠施用0.3-25mg/kg抗-hPD-1抗体或25mg/kg对照抗体(对PD-1无特异性的抗体)。箭头指示抗体治疗的天数。示出每个治疗组60天时的无肿瘤小鼠的数量。

[0065] 图8示出示例性鼠、人和人源化Pdcd1和PD-1序列,以及针对非人Pdcd1基因的人源化的示例性人核酸序列。对于mRNA序列,粗体字体指示编码序列和连续外显子(在指示的情况下)由交替的下划线文本分隔开;对于人源化mRNA序列,人序列包含于圆括号内。对于蛋白质序列,信号肽加下划线,胞外序列为粗体字体,免疫球蛋白V结构域序列在圆括号内,并且胞内序列为斜体字体;对于人源化蛋白质序列,非人序列以常规字体指示,并且人序列以粗体字体指示。

[0066] 定义

[0067] 本发明不限于本文中描述的特定方法和实验条件,因为此类方法和条件可以变化。还应当理解,本文所使用的术语仅用于描述具体实施方案的目的,并且不旨在进行限制,因为本发明的范围仅由权利要求限定。

[0068] 除非另有定义,否则本文中使用的所有术语和短语包括所述术语和短语在本领域中已获得的含义,除非明确地指出相反或根据其中使用所述术语或短语的上下文明显相反。尽管与本文中描述的那些方法和材料类似或等同的任何方法和材料可用于本发明的实践或测试,但现在描述具体的方法和材料。所提及的所有出版物据此以引用方式并入。

[0069] 如本文中用于一个或多个目标值的术语“大约”是指与所述参照值相似的值。在某

些实施方案中,除非另有所指或根据上下文明显不同,否则术语“大约”或“约”是指在任一方向(大于或小于)上落在所述参照值的25%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%或更小内的值的范围(除了这样的数字将超过可能值的100%的情况外)。

[0070] 如本文中所用,术语“生物活性”包括在体外或体内(例如,在生物体中)在生物系统中具有活性的任何试剂的特性。例如,当存在于生物体中时在生物体内具有生物效应的试剂被认为具有生物活性。在具体实施方案,当蛋白质或多肽具有生物活性时,所述该蛋白质或多肽的共享所述蛋白质或多肽的至少一种生物活性的部分通常被称为“生物活性”部分。

[0071] 术语“可比较的”包括两种或更多种试剂、实体、状况、条件组等,它们可彼此不同但充分相似以允许它们之间进行比较,以使得可基于观察到的差异或相似性合理地得出结论。本领域普通技术人员在上下文中将理解,在任何给定的情况下,对于两种或更多种这样的试剂、实体、状况、条件组等需要多大程度的同一性来被认为是可比较的。

[0072] 如本文中用于保守氨基酸置换中的术语“保守”包括氨基酸残基被具有带相似化学性质(例如,电荷或疏水性)的侧链R基团的另一个氨基酸残基置换。一般来讲,保守氨基酸置换基本上不会改变蛋白质的目标功能特性,例如,受体结合配体的能力。具有带相似化学性质的侧链的氨基酸的组的实例包括:脂族侧链诸如甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸;脂族-羟基侧链诸如丝氨酸和苏氨酸;含酰胺侧链诸如天冬酰胺和谷氨酰胺;芳族侧链诸如苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸;碱性侧链诸如赖氨酸、精氨酸和组氨酸;酸性侧链诸如天冬氨酸和谷氨酸;和含硫侧链诸如半胱氨酸和甲硫氨酸。保守氨基酸置换组包括例如缬氨酸/亮氨酸/异亮氨酸、苯丙氨酸/酪氨酸、赖氨酸/精氨酸、丙氨酸/缬氨酸、谷氨酸/天冬氨酸以及天冬酰胺/谷氨酰胺。在一些实施方案中,保守氨基酸置换可为丙氨酸对蛋白质中的任何天然残基的置换,如例如丙氨酸扫描诱变中所使用的。在一些实施方案中,保守置换是在Gonnet等人(1992) Exhaustive Matching of the Entire Protein Sequence Database, Science 256:1443-45 (以引用方式并入)中公开的PAM250对数似然矩阵中具有正值的置换。在一些实施方案中,如果置换在PAM250对数似然矩阵中具有非负值,则该置换被认为是“适度保守的”。

[0073] 术语“对照”包括“对照”在本领域中所理解的含义,作为结果对比的标准。通常,对照通过分离变量以得出有关此类变量的结论而用于增进实验完整性。在一些实施方案中,对照是与测试反应或测定同时进行以提供对比物的反应或测定。如本文所用,“对照”可包括“对照动物”。“对照动物”可具有如本文所述的修饰,与本文所述的修饰不同的修饰或不具有修饰(即,野生型动物)。在一个实验中,应用“测试”(即,测试的变量)。在第二实验“对照”中,不应用测试的变量。在一些实施方案中,对照是历史对照(即,此前进行的测试或测定,或此前已知的量或结果)。在一些实施方案中,对照是或包括印刷或以其他方式保存的记录。对照可为阳性对照或阴性对照。

[0074] 术语“破坏”包括与DNA分子(例如与内源同源序列例如基因或基因座)同源重组的结果。在一些实施方案中,破坏可实现或代表插入、缺失、取代、替换、错义突变或DNA序列移码或它们的组合。插入可包括插入整个基因或基因片段,例如外显子,其可来源于除内源序列之外的其他来源(例如异源序列)。在一些实施方案中,破坏可提高基因或基因产物的(例

如由基因编码的蛋白质的)表达和/或活性。在一些实施方案中,破坏可降低基因或基因产物的表达和/或活性。在一些实施方案中,破坏可改变基因或编码的基因产物(例如编码的蛋白质)的序列。在一些实施方案中,破坏可截短基因或编码的基因产物(例如编码的蛋白质)或使其片段化。在一些实施方案中,破坏可使基因或编码的基因产物延长;在一些这样的实施方案中,破坏可实现融合蛋白的组装。在一些实施方案中,破坏可影响基因或基因产物的水平但不影响其活性。在一些实施方案中,破坏可影响基因或基因产物的活性但不影响其水平。在一些实施方案中,破坏可对基因或基因产物的水平没有显著影响。在一些实施方案中,破坏可对基因或基因产物的活性没有显著影响。在一些实施方案中,破坏可对基因或基因产物的水平或活性都没有显著影响。

[0075] 术语“确定”、“测量”、“评价”、“评估”、“测定”和“分析”可互换使用以指代任何形式的测量,并包括确定某一要素是否存在。这些术语包括定量和/或定性测定。测定可为相对的或绝对的。“测定...的存在”包括确定存在的某物的量和/或确定其是否存在。

[0076] 术语“给药方案”或“治疗方案”包括一组单位剂量,在一些实施方案中,包括一组以上的单位剂量,所述单位剂量被单独施用给受试者,通常分隔一定的时段。在一些实施方案中,给定的治疗剂具有推荐的给药方案,所述给药方案可提供一个或多个剂量。在一些实施方案中,给药方案包含多个剂量,其中每个剂量彼此分隔开相同长度的时段;在一些实施方案中,给药方案包含多个剂量和至少两个不同的分隔单独剂量的时段。

[0077] 短语“内源基因座”或“内源基因”包括存在于亲本或参考生物体中基因座。在一些实施方案中,内源基因座具有天然存在的序列。在一些实施方案中,内源基因座为野生型基因座。在一些实施方案中,参考生物体为野生型生物体。在一些实施方案中,参考生物体为工程化生物体。在一些实施方案中,参考生物体是实验室培育的生物体(无论是野生型的还是工程化的)。

[0078] 短语“内源启动子”包括与内源基因天然结合的启动子,例如在野生型生物体中。

[0079] 术语“异源”包括来自不同来源的剂或实体。例如,当参考多肽、基因或基因产物使用或存在于特定细胞或生物体中时,所述术语阐明相关多肽、基因或基因产物:1)被人工工程化;2)被人工(例如,经由遗传工程)引入细胞或生物体(或其前体)中;和/或3)是由相关细胞或生物体(例如,相关细胞类型或生物体类型)非天然地产生或非天然地存在于所述细胞或生物体中。

[0080] 术语“宿主细胞”包括已将异源(例如,外源)核酸或蛋白质引入其中的细胞。本领域技术人员在阅读本公开内容后将理解,此类术语不仅指特定的主题细胞,而且还用于指该细胞的子代。因为某些修饰可因突变或环境影响而在后续世代中发生,所以这样的子代事实上可不等同于亲本细胞,但仍包括在本文中使用的术语“宿主细胞”的范围内。在一些实施方案中,宿主细胞为原核或真核细胞或包含原核或真核细胞。一般来讲,宿主细胞是适于接受和/或产生异源核酸或蛋白质的任何细胞,而与所述细胞被指定所属的生命界无关。示例性细胞包括原核生物和真核生物(单细胞或多细胞)的细胞、细菌细胞(例如,大肠杆菌(*E.coli*)、芽孢杆菌属菌种(*Bacillus* spp.)、链霉菌属菌种(*Streptomyces* spp.)等的菌株)、分枝杆菌细胞、真菌细胞、酵母细胞(例如,酿酒酵母(*S.cerevisiae*)、粟酒裂殖酵母(*S.pombe*)、巴斯德毕赤酵母(*P.pastoris*)、甲醇毕赤酵母(*P.methanolica*)等)、植物细胞、昆虫细胞(例如,SF-9、SF-21、杆状病毒感染的昆虫细胞、粉纹夜蛾(*Trichoplusia ni*)等)、

非人动物细胞、人细胞或细胞融合物例如杂交瘤或四源杂交瘤。在一些实施方案中,细胞为人、猴、猿、仓鼠、大鼠或小鼠细胞。在一些实施方案中,细胞为真核细胞并且选自以下细胞: CHO (例如CHO K1、DXB-11CHO、Veggie-CHO)、COS (例如COS-7)、视网膜细胞、Vero、CV1、肾 (例如HEK293、293EBNA、MSR 293、MDCK、HaK、BHK)、HeLa、HepG2、WI38、MRC 5、Colo205、HB 8065、HL-60、(例如BHK21)、Jurkat、Daudi、A431 (表皮的)、CV-1、U937、3T3、L细胞、C127细胞、SP2/0、NS-0、MMT 060562、Sertoli细胞、BRL 3A细胞、HT1080细胞、骨髓瘤细胞、肿瘤细胞和来源于前述细胞的细胞系。在一些实施方案中,细胞包含一个或多个病毒基因,例如表达病毒基因的视网膜细胞 (例如PER.C6™细胞)。在一些实施方案中,宿主细胞为分离的细胞或包含分离的细胞。在一些实施方案中,宿主细胞为组织的一部分。在一些实施方案中,宿主细胞为生物体的一部分。

[0081] 术语“人源化”包括这样的核酸或蛋白质:所述核酸或蛋白质的结构 (即,核苷酸或氨基酸序列) 包括与非人动物中天然存在的特定基因或蛋白质的结构基本上或完全对应的部分,并且还包括与相关的特定非人基因或蛋白质中所存在的部分不同但与相应的人基因或蛋白质中存在的可比较结构更接近对应的部分。在一些实施方案中,“人源化”基因是编码具有与人多肽 (例如,人蛋白质或其部分-例如其特征性部分) 的氨基酸序列基本上相同的氨基酸序列的多肽的基因。只是给出一个例子,在膜受体的情况下,“人源化”基因可编码全部或部分的具有胞外部分的多肽,所述胞外部分具有的氨基酸序列与人胞外部分的氨基酸序列相同,并且剩余序列与非人 (例如小鼠) 多肽的序列相同。在一些实施方案中,人源化基因包含人基因的DNA序列的至少一部分。在一些实施方案中,人源化基因包含人基因的完整DNA序列。在一些实施方案中,人源化蛋白质包含出现在人蛋白质中的部分的序列。在一些实施方案中,人源化蛋白质包含人蛋白质的完整序列,并且由对应于人基因的同源物或直向同源物的非人动物的内源基因座表达。

[0082] 如关于序列比较使用的,术语“同一性”包括如通过本领域中已知的可用于测量核苷酸和/或氨基酸序列同一性的许多不同算法中的任何算法所确定的同一性。在一些实施方案中,使用ClustalW v.1.83 (慢) 比对 (利用10.0的开放缺口罚分、0.1的延伸缺口罚分) 和使用Gonnet相似性矩阵 (MACVECTOR™10.0.2, MacVector Inc., 2008) 来确定本文所述的同一性。

[0083] 术语“分离的”包括这样的物质和/或实体,所述物质和/或实体 (1) 已与至少一些当最初产生 (无论天然地还是在实验环境中) 时与其关联的组分分离,和/或 (2) 通过人工设计、产生、制备和/或制造。分离的物质和/或实体可与约10%、约20%、约30%、约40%、约50%、约60%、约70%、约80%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或超过约99%的最初与其关联的其他组分分离。在一些实施方案中,分离的试剂为约80%、约85%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或超过约99%纯的。如果物质基本上不含其他组分,则其是“纯的”。在一些实施方案中,如将被本领域技术人员所理解的,物质在与某些其他组分例如一种或多种载体或赋形剂 (例如,缓冲液、溶剂、水等) 组合后,仍可被认为是“分离的”或甚至“纯的”;在此类实施方案中,计算物质在不包括此类载体或赋形剂情况下的分离百分比或纯度。只是给出一个例子,在一些实施方案中,天然存在的生物聚合物诸如多肽或多核苷酸a) 在其衍生的起源或来源而不与在其天然状态下天然伴随其的一些或全部组分关联时;b) 在其

基本上不含与天然产生其的物种相同的物种的其他多肽或核酸时;c)当由不是天然产生其的物种的细胞或其他表达系统表达或以其他方式与来自所述细胞或其他表达系统的组分关联时,被认为是“分离的”。因此,例如,在一些实施方案中,化学合成的或在与天然产生其的细胞系统不同的细胞系统中合成的多肽被认为是“分离的”多肽。可选地或另外地,在一些实施方案中,已历经一种或多种纯化技术的多肽在其已与a)在自然界中与其关联的;和/或b)当最初产生时与其关联的其他组分分离的程度上可被认为是“分离的”多肽。

[0084] 短语“非人动物”包括任何非人的脊椎生物体。在一些实施方案中,非人动物为圆口纲脊椎动物、硬骨鱼、软骨鱼(例如,鲨鱼或鳐)、两栖动物、爬行动物、哺乳动物或鸟。在一些实施方案中,非人哺乳动物为灵长类动物、山羊、绵羊、猪、狗、牛或啮齿动物。在一些实施方案中,非人动物为诸如大鼠或小鼠的啮齿动物。

[0085] 短语“核酸”包括被掺入或可被掺入寡核苷酸链的任何化合物和/或物质。在一些实施方案中,“核酸”是通过磷酸二酯键联被掺入到或可被掺入到寡核苷酸链中的化合物和/或物质。如根据上下文将清楚的,在一些实施方案中,“核酸”包含单个核酸残基(例如核苷酸和/或核苷);在一些实施方案中,“核酸”包含含有含单个核酸残基的寡核苷酸链。在一些实施方案中,“核酸”为RNA或包含RNA;在一些实施方案中,“核酸”为DNA或包含DNA。在一些实施方案中,“核酸”为一个或多个天然核酸残基、包含一个或多个天然核酸残基或由一个或多个天然核酸残基组成。在一些实施方案中,“核酸”为一个或多个核酸类似物、包含一个或多个核酸类似物或由一个或多个核酸类似物组成。在一些实施方案中,核酸类似物与“核酸”的差别在于其不利用磷酸二酯主链。例如,在一些实施方案中,“核酸”为一个或多个“肽核酸”、包含一个或多个肽核酸或由一个或多个肽核酸组成,所述肽核酸在本领域中是已知的并且在主链中具有肽键而非磷酸二酯键,其被认为在本发明的范围之内。可选择地或另外地,在一些实施方案中,“核酸”具有一个或多个硫代磷酸酯和/或5'-N-亚磷酰胺键联而非磷酸二酯键。在一些实施方案中,“核酸”为一个或多个天然核苷(例如,腺苷、胸苷、鸟苷、胞苷、尿苷、脱氧腺苷、脱氧胸苷、脱氧鸟苷和脱氧胞苷)、包含一个或多个天然核苷、或由一个或多个天然核苷组成。在一些实施方案中,“核酸”为一个或多个核苷类似物(例如,2-氨基腺苷、2-硫代胸苷、肌苷、吡咯并嘧啶、3-甲基腺苷、5-甲基胞苷、C-5丙炔基-胞苷、C-5丙炔基-尿苷、2-氨基腺苷、C5-溴尿苷、C5-氟尿苷、C5-碘尿苷、C5-丙炔基-尿苷、C5-丙炔基-胞苷、C5-甲基胞苷、2-氨基腺苷、7-脱氮腺苷、7-脱氮鸟苷、8-氧代腺苷、8-氧代鸟苷、0(6)-甲基鸟嘌呤、2-硫代胞苷、甲基化碱基、插入型碱基及其组合)、包含一个或多个核苷类似物或由一个或多个核苷类似物组成。在一些实施方案中,与天然核酸中的糖相比,“核酸”包含一个或多个经修饰的糖(例如,2'-氟核糖、核糖、2'-脱氧核糖、阿拉伯糖和己糖)。在一些实施方案中,“核酸”具有编码功能性基因产物诸如RNA或蛋白质的核苷酸序列。在一些实施方案中,“核酸”包括一个或多个内含子。在一些实施方案中,“核酸”通过下述方式中的一种或多种来制备:从天然来源分离、通过基于互补模板的聚合(体内或体外)进行的酶促合成、在重组细胞或系统中的复制、化学合成及其组合。在一些实施方案中,“核酸”的长度为至少3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、225、250、275、300、325、350、375、400、425、450、475、500、600、700、800、900、1000、1500、2000、2500、3000、3500、4000、4500、5000个或更多个残基。在一些实施方案中,“核酸”为单链的;在一些实施方案中,“核酸”为

双链的。在一些实施方案中，“核酸”具有包含至少一个元件的核苷酸序列，所述元件编码多肽或与编码多肽的序列互补。在一些实施方案中，“核酸”具有酶促活性。

[0086] 短语“有效连接”包括并置，其中所描述的组分处于允许它们以预期方式起作用的关系。与编码序列“有效连接”的控制序列以这样的方式连接，使得在与控制序列相容的条件下获得编码序列的表达。“有效连接”序列包括与目标基因相邻的表达控制序列和以反式方式作用或远距离作用以控制目标基因的表达控制序列。术语“表达控制序列”包括多核苷酸序列，所述多核苷酸序列是实现与其相连的编码序列表达和加工所必需的。“表达控制序列”包括合适的转录起始、终止、启动子和增强子序列；有效的RNA加工信号例如剪接和多聚腺苷酸化信号；使细胞质mRNA稳定的序列；增强翻译效率的序列（即Kozak共有序列）；增强蛋白稳定性质的序列；以及当需要时，增强蛋白分泌的序列。这种控制序列的性质随宿主生物体而不同。例如，在原核生物中，此类控制序列通常包括启动子、核糖体结合位点和转录终止序列，而在真核生物中，典型地，此类表达控制序列包括启动子和转录终止序列。术语“控制序列”旨在包括其存在对于表达和加工来说是必需的组分，并且还可包括额外的组分，其存在是有利的，例如，前导序列和融合伴侣序列。

[0087] 术语“患者”或“受试者”包括被施用或可被施用所提供的组合物以例如用于实验、诊断、预防、美容和/或治疗目的的任意生物体。典型的患者包括动物（例如哺乳动物如小鼠、大鼠、兔子、非人灵长类和/或人）。在一些实施方案中，患者为非人动物。在一些实施方案中，患者（例如非人动物患者）可具有如本文所述的修饰、与本文所述的修饰不同的修饰或不具有修饰（即，野生型非人动物患者）。在一些实施方案中，非人动物罹患或易患一种或多种障碍或病症。在一些实施方案中，非人动物显示出障碍或病症的一种或多种症状。在一些实施方案中，非人动物已被诊断患有一种或多种障碍或病症。

[0088] 术语“多肽”包括任何氨基酸的聚合链。在一些实施方案中，多肽具有天然存在的氨基酸序列。在一些实施方案中，多肽具有非天然存在的氨基酸序列。在一些实施方案中，多肽具有氨基酸序列，其包含彼此单独天然存在的部分（即，来自两种或更多种不同的生物体，例如，人和非人部分）。在一些实施方案中，多肽具有通过人工行为进行设计和/或产生的被工程化的氨基酸序列。

[0089] 术语“重组”通过重组手段设计、工程化、制备、表达、产生或分离的多肽（例如本文所述的PD-1多肽），例如使用转染到宿主细胞中的重组表达载体表达的多肽、从重组的组人多肽文库分离的多肽（Hoogenboom H.R., (1997) TIB Tech.15:62-70; Azzazy H. 和 Highsmith W.E., (2002) Clin.Biochem.35:425-445; Gavilondo J.V. 和 Larrick J.W. (2002) BioTechniques 29:128-145; Hoogenboom H. 和 Chames P. (2000) Immunology Today 21:371-378）、从用人免疫球蛋白基因转基因的动物（例如小鼠）分离的抗体（参见例如，Taylor, L.D., 等人 (1992) Nucl. Acids Res. 20:6287-6295; Kellermann S-A. 和 Green L.L. (2002) Current Opinion in Biotechnology 13:593-597; Little M. 等人 (2000) Immunology Today 21:364-370; Murphy, A.J., 等人 (2014) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 111 (14):5153-5158）或通过牵涉将选定的序列元件彼此剪接的任何其他手段来制备、表达、产生或分离的多肽。在一些实施方案中，此类选定的序列元件中的一个或多个是天然存在的。在一些实施方案中，此类选定的序列元件中的一个或多个是计算机设计的 (insilico)。在一些实施方案中，一个或多个此类选定的序列元件由已



知序列元件的诱变(例如体内或体外)产生,所述已知序列元件例如来自天然来源或合成来源。例如,在一些实施方案中,重组多肽由存在于目标来源生物体(例如人、小鼠等)的基因组中的序列构成。在一些实施方案中,重组多肽具有由诱变(例如,体外或体内,例如在非人动物中)产生的氨基酸序列,以使得所述重组多肽的氨基酸序列为这样的序列,该序列虽然源自多肽序列且与多肽序列相关,但可能不天然存在于非人动物体内的基因组内。

[0090] 术语“替换”包括通过其将宿主基因座中(例如,基因组中)存在的被替换的”核酸序列(例如,基因)从该基因座移除并将不同的“替换”核酸置于该位置的过程。在一些实施方案中,被替换的核酸序列与替换核酸序列是相互可比较的,因为,例如,它们彼此同源和/或含有相应的元件(例如,蛋白质编码元件、调控元件等)。在一些实施方案中,被替换的核酸序列包含启动子、增强子、剪接供体位点、剪接受体位点、内含子、外显子、非翻译区(UTR)中的一个或多个;在一些实施方案中,替换核酸序列包含一个或多个编码序列。在一些实施方案中,替换核酸序列为被替换的核酸序列的同源物。在一些实施方案中,替换核酸序列为被替换的序列的直向同源物。在一些实施方案中,替换核酸序列为人核酸序列或包含人核酸序列。在一些实施方案中,包括在替换核酸序列为人核酸序列或包含人核酸序列的情况下,被替换的核酸序列为啮齿动物序列或包含啮齿动物序列(例如小鼠或大鼠序列)。这样放置的核酸序列可包含其为用于获得这样放置的序列的来源核酸序列的部分的一个或多个调节序列(例如,启动子、增强子、5’-或3’-非翻译区等)。例如,在多个实施方案中,替换是异源序列对内源序列的置换,所述置换导致从这样放置的核酸序列(包含所述异源序列)产生基因产物,但不表达内源序列;替换是用编码与由内源序列编码的蛋白质具有相似功能的蛋白质的核酸序列替换内源基因组序列(例如,内源基因组序列编码PD-1多肽,并且DNA片段编码一个或多个PD-1多肽)。在多个实施方案中,内源基因或其片段被对应的人基因或其片段替换。对应的人基因或其片段是作为被替换的内源基因或其片段的直向同源物的人基因或片段,或在结构和/或功能上与被替换的内源基因或其片段基本上相似或相同的人基因或片段。

[0091] 短语“程序性细胞死亡1蛋白质”或“PD-1蛋白质”包括I型跨膜蛋白质,其属于T细胞调节因子的CD28/CTLA-4家族。PD-1蛋白质的蛋白质结构包括胞外氨基端免疫球蛋白V结构域、跨膜结构域和羧基端胞内尾部,所述胞内尾部包含免疫受体酪氨酸基抑制基序(ITIM)和免疫受体酪氨酸基转换基序。PD-1在细胞表面上表达并且与作为B7家族免疫调节配体的成员PD-L1和PD-L2相互作用(Collins,M.等人(2005)Genome Biol.6:223)。PD-1尤其是在活化的T细胞、B细胞、巨噬细胞、单核细胞、肥大细胞以及许多肿瘤细胞中表达。已证实PD-1牵涉免疫应答的负向调控,并且具体地,牵涉T细胞应答的负向调控。仅以举例说明的方式,编码PD-1蛋白质的小鼠和人Pdcd1基因的核苷酸和氨基酸序列在图8中提供。本领域技术人员在阅读本公开内容后将认识到,基因组中的一个或多个内源Pdcd1基因(或全部)可被一个或多个异源Pdcd1基因(例如多态变体、亚型或突变体、来自另一物种的基因、人源化形式等)替代。

[0092] “PD-1-表达细胞”包括表达PD-1I型膜蛋白质的细胞。在一些实施方案中,PD-1-表达细胞在其表面上表达PD-1I型膜蛋白质。在一些实施方案中,PD-1蛋白质以足以介导细胞间相互作用的量表达在细胞表面上。示例性PD-1-表达细胞包括B细胞、巨噬细胞和T细胞。PD-1-表达细胞经由免疫细胞(例如T和B细胞)的表面上表达的PD-1来调节细胞过程,并且



在确定此类细胞的分化和命运方面起作用。在一些实施方案中,本发明的非人动物展示出经由在非人动物的一种或多种细胞表面上表达的人源化PD-1蛋白质对多个细胞过程(如本文所述)的调节。在一些实施方案中,本发明的非人动物展示出经由在非人动物的一种或多种细胞表面上表达的人源化PD-1蛋白质对通过T细胞受体(TCR)的信号传导的负向调控。在一些实施方案中,非人动物展示出经由在非人动物的一种或多种细胞表面上表达的人源化PD-1蛋白质对免疫应答的负向调控。

[0093] 术语“参照”包括与目标试剂、动物、队列、个体、群体、样本、序列或值相比较的标准或对照试剂、队列、个体、群体、样本、序列或值。在一些实施方案中,参照试剂、队列、个体、群体、样本、序列或值的测试或测定与目标试剂、队列、个体、群体、样本、序列或值的测试或测定基本上同时进行。在一些实施方案中,参照试剂、队列、个体、群体、样本、序列或值为历史参照,其任选地以有形媒介体现。在一些实施方案中,参照可指对照。如本文所用,“参照”可包括“参照动物”。“参照动物”可具有如本文所述的修饰,与本文所述的修饰不同的修饰或不具有修饰(即,野生型动物)。通常,本领域内的技术人员将理解,参照试剂、动物、队列、个体、群体、样本、序列或值一定的条件下进行测定或表征,所述条件与用来测定或表征目标试剂、动物(例如哺乳动物)、队列、个体、群体、样本、序列或值的条件类似。

[0094] 术语“基本上”包括表现出全部或接近全部范围或程度的目标特性或性质的定性状况。生物学领域的普通技术人员将理解,生物和化学现象很少(如果有的话)进行至完成和/或进行至完全,或实现或避免绝对的结果。因此术语“基本上”用于捕捉潜在的在许多生物和化学现象中固有的完全性的缺乏。

[0095] 短语“基本上同源”包括氨基酸或核酸序列之间的比较。如本领域普通技术人员将理解的,如果两个序列在对应的位置上含有同源残基,则它们通常被认为是“基本上同源的”。同源残基可为相同的残基。或者,同源残基可为具有适当相似的结构和/或功能特性的不相同的残基。例如,如由本领域的普通技术人员所熟知的,某些氨基酸通常被归类为“疏水性”或“亲水性”氨基酸,和/或归类为具有“极性”或“非极性”侧链。一个氨基酸对另一个相同类型的氨基酸的置换可通常被认为是“同源”置换。典型的氨基酸类别汇总于表1和表2中。

[0096] 表1

	氨基酸	三字母代	单字母	侧链极性	侧链酸碱 性	水合指数
		码	代码			
[0097]	丙氨酸	Ala	A	非极性	中性	1.8
	精氨酸	Arg	R	极性	阳性	-4.5
	天冬酰胺	Asn	N	极性	中性	-3.5
	天冬氨酸	Asp	D	极性	阴性	-3.5
	半胱氨酸	Cys	C	非极性	中性	2.5
	谷氨酸	Glu	E	极性	阴性	-3.5
	谷氨酰胺	Gln	Q	极性	中性	-3.5
	甘氨酸	Gly	G	非极性	中性	-0.4
	组氨酸	His	H	极性	阳性	-3.2
	异亮氨酸	Ile	I	非极性	中性	4.5
	亮氨酸	Leu	L	非极性	中性	3.8
	赖氨酸	Lys	K	极性	阳性	-3.9
	甲硫氨酸	Met	M	非极性	中性	1.9
	苯丙氨酸	Phe	F	非极性	中性	2.8
	脯氨酸	Pro	P	非极性	中性	-1.6
	丝氨酸	Ser	S	极性	中性	-0.8
	苏氨酸	Thr	T	极性	中性	-0.7
	色氨酸	Trp	W	非极性	中性	-0.9
	酪氨酸	Tyr	Y	极性	中性	-1.3
	缬氨酸	Val	V	非极性	中性	4.2

[0098] 表2

	不明确的氨基酸		3-字母	1-字母
[0099]	天冬酰胺或天冬氨酸		Asx	B
	谷氨酰胺或谷氨酸		Glx	Z
	亮氨酸或异亮氨酸		Xle	J
	未指明的或未知的氨基酸		Xaa	X

[0100] 如本领域中所熟知的,氨基酸或核酸序列可使用多种算法中的任意算法来进行比较,所述算法包括商业计算机程序中可获得的那些算法如用于核苷酸序列的BLASTN以及用于氨基酸序列的BLASTP、空位BLAST和PSI-BLAST。示例性的此类程序描述于Altschul等人(1990)Basic local alignment search tool,J.Mol.Biol.,215(3):403-410;Altschul等人(1997)Methods in Enzymology;Altschul等人,"Gapped BLAST and PSI-BLAST:a new generation of protein database search programs",Nucleic Acids Res.25:3389-3402;Baxevanis等人(1998)Bioinformatics:A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins,Wiley;和Misener等人(编辑)(1999)Bioinformatics Methods and

Protocols (Methods in Molecular Biology, 第132卷), Humana Press。除了鉴定同源序列以外,上文提及的程序通常还提供同源性程度的指示。在一些实施方案中,如果两个序列的至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多的相应残基在相关的残基序列段(stretch)上是同源的,则这两个序列被认为是基本上同源的。在一些实施方案中,相关序列段为完全序列。在一些实施方案中,相关序列段为至少9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个或更多个残基。在一些实施方案中,相关序列段包括沿着完全序列的连续残基。在一些实施方案中,相关序列段包括沿着完全序列的不连续的残基。在一些实施方案中,相关区段为至少10个、15个、20个、25个、30个、35个、40个、45个、50个或更多个残基。

[0101] 短语“基本上相同”包括氨基酸或核酸序列之间的比较。如本领域普通技术人员将理解的,如果两个序列在对应的位置上含有相同残基,则它们通常被认为是“基本上相同的”。如本领域中所熟知的,氨基酸或核酸序列可使用多种算法中的任意算法来进行比较,所述算法包括商业计算机程序中可获得的那些算法如用于核苷酸序列的BLASTN以及用于氨基酸序列的BLASTP、空位BLAST和PSI-BLAST。示例性的此类程序描述于Altschul等人(1990) Basic local alignment search tool, J. Mol. Biol., 215 (3): 403-410; Altschul等人, Methods in Enzymology; Altschul等人(1997) Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402; Baxevanis等人(1998) Bioinformatics: A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins, Wiley; 和 Misener等人, (编辑) (1999) Bioinformatics Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology, 第132卷), Humana Press。除了鉴定相同的序列以外,上文提及的程序通常还提供同一性程度的指示。在一些实施方案中,如果两个序列的至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多的相应残基在相关的残基序列段上是相同的,则这两个序列被认为是基本上相同的。在一些实施方案中,相关序列段为完全序列。在一些实施方案中,相关区段为至少10个、15个、20个、25个、30个、35个、40个、45个、50个或更多个残基。

[0102] 短语“靶向载体”或“靶向构建体”包括包含靶向区域的多核苷酸分子。靶向区域包含与靶细胞、组织或动物中的序列相同或基本上相同并且提供靶向构建体经由同源重组至所述细胞、组织或动物的基因组内的位置中的整合的序列。还包括使用位点特异性重组酶识别位点(例如, loxP或Frt位点)进行靶向的靶向区域。在一些实施方案中,本发明的靶向构建体还包含特定目标核酸序列或基因、可选择标志物、控制和/或调控序列、以及允许通过帮助或促进牵涉此类序列的重组的蛋白质的外源性添加而介导的重组的其他核酸序列。在一些实施方案中,本发明的靶向构建体还包含全部或部分的目标基因,其中所述目标基因为编码具有与由内源序列编码的蛋白质相似的功能的全部或部分的蛋白质的异源基因。在一些实施方案中,本发明的靶向构建体还包含全部或部分的目标人源化基因,其中所述目标人源化基因编码具有与由内源序列编码的蛋白质相似的功能的全部或部分的蛋白质。

[0103] 短语“治疗有效量”包括产生施用预期效应的量。在一些实施方案中,该术语是指当根据治疗剂给药方案向罹患或易患疾病、障碍和/或病症的受试者(例如动物)施用时足以治疗所述疾病、障碍和/或病症的量。在一些实施方案中,治疗有效量为这样的量,其降低疾病、障碍和/或病症中一者或多者的发生率和/或严重程度,和/或延迟它们的发作。本领域

域的普通技术人员将理解,术语“治疗有效量”实际上不要求在特定个体中实现成功的治疗。相反,治疗有效量可为在施用给需要这种治疗的大量受试者时提供特定的所需药理学响应的量。在一些实施方案中,对治疗有效量的提及可为对一个或多个特定组织(例如,受疾病、障碍或病症影响的组织)或流体(例如,血液、唾液、血清、汗液、泪液、尿液等)中所测得的量的提及。本领域的普通技术人员将理解,在一些实施方案中,治疗有效量的特定药剂或疗法可以单剂量配制和/或施用。在一些实施方案中,治疗有效剂可以多个剂量(例如作为给药方案的一部分)配制和/或施用。

[0104] 术语“治疗”在其最广泛的意义上包括部分或完全减轻、改善、解除、抑制特定疾病、障碍和/或病症的一种或多种症状、特征和/或原因;延迟其发作、降低其严重程度和/或减少其发生率的物质(例如提供的组合物)的任意施用。在一些实施方案中,此类治疗可施用于未表现出相关疾病、障碍/或病症的病征的受试者和/或仅表现出疾病、障碍和/或病症的早期病征的受试者。可选择地或另外地,在一些实施方案中,治疗可施用于表现出相关疾病、障碍和/或病症的一种或多种已确立病征的受试者。在一些实施方案中,治疗可用于已诊断罹患相关疾病、障碍和/或病症的受试者。在一些实施方案中,治疗可用于已知具有与相关疾病、障碍和/或病症的发展风险增加的统计学相关的一个或多个易感性因素的受试者。

[0105] 术语“变体”包括显示出与参照实体的显著结构同一性但相较于所述参照实体在一个或多个化学部分的存在或水平上与所述参照实体结构上不同的实体。在许多实施方案中,“变体”还在功能上与其参照实体不同。一般来讲,特定实体是否被适当地认为是参照实体的“变体”是基于其与参照实体的结构同一性的程度。如本领域技术人员将理解的,任何生物或化学参照实体具有某些特征性结构元件。根据定义,“变体”是共享一个或多个此类特征性结构元件的不同的化学实体。只是给出一些例子,小分子可具有特征性核结构元件(例如,大环核)和/或一个或多个特征性侧链部分,以使得小分子的变体是共享核结构元件和特征性侧链部分,但在其他侧链部分上和/或在存在于核内的键的类型(单键相对于双键,E相对于Z,等)上不同的分子,多肽可具有包含在线性或三维空间中相对于彼此具有指定的位置和/或促成特定生物功能的多个氨基酸的特征性序列元件,核酸可具有包含在线性或三维空间中相对于彼此具有指定的位置的多个核苷酸残基的特征性序列元件。例如,“变体多肽”可由于氨基酸序列中的一个或多个差异和/或共价附接于多肽主链的化学部分(例如,碳水化合物、脂质等)中的一个或多个差异而与参照多肽不同。在一些实施方案中,“变体多肽”显示出与参照多肽具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%或99%的总体序列同一性。可选择地或另外地,在一些实施方案中,“变体多肽”不与参照多肽共享至少一个特征性序列元件。在一些实施方案中,参照多肽具有一种或多种生物活性。在一些实施方案中,“变体多肽”共享参照多肽的一种或多种生物活性。在一些实施方案中,“变体多肽”缺乏参照多肽的一种或多种生物活性。在一些实施方案中,“变体多肽”显示出相较于参照多肽降低水平的一种或多种生物活性。在许多实施方案中,如果目标多肽具有与亲代的氨基酸序列相同但在特定位置上具有少数序列改变的氨基酸序列,则目标多肽被认为是亲代或参照多肽的“变体”。通常,变体中少于20%、15%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%的残基相较于亲代被置换。在一些实施方案中,“变体”变体相较于亲代具有10个、9个、8个、7个、6个、5个、4个、3个、2个或1个置换的

残基。通常，“变体”具有极少数目（例如，少于5个、4个、3个、2个或1个）的置换的功能残基（即，参与特定生物活性的残基）。此外，相较于亲代，“变体”通常具有不超过5个、4个、3个、2个或1个添加或缺失，并且通常不具有添加或缺失。此外，任何添加或缺失通常少于约25个、约20个、约19个、约18个、约17个、约16个、约15个、约14个、约13个、约10个、约9个、约8个、约7个、约6个残基，并且通常少于约5个、约4个、约3个或约2个残基。在一些实施方案中，亲代或参照多肽是天然发现的多肽。如将由本领域普通技术人员所理解的，特定目标多肽的多个变体通常可为天然存在的，特别是当目标多肽为传染原多肽时。

[0106] 术语“载体”包括能够转运与其关联的另一种核酸的核酸分子。在一些实施方案中，载体能够在宿主细胞诸如真核和/或原核细胞中进行染色体外复制和/或表达与它们连接的核酸。能够指导有效连接的基因的表达的载体在本文中被称为“表达载体”。

[0107] 术语“野生型”包括具有如在“正常”（相对于突变、患病的、改变的等）状态或环境中天然存在的结构和/或活性的实体。本领域普通技术人员将理解，野生型基因和多肽通常以多种不同的形式（例如，等位基因）存在。

[0108] 某些实施方案的详述

[0109] 本发明尤其提供具有编码程序性细胞死亡1 (Pdc1) 基因的人源化遗传物质的改进的和/或工程化的非人动物，其用于确定Pdc1调节剂（例如抗-PD-1抗体）用于癌症治疗的治疗功效，以及T细胞应答和信号转导中的测定。可想到的是，此类非人动物在确定PD-1调节剂的治疗功效及其用于PD-1阻断的潜力方面提供改进。因此，本发明特别可用于开发抗-PD-1疗法，所述疗法用于治疗多种癌症，以及用于增强免疫应答以治疗和/或消除非人动物的病毒感染。具体地讲，本发明包括对鼠Pdc1基因的人源化，其导致人源化PD-1蛋白质在非人动物细胞表面上的表达。此类人源化PD-1蛋白质能够提供用于确定抗-PD-1治疗剂促进抗肿瘤免疫应答的功效的人PD-1<sup>+</sup>细胞的来源。在一些实施方案中，本发明的非人动物经由阻断通过非人动物细胞表面上表达的人源化PD-1蛋白质的PD-1信号传导而展示出增强的免疫应答。在一些实施方案中，人源化PD-1蛋白质具有与人PD-1蛋白质的全部或部分的N端免疫球蛋白V结构域对应的序列。在一些实施方案中，人源化PD-1蛋白质具有与鼠PD-1蛋白质的胞内尾部对应的序列；在一些实施方案中，具有与鼠PD-1蛋白质的跨膜结构域和胞内尾部对应的序列。在一些实施方案中，人源化PD-1蛋白质具有与人PD-1蛋白质的氨基酸残基21-170（或26-169、27-169、或27-145、或35-145）对应的序列。在一些实施方案中，本发明的非人动物包含含有来自非人动物和异源物种（例如人）的遗传物质的内源Pdc1基因。在一些实施方案中，本发明的非人动物包含人源化Pdc1基因，其中所述人源化Pdc1基因包含人PDCD1基因的外显子2和全部或部分的外显子3。在某些实施方案中，本发明的非人动物包含人源化Pdc1基因，其中所述人源化Pdc1基因包括883bp的与外显子2对应的人PDCD1基因和人PDCD1基因的前71bp的外显子3（即，编码柄部）。

[0110] 在下面的章节中详细地描述本发明的各个方面。章节的使用不意味着限制本发明。每一个章节可适用于本发明的任何方面。在本申请中，除非另有说明，“或”的使用意指“和/或”。

[0111] 程序性细胞死亡1 (Pdc1) 基因

[0112] Pdc1（也称为CD279）最初被发现是作为发生细胞凋亡的T细胞杂交瘤中的被上调基因（Ishida, Y. 等人（1992）EMBO J. 11（11）：3887-3895）。Pdc1基因由编码PD-1的5个外显

子组成,PD-1为I型膜蛋白质(称为PD-1),其包括N端免疫球蛋白V(IgV)结构域、柄部(长度为~20个氨基酸)、跨膜结构域和同时包含免疫受体酪氨酸基抑制基序(ITIM)和免疫受体酪氨酸基转换基序(ITSM)的胞内尾部。PD-1在许多细胞类型上表达,这些细胞类型例如B细胞、树突状细胞、活化的单核细胞、天然杀伤(NK)细胞和活化的T细胞(Keir,M.E.,等人(2008) *Annu.Rev.Immunol.* 26:677-704)。PD-1的各种剪接变体已被报道并且基于缺乏何种外显子而变化(Nielsen,C.等人(2005) *Cell.Immunol.* 235:109-116)。实际上,已观察到某些剪接变体为自体免疫疾病的致病因子(Wan,B.等人(2006) *J.Immunol.* 177(12):8844-8850)。另外,已报道Pdc1缺陷小鼠可发展出自体免疫病症(Nishimura,H.等人(1998) *Intern.Immunol.* 10(10):1563-1572;Nishimura,H.等人(1999) *Immunity* 11:141-151;Nishimura,H.等人(2001) *Science* 291:319-322),所述自体免疫病症导致将PD-1固化为用于防止自体免疫疾病发展的活化的淋巴细胞的负调节物。有意思的是,已发现肿瘤利用PD-1信号传导来规避免疫系统的监督。因此,当前在探索将PD-1及其配体中的至少一者(即,PD-L1)作为癌症疗法的靶标,方式为经由PD-1阻断来促进肿瘤微环境中的抗肿瘤活性(参见例如Pedoeem,A.等人(2014) *Clin.Immunol.* 153:145-152;以及Philips,G.K.和Atkins,M.(2014) *Intern.Immunol.* 8页)。

[0113] 需要开发用于未来癌症治疗的可行靶向疗法来更充分且详细地理解PD-1介导的功能和PD-1途径。

[0114] Pdc1和PD-1序列

[0115] 示例性鼠、人和人源化Pdc1及PD-1序列在图8中示出。用于非人Pdc1基因的人源化的示例性人核酸序列也在图8中示出。

[0116] 人源化Pdc1非人动物

[0117] 提供非人动物,其在非人动物的细胞表面上表达人源化PD-1蛋白质,所述人源化PD-1蛋白质是通过对编码PD-1蛋白质的非人动物的内源基因座(例如Pdc1基因座)进行遗传修饰来产生。本文描述的合适的例子包括啮齿动物,具体地讲,小鼠。

[0118] 在一些实施方案中,人源化Pdc1基因包含来自异源物种(例如人)的遗传物质,其中所述人源化Pdc1基因编码PD-1蛋白质,所述PD-1蛋白质包含来自异源物种的遗传物质的被编码部分。在一些实施方案中,人源化本发明的Pdc1基因包含异源物种的基因组DNA,所述基因组DNA编码在细胞质膜表面上表达的PD-1蛋白质的胞外部分。提供用于制备包含所述人源化Pdc1基因的非人动物、非人胚胎和细胞的非人动物、胚胎、细胞和靶向构建体。

[0119] 在一些实施方案中,内源Pdc1基因被缺失。在一些实施方案中,内源Pdc1基因被改变,其中内源Pdc1基因的一部分被异源序列(例如全部或部分的人PDCD1序列)替换。在一些实施方案中,所有或基本上所有的内源Pdc1基因被异源基因(例如人PDCD1基因)替换。在一些实施方案中,异源Pdc1基因的一部分插入内源非人Pdc1基因的内源Pdc1基因座处。在一些实施方案中,异源基因为人基因。在一些实施方案中,对内源Pdc1基因的两个拷贝之一进行修饰或人源化,从而产生相对于人源化Pdc1基因杂合的非人动物。在其他实施方案中,提供针对人源化Pdc1基因杂合的非人动物。

[0120] 在多个方面,非人动物在内源非人Pdc1基因座处包含全部或部分的人PDCD1基因。因此,此类非人动物可被描述为具有异源Pdc1基因。内源Pdc1基因座处的被替换的、插入的、修饰的或改变的Pdc1基因或从此类基因表达的蛋白质可使用多种方法(包括例如

PCR、Western印迹、Southern印迹、限制性片段长度多态性 (RFLP) 或等位基因的获得或丢失测定) 来检测。在一些实施方案中, 非人动物相对于人源化Pdccl1基因是杂合的。

[0121] 在多个实施方案中, 根据本发明的人源化Pdccl1基因包括具有第二外显子的Pdccl1基因, 所述第二外显子具有序列与图8的人PDCCL1基因中呈现的第二外显子至少50% (例如50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多) 相同的序列。

[0122] 在多个实施方案中, 根据本发明的人源化Pdccl1基因包括具有第二外显子的Pdccl1基因, 所述第二外显子具有图8的人PDCCL1基因中呈现的第二外显子基本上相同的序列。

[0123] 在多个实施方案中, 根据本发明的人源化Pdccl1基因包括具有第二外显子的Pdccl1基因, 所述第二外显子具有图8的人PDCCL1基因中呈现的第二外显子相同的序列。

[0124] 在多个实施方案中, 根据本发明的人源化Pdccl1基因包括具有第三外显子的Pdccl1基因, 所述第三外显子具有与图8的人源化Pdccl1mRNA序列中呈现的第三外显子至少50% (例如50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多) 相同的序列。

[0125] 在多个实施方案中, 根据本发明的人源化Pdccl1基因包括具有第三外显子的Pdccl1基因, 所述第三外显子具有与图8的人源化Pdccl1mRNA序列中呈现的第三外显子基本上相同的序列。

[0126] 在多个实施方案中, 根据本发明的人源化Pdccl1基因包括具有第三外显子的Pdccl1基因, 所述第三外显子具有与图8的人源化Pdccl1mRNA序列中呈现的第三外显子相同的序列。

[0127] 在多个实施方案中, 根据本发明的人源化Pdccl1基因包括Pdccl1基因, 所述Pdccl1基因包含与SEQ ID NO:21或SEQ ID NO:23至少50% (例如50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多) 相同的序列。

[0128] 在多个实施方案中, 根据本发明的人源化Pdccl1基因包括Pdccl1基因, 所述Pdccl1基因包含与SEQ ID NO:21或SEQ ID NO:23基本上相同的序列。

[0129] 在多个实施方案中, 根据本发明的人源化Pdccl1基因包括Pdccl1基因, 所述Pdccl1基因包含与SEQ ID NO:21或SEQ ID NO:23相同的序列。

[0130] 在多个实施方案中, 根据本发明的人源化Pdccl1基因包括具有第二外显子和部分第三外显子的Pdccl1基因, 所述第二外显子和部分第三外显子各自具有与图8的人PDCCL1基因中呈现的第二外显子和部分第三外显子至少50% (例如50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多) 相同的序列。

[0131] 在多个实施方案中, 根据本发明的人源化Pdccl1基因包括具有第一外显子、第四外显子和第五外显子的Pdccl1基因, 所述第一、第四和第五外显子各自具有与图8的小鼠Pdccl1基因中呈现的第一外显子、第四外显子和第五外显子至少50% (例如50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多) 相同的序列。

[0132] 在多个实施方案中, 根据本发明的人源化Pdccl1基因包括具有第一外显子、部分第三外显子、第四外显子和第五外显子的Pdccl1基因, 所述第一外显子、部分第三外显子、第四

外显子和第五外显子各自具有与图8的小鼠Pdcd1基因中呈现的第一外显子、部分第三外显子、第四外显子和第五外显子至少50% (例如50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多) 相同的序列。

[0133] 在多个实施方案中,根据本发明的人源化Pdcd1基因包括具有5' 非翻译区和3' 非翻译区的Pdcd1基因,所述5' 非翻译区和3' 非翻译区各自具有与图8的小鼠Pdcd1基因中呈现的5' 非翻译区和3' 非翻译区至少50% (例如50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多) 相同的序列。

[0134] 在多个实施方案中,根据本发明的人源化Pdcd1基因包括具有核苷酸编码序列(例如cDNA序列)的Pdcd1基因,所述核苷酸编码序列与图8的人源化Pdcd1核苷酸编码序列中呈现的核苷酸编码序列至少50% (例如50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多) 相同。

[0135] 在多个实施方案中,根据本发明的人源化Pdcd1mRNA序列包含与图8中呈现的人源化mRNA序列的至少50% (例如50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多) 相同的序列。

[0136] 在多个实施方案中,根据本发明的人源化Pdcd1基因编码具有氨基酸序列的PD-1多肽,所述氨基酸序列与图8的PD-1多肽序列中呈现的氨基酸序列至少50% (例如50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多) 相同。

[0137] 在多个实施方案中,由本发明的非人动物产生的人源化PD-1蛋白质具有胞外部分,所述胞外部分具有与图8中呈现的人PD-1蛋白质的胞外部分至少50% (例如50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多) 相同的氨基酸序列。

[0138] 在多个实施方案中,由本发明的非人动物产生的人源化PD-1蛋白质具有胞外部分,所述胞外部分包含与图8的人或人源化PD-1蛋白质中呈现的氨基酸残基21-170至少50% (例如50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多) 相同的氨基酸序列。

[0139] 在多个实施方案中,由本发明的非人动物产生的人源化PD-1蛋白质具有胞外部分,所述胞外部分包含与图8的人或人源化PD-1蛋白质中呈现的氨基酸残基21-170基本上相同的氨基酸序列。

[0140] 在多个实施方案中,由本发明的非人动物产生的人源化PD-1蛋白质具有胞外部分,所述胞外部分包含与图8的人或人源化PD-1蛋白质中呈现的氨基酸残基21-170相同的氨基酸序列。

[0141] 在多个实施方案中,由本发明的非人动物产生的人源化PD-1蛋白质具有胞外部分,所述胞外部分包含与图8的人或人源化PD-1蛋白质中呈现的氨基酸残基26-169至少50% (例如50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多) 相同的氨基酸序列。

[0142] 在多个实施方案中,由本发明的非人动物产生的人源化PD-1蛋白质具有胞外部分,所述胞外部分包含与图8的人或人源化PD-1蛋白质中呈现的氨基酸残基26-169基本上相同的氨基酸序列。



[0143] 在多个实施方案中,由本发明的非人动物产生的人源化PD-1蛋白质具有胞外部分,所述胞外部分包含与图8的人或人源化PD-1蛋白质中呈现的氨基酸残基26-169相同的氨基酸序列。

[0144] 在多个实施方案中,由本发明的非人动物产生的人源化PD-1蛋白质具有胞外部分,所述胞外部分包含与图8的人或人源化PD-1蛋白质中呈现的氨基酸残基27-169至少50% (例如50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多) 相同的氨基酸序列。

[0145] 在多个实施方案中,由本发明的非人动物产生的人源化PD-1蛋白质具有胞外部分,所述胞外部分包含与图8的人或人源化PD-1蛋白质中呈现的氨基酸残基27-169基本上相同的氨基酸序列。

[0146] 在多个实施方案中,由本发明的非人动物产生的人源化PD-1蛋白质具有胞外部分,所述胞外部分包含与图8的人或人源化PD-1蛋白质中呈现的氨基酸残基27-169相同的氨基酸序列。

[0147] 在多个实施方案中,由本发明的非人动物产生的人源化PD-1蛋白质具有胞外部分,所述胞外部分包含与图8的人或人源化PD-1蛋白质中呈现的氨基酸残基27-145至少50% (例如50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多) 相同的氨基酸序列。

[0148] 在多个实施方案中,由本发明的非人动物产生的人源化PD-1蛋白质具有胞外部分,所述胞外部分包含与图8的人或人源化PD-1蛋白质中呈现的氨基酸残基27-145基本上相同的氨基酸序列。

[0149] 在多个实施方案中,由本发明的非人动物产生的人源化PD-1蛋白质具有胞外部分,所述胞外部分包含与图8的人或人源化PD-1蛋白质中呈现的氨基酸残基27-145相同的氨基酸序列。

[0150] 在多个实施方案中,由本发明的非人动物产生的人源化PD-1蛋白质具有胞外部分,所述胞外部分包含与图8的人或人源化PD-1蛋白质中呈现的氨基酸残基35-145至少50% (例如50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多) 相同的氨基酸序列。

[0151] 在多个实施方案中,由本发明的非人动物产生的人源化PD-1蛋白质具有胞外部分,所述胞外部分包含与图8的人或人源化PD-1蛋白质中呈现的氨基酸残基35-145基本上相同的氨基酸序列。

[0152] 在多个实施方案中,由本发明的非人动物产生的人源化PD-1蛋白质具有胞外部分,所述胞外部分包含与图8的人或人源化PD-1蛋白质中呈现的氨基酸残基35-145相同的氨基酸序列。

[0153] 在多个实施方案中,由本发明的非人动物产生的人源化PD-1蛋白质具有N端免疫球蛋白V结构域,所述N端免疫球蛋白V结构域具有与图8中呈现的人或人源化PD-1蛋白质的N端免疫球蛋白V结构域至少50% (例如50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多) 相同的氨基酸序列。

[0154] 在多个实施方案中,由本发明的非人动物产生的人源化PD-1蛋白质具有N端免疫球蛋白V结构域,所述N端免疫球蛋白V结构域具有与图8的人或人源化PD-1蛋白质中呈现的

N端免疫球蛋白V结构域基本上相同的氨基酸序列。

[0155] 在多个实施方案中,由本发明的非人动物产生的人源化PD-1蛋白质具有N端免疫球蛋白V结构域,所述N端免疫球蛋白V结构域具有与图8的人或人源化PD-1蛋白质中呈现的N端免疫球蛋白V结构域相同的氨基酸序列。

[0156] 在多个实施方案中,由本发明的非人动物产生的人源化PD-1蛋白质具有跨膜结构域,所述跨膜结构域具有与图8中呈现的小鼠PD-1蛋白质的跨膜结构域至少50%(例如50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多)相同的序列。

[0157] 在多个实施方案中,由本发明的非人动物产生的人源化PD-1蛋白质具有胞内尾部,所述胞内尾部具有与图8中呈现的小鼠PD-1蛋白质的胞内尾部至少50%(例如50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多)相同的序列。

[0158] 在多个实施方案中,由本发明的非人动物产生的人源化PD-1蛋白质具有与图8的人PD-1蛋白质中呈现的氨基酸残基27-169(或26-169)至少50%(例如50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多)相同的氨基酸序列。

[0159] 在多个实施方案中,由本发明的非人动物产生的人源化PD-1蛋白质具有与图8的人PD-1蛋白质中呈现的氨基酸残基27-169(或26-169)基本上相同的氨基酸序列。

[0160] 在多个实施方案中,由本发明的非人动物产生的人源化PD-1蛋白质具有与图8的人PD-1蛋白质中呈现的氨基酸残基27-169(或26-169)相同的氨基酸序列。

[0161] 在多个实施方案中,由本发明的非人动物产生的人源化PD-1蛋白质具有与图8中呈现的人源化PD-1蛋白质的氨基酸序列至少50%(例如50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多)相同的氨基酸序列。

[0162] 在多个实施方案中,由本发明的非人动物产生的人源化PD-1蛋白质具有与图8中呈现的人源化PD-1蛋白质的氨基酸序列基本上相同的氨基酸序列。

[0163] 在多个实施方案中,由本发明的非人动物产生的人源化PD-1蛋白质具有与图8中呈现的人源化PD-1蛋白质的氨基酸序列相同的氨基酸序列。

[0164] 提供制备非人动物的组合物和方法,所述非人动物表达人源化PD-1蛋白质,包括特定的多态性形式或等位变体(例如单氨基酸差异)或可选的剪接变体,包括用于制备从人启动子和人调节序列表达此类蛋白质的非人动物的组合物和方法。在一些实施方案中,还提供用于制备从内源启动子和内源调节序列表达此类蛋白质的非人动物的组合物和方法。在某些实施方案中,内源启动子和内源调节序列为内源啮齿动物启动子和内源啮齿动物调节序列。所述方法包括将编码全部或部分的人PD-1蛋白质的遗传物质插入非人动物基因组中对应于内源Pdc1基因的精确位置,由此产生表达全部或部分的人PD-1蛋白质的人源化Pdc1基因。在一些实施方案中,所述方法包括将对应于人PDC1基因的外显子2和全部或部分的外显子3的基因组DNA插入非人动物中,从而产生编码PD-1蛋白质的人源化基因,所述PD-1蛋白质包含含有由插入的外显子编码的氨基酸的人部分。

[0165] 在适当时,编码全部或部分的人(或人源化)PD-1蛋白质的遗传物质或多核苷酸序

列的编码区可经修饰以包括被优化来从非人动物中的细胞表达的密码子(例如,参见美国专利No.5,670,356和No.5,874,304)。密码子优化序列为合成序列,并且优选地编码与非密码子优化亲代多核苷酸所编码的多肽相同的多肽(或具有与全长多肽基本上相同活性的全长多肽的生物活性片段)。在一些实施方案中,编码全部或部分的人(或人源化)PD-1蛋白质的遗传物质的编码区可包括用于针对特定细胞类型(例如啮齿动物细胞)优化密码子用途的改变的序列。例如,可对待插入非人动物(例如啮齿动物)的内源Pdc1基因的与人PDCD1基因的外显子2和部分外显子3(例如71bp)对应的基因组DNA的密码子进行优化以在非人动物的细胞中表达。此序列可描述为密码子优化序列。

[0166] 人源化PD-1基因法采用相对极小的内源基因修饰,并在非人动物中产生天然的PD-1介导的信号转导,在多个实施方案中,因为Pdc1序列的基因组序列是在单一片段中修饰并因此通过包括必需的调节序列而保持正常的功能性。因此,在此类实施方案中,PD-1基因修饰不会影响其他周围的基因或其他内源Pdc1-相互作用基因(例如PD-L1、PD-L2等)。另外,在多个实施方案中,修饰不会影响功能性PD-1跨膜蛋白在胞膜上的组装,并经由结合和随后通过不受修饰影响的蛋白质胞质部分的信号转导来维持正常的效应子功能。

[0167] 内源鼠Pdc1基因和人PDCD1基因的基因组组织的示意图(未按比例绘制)提供于图1中。使用包含人PDCD1基因的外显子2和部分外显子3的基因组片段来使内源鼠Pdc1基因人源化的示例性方法提供于图2中。如图所示,将包含人PDCD1基因的外显子2和部分外显子3(例如前71bp)的883bp基因组DNA片段通过靶向构建体插入内源鼠Pdc1基因座的900bp序列中。883bp人DNA片段可直接从人DNA克隆或从来源序列(例如Genbank登录号NM\_005018.2)合成。此基因组DNA包括编码人PD-1蛋白质的负责配体连接的基本上全部的胞外部分(例如氨基酸残基27-169或26-169)的基因部分。

[0168] 在内源Pdc1基因座上具有人源化Pdc1基因的非人动物(例如小鼠)可通过本领域已知的任何方法制备。例如,可制备引入具有可选择标志基因的全部或部分的人Pdc1基因的靶向载体。图2示出包含小鼠基因组的内源Pdc1基因座的靶向载体,所述小鼠基因组包含883bp人DNA片段的插入物,所述人DNA片段包括人PDCD1基因的外显子2和前71bp的外显子3。如图所示,靶向构建体包含含有内源鼠Pdc1基因的外显子2上游的序列(~61.7Kb)的5'同源臂、接着包含药物选择盒(例如两侧侧接1oxP序列的新霉素抗性基因;~5Kb)、含有人Pdc1基因的外显子2和前71bp的外显子3的基因组DNA片段(883bp),以及包含内源鼠外显子3的剩余序列(即,编码PD-1蛋白质的跨膜部分的部分)、内源鼠Pdc1基因的外显子4和外显子5(~84Kb)的3'同源臂。靶向构建体包含自删除的药物选择盒(例如侧接1oxP序列的新霉素抗性基因;参见美国专利No.8,697,851、No.8,518,392和No.8,354,389,其全部以引用方式并入本文)。在胚胎干细胞中进行电穿孔时,形成经修饰的内源Pdc1基因,其将900bp的内源野生型Pdc1基因交换为包含于靶向载体中的883bp的人PDCD1基因(即,外显子2和前71bp的外显子3)。形成人源化Pdc1基因导致产生表达人源化PD-1蛋白质的细胞或非人动物,其包含由883bp人DNA片段(即,人PDCD1基因的外显子2和71bp的外显子3)编码的氨基酸。以发育依赖的方式移除药物选择盒,即,从其种系细胞含有上述人源化Pdc1基因的小鼠衍生的子代将在发育过程中从分化的细胞脱落可选择标志物(参见图2底部)。

[0169] 尽管在文中广泛地论述人源化Pdc1基因应用于小鼠(即,具有编码PD-1蛋白质的Pdc1基因的小鼠,所述PD-1蛋白质包括人部分和小鼠部分)的实施方案,但也提供包含人

源化Pdcd1基因的其他非人动物。在一些实施方案中,此类非人动物包含有效连接至啮齿动物Pdcd1启动子的人源化Pdcd1基因。在一些实施方案中,此类非人动物包含人源化Pdcd1基因,其有效连接至内源Pdcd1启动子;在一些实施方案中,有效连接至内源啮齿动物Pdcd1启动子。在一些实施方案中,此类非人动物从内源基因座表达人源化PD-1蛋白质,其中所述人源化PD-1蛋白质包含人PD-1蛋白质的氨基酸残基21-170(或26-169、或27-169、27-145或35-145)。此类非人动物包括任何那些可经遗传修饰以表达如文中所述的PD-1蛋白质的动物,包括例如哺乳动物,例如小鼠、大鼠、兔子、猪、牛(例如奶牛、公牛、水牛)、鹿、绵羊、山羊、鸡、猫、狗、貂、灵长类动物(例如狨猴、猕猴)等。例如,对于那些适当的可经遗传修饰的ES细胞不容易获得的非人动物,采用其他方法来制备包含遗传修饰的非人动物。此类方法包括例如修饰非ES细胞基因组(例如成纤维细胞或诱导的多能细胞)并利用体细胞核转移(SCNT)来将遗传修饰的基因组转移至合适的细胞,例如去核卵母细胞,以及在适于形成胚胎的条件下在非人动物中孕育所述修饰的细胞(例如修饰的卵母细胞)。

[0170] 用于修饰非人动物基因组(例如猪、牛、啮齿动物、鸡等基因组)的方法包括,例如采用锌指核酸酶(ZFN)或类转录活化因子效应子核酸酶(TALEN)来修饰基因组以包括人源化Pdcd1基因。

[0171] 在一些实施方案中,本发明的非人动物为哺乳动物。在一些实施方案中,本发明的非人动物为小型哺乳动物,例如超家族跳鼠总科或鼠总科的哺乳动物。在一些实施方案中,本发明的经遗传修饰的动物为啮齿动物。在一些实施方案中,本发明的啮齿动物选自小鼠、大鼠和仓鼠。在一些实施方案中,本发明的啮齿动物选自超家族鼠总科。在一些实施方案中,本发明的经遗传修饰的动物来自选自下列的家族:丽仓鼠科(例如,类小鼠的仓鼠)、仓鼠科(例如,仓鼠、新世界大鼠和小鼠、田鼠)、鼠科(真小鼠和大鼠、沙鼠、棘鼠、冠鼠)、马岛鼠科(攀鼠、岩鼠、具尾大鼠(with-tailed rat)、马达加斯加大鼠和小鼠)、刺山鼠科(例如,刺棒睡鼠)和鼯形鼠科(例如,鼯鼠、竹鼠和鼯鼠)。在某些实施方案中,本发明的经遗传修饰的啮齿动物选自真小鼠或大鼠(鼠科)、沙鼠、棘鼠和冠鼠。在某些实施方案中,本发明的经遗传修饰的小鼠是来自鼠科的成员。在一些实施方案中,本发明的非人动物为啮齿动物。在某些实施方案中,本发明的啮齿动物选自小鼠和大鼠。在一些实施方案中,本发明的非人动物为小鼠。

[0172] 在一些实施方案中,本发明的非人动物为啮齿动物,所述啮齿动物为选自下列的C57BL品系的小鼠:C57BL/A、C57BL/An、C57BL/GrFa、C57BL/KaLwN、C57BL/6、C57BL/6J、C57BL/6ByJ、C57BL/6NJ、C57BL/10、C57BL/10ScSn、C57BL/10Cr和C57BL/01a。在某些实施方案中,本发明的小鼠为选自下列品系的129品系:129P1、129P2、129P3、129X1、129S1(例如129S1/SV、129S1/SvIm)、129S2、129S4、129S5、129S9/SvEvH、129/SvJae、129S6(129/SvEvTac)、129S7、129S8、129T1、129T2(参见例如,Festing等人,1999,Mammalian Genome 10:836;Auerbach,W.等人,2000,Biotechniques 29(5):1024-1028,1030,1032)。在某些实施方案中,本发明的经遗传修饰的小鼠是上述129品系和前述C57BL/6品系的混合物。在某些实施方案中,本发明的小鼠是上述129品系的混合物,或前述BL/6品系的混合物。在某些实施方案中,如本文所述的混合物的129品系为129S6(129/SvEvTac)品系。在一些实施方案中,本发明的小鼠为BALB品系,例如BALB/c品系。在一些实施方案中,本发明的小鼠为BALB品系和另一种上述品系的混合物。

[0173] 在一些实施方案中,本发明的非人动物为大鼠。在某些实施方案中,本发明的大鼠选自Wistar大鼠、LEA品系、Sprague Dawley品系、Fischer品系、F344、F6和Dark Agouti。在某些实施方案中,本文所述的大鼠品系为选自Wistar、LEA、Sprague Dawley、Fischer、F344、F6和Dark Agouti的两个或更多个品系的混合物。

[0174] 采用具有人源化Pdcd1基因的非人动物的方法

[0175] 对PD-1功能的研究采用了多种Pdcd1突变体或转基因非人动物(例如参见Nishimura,H.等人(1998) Intern.Immunol.10(10):1563-1572;Nishimura,H.等人(1999) Immunity 11:141-151;Nishimura,H.等人(2001) Science 291:319-322;Iwai,Y.等人(2004) Intern.Immunol.17(2):133-144;Keir,M.E.等人(2005) J.Immunol.175:7372-7379;Keir,M.E.等人(2007) J.Immunol.179:5064-5070;Carter,L.L.等人(2007) J.Neuroimmunol.182:124-134;Chen,L.等人(2007) Europ.Soc.Organ Transplant.21:21-29;Okazaki,T.等人(2011) J.Exp.Med.208(2):395-407;U.S.Patent No.7,414,171;和欧洲专利No.1 334 659B1;这些参考文献以引用方式并入本文)。此类突变体和转基因动物已成功用于确定各种细胞过程的PD-1表达、功能和调节的分子层面。然而,它们并非不受限制。例如,通过将人PD-1cDNA敲入小鼠Pdcd1基因的外显子1中而产生的PD-1缺陷小鼠甚至在用PMA刺激后也不表达人PD-1(Carter,L.L.等人,上述)。另外,不同遗传背景的PD-1突变动物之间的相当多的表型差异使研究复杂化,尤其是试图将多种功能和/或调节活性分配给PD-1时。仍然形成了过表达PD-1的其他转基因动物(Chen,L.等人,上述)。此类动物已显示出不同的转基因表达模式,这可合理地归因于构建体设计。另外,由于使用相同来源遗传物质(即,小鼠),因此PD-1过表达可由于可能的转基因位置效应而对应于内源PD-1而非转基因PD-1。虽然PD-1转基因小鼠已被证明在阐明一些PD-1介导的生物功能中是有用的,但它们已展示出所获得的结果的可变性,这至少部分地基于用于产生它们的不同方法。因此,利用PD-1介导的生物学的当前体内系统是不完善的。PD-1介导的生物功能和信号传导途径的分子层面的潜力在转基因小鼠中尚未被完全利用。

[0176] 本发明的非人动物提供表达人(或人源化)PD-1的生物材料(例如细胞)的改进的体内系统和来源,其对于多种测定是有用的。在多个实施方案中,本发明的非人动物用于开发靶向PD-1和/或调解PD-1信号传导(例如干扰与PD-L1和/或PD-L2的相互作用)的治疗剂。在多个实施方案中,本发明的小鼠用于鉴定、筛选和/或开发结合人PD-1的候选治疗剂(例如抗体)。在多个实施方案中,在多个实施方案中,本发明的非人动物系用于筛选和开发阻断人PD-1与人PD-L1和/或人PD-L2相互作用的治疗剂(例如抗体)。在多个实施方案中,本发明的非人动物用于确定人源化PD-1的拮抗剂和/或激动剂在本文所述的非人动物的细胞表面上的结合模式;在一些实施方案中,本发明的非人动物用于确定结合人PD-1的一种或多种候选治疗抗体的一个或多个表位。

[0177] 在多个实施方案中,本发明的非人动物用于确定抗-PD-1抗体的药动学性质。在多个实施方案中,将一种或多种本发明的非人动物和一种或多种对照或参照非人动物暴露于多种剂量(例如0.1mg/kg、0.2mg/kg、0.3mg/kg、0.4mg/kg、0.5mg/kg、1mg/kg、2mg/kg、3mg/kg、4mg/kg、5mg/mg、7.5mg/kg、10mg/kg、15mg/kg、20mg/kg、25mg/kg、30mg/kg、40mg/kg或50mg/kg或更多)的一种或多种候选治疗性抗-PD-1抗体。候选治疗性抗体可经由各种所需的施用途径(包括肠胃外和非肠胃外施用途径)来给药。肠胃外途径包括例如静脉内、动脉

内、门静脉内、肌内、皮下、腹膜内、脊柱内、鞘内、脑室内、颅内、胸膜内或其他注射途径。非肠胃外途径包括例如经服、经鼻、经皮、经肺、经直肠、经颊面、经阴道、经眼。施用还可通过连续输注、局部施用、从植入物(凝胶、膜等)持续释放和/或静脉内注射来进行。在多个时间点(例如0hr、6hr、1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天或最多30或更多天)从非人动物(人源化和对照组)分离血液。可使用得自如文中所述的非人动物的样本进行各种测定以确定施用的候选治疗性抗体的药动学性质,包括但不限于总IgG、抗-治疗性抗体应答、凝集等。

[0178] 在多个实施方案中,本发明的非人动物用于测量阻断或调解PD-1信号传导的治疗效果和细胞变化对于基因表达的效应。在多个实施方案中,将本发明的非人动物或从其分离的细胞暴露于与非人动物细胞表面上的人源化PD-1蛋白质(或PD-1蛋白质的人部分)结合的候选治疗剂,在随后一段时间后,分析对PD-1-依赖过程,例如粘附、凋亡、细胞因子产生、发炎、增殖、自体耐受性和病毒感染(或应答)的效应。

[0179] 本发明的非人动物表达人源化PD-1蛋白质,因此可产生细胞、细胞系和细胞培养物以用作用于结合和功能测定的人源化PD-1的来源,例如用于PD-1拮抗剂或激动剂的结合和功能的测定,特别是在拮抗剂或激动剂对人PD-1序列或表位具有特异性,或可选地,对与人PD-L1和/或PD-L2相关联的PD-1序列或表位具有特异性的情况下。在多个实施方案中,与候选治疗性抗体结合的PD-1表位可使用分离自本发明非人动物的细胞来确定。在多个实施方案中,由本文所述的非人动物表达的人源化PD-1蛋白质可包含变体氨基酸序列。已报道了与自体免疫和传染病相关联的变体人PD-1蛋白质(例如多态性(例如参见Lee, Y.H.等人(2014) *Z. Rheumatol.* PMID:24942602; Mansur, A.等人(2014) *J. Investig. Med.* 62 (3) :638-643; Nasi, M.等人(2013) *Intern. J. Infect. Dis.* 17:e845-e850; Piskin, I.E.等人(2013) *Neuropediatrics* 44 (4) :187-190; Carter, L.L.等人(2007) *J. Neuroimmunol.* 182 (1-2) :124-134; Wan, B.等人(2006) *J. Immunol.* 177 (12) :8844-8850)。示例性人PD-1变体包括NCBI的SNP GeneView网页中所列出的那些并且汇总于表3中。在多个实施方案中,本发明的非人动物表达人源化PD-1蛋白质变体。在多个实施方案中,变体在与配体结合相关联的氨基酸位置上具有多态性。在多个实施方案中,本发明的非人动物用于通过与人PD-1的多态性变体的相互作用来确定配体结合的效应。在某些实施方案中,本发明的非人动物表达表3中呈现的人PD-1变体。

[0180] 表3

[0181]

染色体 位置	mRNA 位置	变体编号	等位基因	氨基酸	密码子位 置	氨基酸位置
241851110	883	rs372765600	A	Gln [Q]	2	272
			G	Arg [R]	2	272
	875	rs368411538	T	Asp [D]	3	269
			C	Asp [D]	3	269
	872	rs2227981	A	Ala [A]	3	268
			C	Ala [A]	3	268
			G	Ala [A]	3	268
			T	Ala [A]	3	268
	858	rs146642159	T	Cys [C]	1	264
			C	Arg [R]	1	264

[0182]	241851138	855	rs143359677	A	Thr [T]	1	263
				G	Ala [A]	1	263
	241851160	833	rs141228784	T	Ser [S]	3	255
				C	Ser [S]	3	255
	241851163	830	rs200434733	C	Pro [P]	3	254
				T	Pro [P]	3	254
	241851171	822	rs201961957	A	Ile [I]	1	252
				G	Val [V]	1	252
	241851188	805	rs201540918	T	Met [M]	2	246
				C	Thr [T]	2	246
	241851190	803	rs201481671	A	Gln [Q]	3	245
				G	Gln [Q]	3	245
	241851210	783	rs137861407	A	Met [M]	1	239
				G	Val [V]	1	239
	241851220	773	rs370462869	A	Pro [P]	3	235
				G	Pro [P]	3	235
	241851237	756	rs147213978	C	Arg [R]	1	230
				T	Trp [W]	1	230
	241851264	729	rs373940258	A	Met [M]	1	221
				G	Val [V]	1	221
	241851274	719	rs373831349	G	Pro [P]	3	217
				T	Pro [P]	3	217
	241851279	714	rs376257658	A	Met [M]	1	216
				G	Val [V]	1	216
	241851281	712	rs2227982	T	Val [V]	2	215
				C	Ala [A]	2	215
	241851954	690	rs148456597	A	Thr [T]	1	208
				C	Pro [P]	1	208
	241851961	683	rs146821282	G	Thr [T]	3	205
				T	Thr [T]	3	205
				C	Thr [T]	3	205
	241852204	654	rs144217487	A	Thr [T]	1	196
				G	Ala [A]	1	196
	241852205	653	rs141119263	T	Ala [A]	3	195
				C	Ala [A]	3	195
	241852209	649	rs200312345	A	Gln [Q]	2	194
				G	Arg [R]	2	194
	241852258	600	rs55667829	T	Leu [L]	1	178
				C	Leu [L]	1	178
	241852271	587	rs377191240	T	Val [V]	3	173
				C	Val [V]	3	173
	241852310	548	rs370660750	G	Pro [P]	3	160



			C	Pro [P]	3	160
241852644	481	rs138031190	A	Gln [Q]	2	138
			T	Leu [L]	2	138
241852658	467	rs374762232	A	Gln [Q]	3	133
			G	Gln [Q]	3	133
241852661	464	rs41400345	A	Ala [A]	3	132
			G	Ala [A]	3	132
241852691	434	rs367833850	T	Leu [L]	3	122
			C	Leu [L]	3	122
241852697	428	rs186074812	T	Thr [T]	3	120
			C	Thr [T]	3	120
241852715	410	rs141299049	A	Arg [R]	3	114
			G	Arg [R]	3	114
241852716	409	rs55679128	A	Gln [Q]	2	114
			G	Arg [R]	2	114
241852720	405	rs200323895	A	Thr [T]	1	113
			G	Ala [A]	1	113
241852729	396	rs190602950	A	Met [M]	1	110
			G	Val [V]	1	110
241852730	395	rs370268595	T	Ser [S]	3	109
			C	Ser [S]	3	109
[0183] 241852743	382	rs368009835	G	Gly [G]	2	105
			A	Asp [D]	2	105
241852746	379	rs138016578	A	His [H]	2	104
			G	Arg [R]	2	104
241852750	375	rs56124337	A	Arg [R]	1	103
			G	Gly [G]	1	103
241852751	374	rs55637807	T	Asn [N]	3	102
			C	Asn [N]	3	102
241852755	370	rs371902970	T	Leu [L]	2	101
			C	Pro [P]	2	101
241852788	337	rs144257658	T	Val [V]	2	90
			G	Gly [G]	2	90
241852808	317	rs55804130	T	Pro [P]	3	83
			C	Pro [P]	3	83
241852817	308	rs373755187	A	Ala [A]	3	80
			T	Ala [A]	3	80
			C	Ala [A]	3	80
241852860	265	rs28615468	C	Thr [T]	2	66
			A	Asn [N]	2	66
241852866	259	rs142434414	G	Gly [G]	2	64
			T	Val [V]	2	64

[0184]	241852877	248	rs181904226	A	Ser [S]	3	60
				G	Ser [S]	3	60
	241852892	233	rs55993679	T	Ser [S]	3	55
				C	Ser [S]	3	55
	241852904	221	rs373582646	G	Thr [T]	3	51
				C	Thr [T]	3	51
	241852910	215	rs141718335	T	Asn [N]	3	49
				C	Asn [N]	3	49
	241852922	203	rs374726495	T	Thr [T]	3	45
				C	Thr [T]	3	45
	241852928	197	rs147586902	C	Val [V]	3	43
				G	Val [V]	3	43
	241852930	195	rs368829632	A	Met [M]	1	43
				G	Val [V]	1	43
	241852951	174	rs373081859	G	Ala [A]	1	36
				A	Thr [T]	1	36
	241852952	173	rs41444844	G	Pro [P]	3	35
				C	Pro [P]	3	35
	241852974	151	rs56234260	T	Leu [L]	2	28
				C	Pro [P]	2	28
	241858780	127	rs368550965	A	Gln [Q]	2	20
				G	Arg [R]	2	20
	241858800	107	rs370111035	A	Ala [A]	3	13
				G	Ala [A]	3	13
	241858808	99	rs142544044	A	Ile [I]	1	11
				G	Val [V]	1	11

[0185] 来自本发明的非人动物的细胞可被分离并随时使用,或可在培养物中维持许多世代。在多个实施方案中,来自本发明的非人动物的细胞被永生,并在培养物中无限期维持(例如在连续培养中)。

[0186] 在多个实施方案中,本发明的细胞和/或非人动物用于各种免疫方案中以确定针对抗原的免疫应答中的PD-1介导的功能。在一些实施方案中,在本发明的非人动物中表征结合人(或人源化)PD-1或阻断人(或人源化)PD-1的一种或多种功能的候选治疗剂。合适的测量包括各种细胞测定、增殖测定、血清免疫球蛋白分析(例如,抗体滴度)、细胞毒性测定、配体-受体相互作用的表征(例如免疫沉淀测定)。在一些实施方案中,本发明的非人动物用于表征调节针对抗原的免疫应答的PD-1介导的功能。在一些实施方案中,抗原与自体免疫疾病、障碍或病症相关联。在一些实施方案中,抗原与炎性疾病、障碍或病症相关联。在一些实施方案中,抗原为测试抗原(例如,卵白蛋白或OVA)。在一些实施方案中,抗原为与需要治疗的一个或多个患者所罹患的疾病或病症相关联的靶标。

[0187] 在多个实施方案中,本发明的非人动物用于确定自身抗体产生的滴度的血清测定中,以用于测试靶向人PD-1的候选治疗剂的药物毒理学方面。在一些实施方案中,本发明的非人动物中的自身抗体产生由非人动物中诱发的一种或多种自体免疫疾病、障碍或病症引起。

[0188] 在多个实施方案中,本发明的非人动物用于利用一种或多种抗原进行攻击以确定

化合物或生物剂调节免疫应答(包括但不限于针对给定抗原的特异性T细胞依赖性和B细胞依赖性应答)的PD-1依赖性调节的治疗潜力。

[0189] 在多个实施方案中,本发明的细胞和/或非人动物用于存活和/或增殖测定(例如,采用B或T细胞)以筛选和开发调节人PD-1信号传导的候选治疗剂。PD-1的活化或丧失可在调节细胞增殖方面起到重要作用,并且PD-1的自体耐受性调节可由PD-1的胞外结构域的特异性表位活化所致,因此,可使用本发明的非人动物的细胞和/或如文中述的非人动物来鉴定、表征和开发候选PD-1调节剂(例如拮抗剂或激动剂)。在一些实施方案中,本发明的细胞和/或非人动物用于存活或死亡测定中,以确定在存在或不存在PD-1的情况下对特定细胞(例如癌细胞)的增殖和凋亡的效应。

[0190] 在多个实施方案中,本发明的细胞和/或非人动物用于异源(例如人)细胞或组织的异种移植,以确定对移植的人细胞或组织的生理(例如免疫)应答中的PD-1介导的功能。在一些实施方案中,在本发明的非人动物中表征结合或阻断人PD-1的一种或多种功能的候选治疗剂。合适的测量包括各种细胞测定、增殖测定、血清免疫球蛋白分析(例如,抗体滴度)、细胞毒性测定以及配体-受体相互作用的表征(免疫沉淀测定)。在一些实施方案中,本发明的非人动物用于表征调节针对抗原的免疫应答的PD-1介导的功能。在一些实施方案中,抗原与瘤相关联。在一些实施方案中,抗原与自体免疫疾病、障碍或病症相关联。在一些实施方案中,抗原与炎性疾病、障碍或病症相关联。在一些实施方案中,抗原为与需要治疗的一个或多个患者所罹患的疾病或病症相关联的靶标。

[0191] 在多个实施方案中,本发明的非人动物用于移植或过继转移实验,以确定化合物或生物剂对调节新淋巴细胞及其免疫功能的PD-1依赖性调节的治疗潜力。在多个实施方案中,本发明的非人动物移植有人T细胞;在一些实施方案中,原始T细胞;在一些实施方案中,活化的T细胞。

[0192] 在多个实施方案中,本发明的非人动物的细胞用于T细胞测定中,以确定化合物或生物剂对调节T细胞依赖性应答和功能的PD-1依赖性调节的治疗潜力。示例性T细胞测定包括但不限于ELISpot、胞内细胞因子染色、主要组织相容性复合体(MHC)限制性、病毒抑制测定、细胞毒性测定、增殖测定和调节性T细胞抑制测定。

[0193] 在多个实施方案中,本发明的非人动物的细胞用于细胞反式迁移(transmigration)测定中,以筛选和开发调节人PD-1的候选治疗剂。细胞反式迁移涉及细胞横跨内皮的迁移,并且反式迁移测定允许测量通过白细胞或肿瘤细胞与内皮的相互作用及其反式迁移。

[0194] 在多个实施方案中,本发明的非人动物的细胞用于肿瘤生长(增殖)测定中,以确定化合物或生物剂对调节PD-1依赖性调节和/或肿瘤细胞凋亡的治疗潜力。

[0195] 在多个实施方案中,本发明的非人动物的细胞用于细胞因子产生测定中,以确定化合物或生物剂对调节来自T细胞的细胞因子的PD-1依赖性调节的治疗潜力。在一些实施方案中,本发明的非人动物的细胞用于检测(和/或测量)胞内细胞因子释放,所述胞内细胞因子释放是由人源化PD-1与靶向人PD-1的药物或PD-1配体(例如PD-L1或PD-L2)的相互作用所导致。

[0196] 在多个实施方案中,在本发明的一种或多种非人动物中诱发自体免疫疾病、障碍或病症以提供体内系统,以确定化合物或生物剂对调节自体免疫疾病、障碍或病症的一种

或多种功能的PD-1依赖性调节的治疗潜力。可在本发明的一种或多种非人动物中诱发的示例性自体免疫疾病、障碍或病症包括糖尿病、实验性自体免疫脑脊髓炎(例如多发性硬化模型)、类风湿性关节炎和系统性红斑狼疮。

[0197] 本发明的非人动物提供用于分析和测试药物或疫苗的体内系统。在多个实施方案中,可将候选药物或疫苗递送至本发明的一种或多种非人动物中,接着监测所述非人动物,以确定一种或多种对所述药物或疫苗的免疫应答、此药物或疫苗的安全特性,或对疾病或病症的效应。在一些实施方案中,疫苗靶向病毒,例如人免疫缺陷病毒或肝炎病毒(例如HCV)。用于确定安全特性的示例性方法包括测量毒性、最佳剂量浓度、药物或疫苗的功效和可能的风险因素。此类药物或疫苗可在此类非人动物中进行改进和/或开发。

[0198] 本发明的非人动物提供用于评估靶向人PD-1的药物的药动学特性的体内系统。在多个实施方案中,可将靶向人PD-1的药物递送或施用给本发明的一种或多种非人动物,接着监测所述非人动物(或从其所分离的细胞)或进行一种或多种测定,以确定所述药物对非人动物的效应。药动学特性包括但不限于动物将药物处理成各种代谢物的方式(或一种或多种药物代谢物,包括毒性代谢物的存在或不存在的检测)、药物半衰期、施用后药物的循环水平(例如药物的血清浓度)、抗药物应答(例如抗药物抗体)、药物吸收和分布、施用途径、排泄途径和/或药物清除。在一些实施方案中,在本发明的非人动物中或通过使用本发明的非人动物来监测药物(例如PD-1调节剂)的药动学和药效学特性。

[0199] 本发明的非人动物提供用于评估靶向人PD-1的药物的在靶毒性的体内系统。在多个实施方案中,可将靶向人PD-1的药物递送或施用给本发明的一种或多种非人动物,接着监测所述非人动物(或从其所分离的细胞)或进行一种或多种测定,以确定所述药物对非人动物的在靶毒性效应。通常,药物旨在用于调节一种或多种它们的靶的功能。只是给出一个例子,PD-1旨在用于通过以某种方式与一种或多种细胞表面上的PD-1分子相互作用来调节PD-1介导的功能(例如PD-1信号转导)。在一些实施方案中,这种调节剂可具有放大所需的调节剂药理学作用的不利效应。此类效应被称为在靶效应。示例性在靶效应包括剂量太高、慢性活化/失活以及不正确组织中的正确作用。在一些实施方案中,使用在本发明的非人动物中或通过使用本发明的非人动物所鉴定的靶向人PD-1的药物的在靶效来确定先前未知的PD-1功能。

[0200] 本发明的非人动物提供用于评估靶向人PD-1的药物的脱靶毒性的体内系统。在多个实施方案中,可将靶向人PD-1的药物递送或施用给本发明的一种或多种非人动物,接着监测所述非人动物(或从其所分离的细胞)或进行一种或多种测定,以确定所述药物对非人动物的脱靶毒性效应。当药物与非预期靶标相互作用(例如对共同表位的交叉反应性)时,可发生脱靶效应。此类相互作用可发生在预期或非预期组织中。只是给出一个例子,药物的镜像异构体(对映异构体)可导致脱靶毒性效应。另外,药物可能不适合与不同的受体亚型相互作用或不旨在活化不同的受体亚型。例性脱靶效应包括不正确的活化/抑制不正确的靶标,而与其中发现不正确靶标的组织无关。在一些实施方案中,靶向人PD-1的药物的脱靶效应是通过将药物施用给本发明的非人动物的效应与施用给一种或多种参照非人动物的效应进行比较来确定。

[0201] 在一些实施方案中,进行测定包括确定对施用药物的非人动物的表型(例如体重改变)和/或基因型的效应。在一些实施方案中,进行测定包括确定PD-1调节剂(例如拮抗剂

或激动剂)的批与批间的差异性。在一些实施方案中,进行测定包括确定施用给本发明非人动物和参照非人动物的靶向人PD-1的药物的效应之间的差异。多个实施方案中,参照非人动物可具有如文中所述的修饰、与本文所述的修饰不同的修饰或不具有修饰(例如具有破坏、缺失或另外非功能性Pdc1基因的修饰)或不具有修饰(即野生型非人动物)。

[0202] 可在非人动物(或在从其所分离的细胞中和/或使用从其所分离的细胞)中测量以评估靶向人PD-1的药物的药理学特性、在靶毒性和/或脱靶毒性的示例性参数包括但不限于凝集、自噬、细胞分裂、细胞死亡、补体介导的溶血、DNA完整性、药物-特异性抗体滴度、药物代谢、基因表达阵列、代谢活性、粒线体活性、氧化应激、吞噬作用、蛋白质生物合成、蛋白质降解、蛋白质分泌、应激反应、靶组织药物浓度、非靶组织药物浓度、转录活性等。在多个实施方案中,本发明的非人动物用于确定PD-1调节剂的药学有效剂量。

[0203] 本发明的非人动物系提供用于开发和表征用于癌症的候选治疗剂的体内系统。在多个实施方案中,本发明的非人动物可植入肿瘤,接着施用一种或多种候选治疗剂。在一些实施方案中,候选治疗剂可包括多特异性抗体(例如双特异性抗体)或抗体混合物;在一些实施方案中,候选治疗剂系包括联合疗法,例如依序或同时给药的单特异性抗体的施用。允许肿瘤有足够的时间建立在非人动物内的一或多个位置上。可在施用候选治疗之前和之后测量肿瘤细胞增殖、生长、存活等。也可在非人动物中测量候选治疗剂的细胞毒性。

[0204] 本发明的非人动物可用于开发一种或多种疾病模型以评价或评估候选治疗剂和/或治疗方案(例如单一疗法、联合疗法、剂量范围测试等),从而有效地治疗影响人的疾病、障碍或病症。可在本发明的非人动物中建立多种疾病病症,然后施用一个或多个候选分子(例如靶向PD-1的药物),使得可确定一个或多个候选分子在疾病病症中的功效。在一些实施方案中,疾病模型包括自体免疫性、炎症和/或肿瘤性疾病、障碍或病症。

[0205] 只是给出一个例子,本发明的非人动物提供用于肿瘤或肿瘤细胞的预防性和/或治疗性治疗的改进的动物模型。在多个实施方案中,本发明的非人动物可植入一种或多种肿瘤细胞,然后施用一种或多种候选治疗剂(例如抗体)。在一些实施方案中,一种或多种候选治疗剂的施用是在植入一种或多种肿瘤细胞之后(例如在其之后数分钟或数小时,但通常与其在同一天)进行,在本发明的非人动物中评价一种或多种候选治疗剂在防止所述非人动物中的实体瘤建立和/或肿瘤细胞生长方面的功效。在一些实施方案中,一种或多种候选治疗剂的施用是在植入一种或多种肿瘤细胞之后(例如在其之后数天)进行,并且在某些实施方案中,在足以使一种或多种植入的肿瘤细胞在本发明的非人动物中已达到预定大小(例如体积)的一段时间之后进行;并且评价一种或多种候选治疗剂在治疗一种或多种已建立的肿瘤方面的功效。可根据剂量将非人动物置于不同的治疗组中,使得可确定与已建立肿瘤的有效治疗相关的最佳剂量或剂量范围。

[0206] 可使用包括肠胃外和非肠胃外施用途径在内的任何施用方法将候选分子施用给非人动物疾病模型。肠胃外途径包括例如静脉内、动脉内、门静脉内、肌内、皮下、腹膜内、脊柱内、鞘内、脑室内、颅内、胸膜内或其他注射途径。非肠胃外途径包括例如经服、经鼻、经皮、经肺、经直肠、经颊面、经阴道、经眼。施用还可通过连续输注、局部施用、从植入物(凝胶、膜等)持续释放和/或静脉内注射来进行。当在本发明的非人动物中评价联合疗法时,可经由相同的施用途径或经由不同的施用途径来施用候选分子。当在本发明的非人动物中评价给药方案时,候选分子可以两月一次、每月一次、三周一次、两周一次、每周一次、每日一

次、以可变的间隔和/或以逐步增加的浓度施用,以确定给药方案,所述给药方案在其中已建立一个或多个疾病模型的非人动物中展示出所需的治疗或预防效果。

[0207] 本发明的非人动物系提供用于开发和表征用于传染病的候选治疗剂的体内系统。在多个实施方案中,本发明的非人动物可通过注入病毒(例如MHV、HIV、HCV等)或病原体(例如细菌)而被感染,然后施用一种或多种候选治疗剂。在一些实施方案中,候选治疗剂可包括多特异性抗体(例如双特异性抗体)或抗体混合物;在一些实施方案中,候选治疗剂系包括联合疗法,例如依序或同时给药的单特异性抗体的施用;在一些实施方案中,候选治疗剂可包括疫苗。允许病毒或病原体有足够的时间确立在非人动物内的一或多个位置或细胞中,使得与所述病毒或病原体相关联的一种或多种症状在非人动物中发展。可在施用候选治疗之前和之后测量T细胞增殖和生长。另外,可在病毒或病原体感染的非人动物中测量存活、血清和/或胞内细胞因子分析、肝脏和/或脾组织病理学。在一些实施方案中,本发明的非人动物用于确定与病毒感染相关联的器官损伤的程度。在一些实施方案中,本发明的非人动物用于确定被特定病毒感染的非人动物中各种器官中的细胞因子表达概况。

[0208] 本发明的非人动物可用于评估靶向人细胞的治疗性药物的功效。在多个实施方案中,本发明的非人动物移植有人细胞,并且将靶向此类人细胞的候选药物施用给此类非人动物。然后通过施用药物后监测非人动物中的人细胞来确定药物的治疗功效。可在非人动物中测试的药物包括小分子化合物,即分子量小于1500kD、1200kD、1000kD或800道尔顿的化合物,以及大分子化合物(例如蛋白质,如抗体),其通过靶向人细胞(例如结合和/或作用其上)而对治疗人疾病和病症具有预期的治疗效果。

[0209] 在一些实施方案中,药物为抗癌药物,并且人细胞为癌细胞,其可为原发癌细胞或由原发癌所建立的细胞系的细胞。在这些实施方案中,本发明的非人动物移植有人癌细胞,并将抗癌药物给予所述非人动物。药物的功效可通过评估非人动物中的人癌细胞的生长或转移是否因施用该药物而受到抑制来加以确定。

[0210] 在具体实施方案中,抗癌药物为抗体分子,其与人癌细胞上的抗原结合。在特定实施方案中,抗癌药物为双特异性抗体,其与人癌细胞上的抗原结合,并且与其他人细胞,例如人免疫系统的细胞(或“人免疫细胞”)例如B细胞和T细胞上的抗原结合。

## 实施例

[0211] 提供以下实施例是为了向本领域普通技术人员描述如何制备和使用本发明的方法和组合物,而非旨在限制发明人所认为的其发明的范围。除非另外指明,否则所给出的温度为摄氏度,压力是大气压或接近大气压。

[0212] 实施例1内源程序性细胞死亡1(Pdcd1)基因的人源化

[0213] 本实施例说明使编码非人哺乳动物例如啮齿动物(例如小鼠)中的程序性细胞死亡蛋白1(PD-1)的内源Pdcd1基因人源化的示例性方法。描述于本实施例中的方法可使用如所述的任何人序列或人序列的组合(或序列片段)而用于将非人动物的内源Pdcd1基因人源化。在本实施例中,使用包含GenBank登录号:NM\_005018.2(SEQ ID NO:23)中所呈现的人PDCD1基因的外显子2、内含子2和前71bp的外显子3的~883bp人DNA片段来将内源Pdcd1基因人源化。用于使编码内源Pdcd1基因的胞外N端IgV区的遗传物质人源化的靶向载体是使用VELOCIGENE®技术来构建(参见,例如美国专利No.6,586,251和Valenzuela等人,

2003, Nature Biotech. 21 (6) :652-659; 以引用的方式并入本文)。

[0214] 简言之, 对小鼠细菌人工染色体 (BAC) 克隆RP23-93N20 (Invitrogen) 进行修饰以缺失包含内源Pdc1基因的外显子2、内含子2和部分外显子3的序列, 并且使用~883bp人DNA片段来插入人PDCD1基因的外显子2、内含子2和部分外显子3, 其编码人PD-1多肽的氨基酸26-169。包含外显子1、部分外显子3 (即, 其编码跨膜结构域)、外显子4和5以及5' 和3' 非翻译区 (UTR) 的内源DNA被保留。对~883bp人DNA片段的序列分析确认了所有人PDCD1外显子 (即, 外显子2和71bp的外显子3) 和剪接信号。序列分析显示所述序列系匹配参照基因组和PDCD1转录物NM\_005018.2。

[0215] 更详细而言, 首先, 由包含下列的合成DNA片段构建小细菌同源重组供体: [ (HindIII) - (小鼠上游78bp) - (XhoI/NheI限制性内切酶位点) - (人PDCD1883bp) - (小鼠下游75bp) - (HindIII) ]。此片段由Genescript Inc. (Piscataway, NJ) 合成并且克隆到抗氨苄青霉素质粒载体中。采用XhoI-NheI位点来连接~4,996bp的侧接重组酶识别位点的自缺失新霉素盒 (loxP-hUbl-em7-Neo-pA-mPrm1-Crei-loxP; 参见美国专利No. 8,697,851、No. 8,518,392和No. 8,354,389, 其以引用的方式并入本文)。后续选择采用新霉素。使用侧接的HindIII位点将靶向载体在与小鼠BAC克隆RP23-93N20同源重组之前线性化。有意地, 人PDCD1 883bp片段与小鼠下游75bp之间的接合使得外显子3中的开放读框得以保留 (图2)。所得靶向载体从5' 至3' 包含含有~61.7kb的来自BAC克隆RP23-93N20的小鼠基因组DNA的5' 同源臂、侧接loxP位点的自缺失新霉素盒、883bp人基因组DNA片段 (包含人Pdc1基因的外显子2至前71bp的外显子3) 和~84kb的来自BAC克隆RP23-93N20的小鼠基因组。

[0216] 如上述的经修饰的RP23-93N20BAC克隆用于对小鼠胚胎干 (ES) 细胞进行电穿孔以形成经修饰的ES细胞, 所述经修饰的ES细胞包含从外显子2至部分外显子3被人源化的内源Pdc1基因 (即, 900bp的内源Pdc1基因缺失, 而插入883bp的人序列)。通过检测人PDCD1序列 (例如外显子2和部分外显子3) 的存在和确认小鼠Pdc1序列 (例如外显子2和部分外显子3, 和/或外显子1、4和5) 的丧失和/或保留的测定 (Valenzuela等人, 上述) 来鉴定包含人源化Pdc1基因的正向靶向的ES细胞。表4示出用于确认如上所述的内源Pdc1基因的人源化的引物和探针 (图3)。横跨上游插入点上的核苷酸序列包括下列序列, 其表明插入点的自缺失新霉素盒的5' 端上游的内源小鼠序列 (包含在下面的圆括号内, XhoI限制位点为斜体) 与插入点上存在的loxP位点 (粗体) 和盒序列连续连接: (TCAAAGGACA GAATAGTAGC CTCCAGACCC TAGGTTTCAGT

[0217] TATGCTGAAG GAAGAGCCCT CTCTGAG)ATAACTTCGT ATAATGTATG  
CTATACGAAG TTATATGCAT GGCCTCCGCG CCGGGTTTTG

[0218] GCGCCTCCCG CGGGCGCCCC CCTCCTCACG (SEQ ID NO:19)。

位于自缺失新霉素盒的3' 端的横跨下游插入点的核苷酸序列包括下列序列, 其表明盒序列 (包含在下面的圆括号内, loxP序列为粗体, NheI限制位点为斜体) 与插入点下游的人Pdc1基因组序列邻接: (CTGGAATAAC TTCGTATAAT

GTATGCTATA CGAAGTTATG CTAGTAACTA TAACGGTCCT  
 AAGGTAGCGA *GCTAGC*)AAGAGGCTCT GCAGTGGAGG CCAGTGCCCA  
 [0219] TCCCCGGGTG GCAGAGGCCC CAGCAGAGAC TTCTCAATGA  
 CATTCCAGCT GGGGTGGCCC TTCCAGAGCC CTTGCTGCCC  
 GAGGGATGTG AGCAGGTGGC CGGGGAGGCT TTGTGGGGCC

[0220] **ACCCAGCCCC (SEQ ID NO:20)**。位于人PDCD1基因组序列的3'端的横跨下游插入点的核苷酸序列包括下列序列,其表明人PDCD1序列与小鼠Pdc1基因组序列(包含在下面的圆括号内)邻接: **CCCTTCCAGA GAGAAGGGCA** GAAGTGCCCA  
 CAGCCCACCC CAGCCCCTCA CCCAGGCCAGCCGGCCAGTT CCAAACCCTG (GTCATTGGTA  
 TCATGAGTGCCCTAGTGGGT ATCCCTGTAT TGCTGCTGCT GGCCTGGGCCCTAGCTGTCT TCTGCTCAAC)  
 (SEQ ID NO:21)。缺失新霉素盒(剩余77bp)后横跨上游插入点的核苷酸序列包括下列序列,其表明小鼠和人基因组序列与剩余的盒序列loxP序列(包含在下面的圆括号内,XhoI和NheI限制位点为斜体,loxP序列为粗体)并置: **TCAAAGGACA GAATAGTAGC CTCCAGACCC**  
**TAGGTTCACT TATGCTGAAG GAAGAGCCCT (CTCGAG ATAACCTTCGT**  
**ATAATGTATG CTATACGAAG TTATGCTAGT AACTATAACG**  
 [0221] **GTCCTAAGGT AGCGAGCTAGC)AAGAG GCTCTGCAGT GGAGGCCAGT  
 GCCCATCCCC GGGTGGCAGA GGCCCCAGCA GAGACTTCTC  
**AATGACATTC CAGCTGGGGT GGCCCTTCCA (SEQ ID NO:22)**。**

[0222] 然后使用阳性ES细胞克隆植入雌性小鼠,使用 **VELOCIMOUSE®** (参见,例如美国专利No.7,294,754和Poueymirou等人,2007,Nature Biotech.25(1):91-99),以产生包含人PDCD1外显子2和部分的PDCD1外显子3向小鼠内源Pdc1基因的插入的一窝幼鼠。再使用检测到人PDCD1基因序列存在的等位基因测定改型(Valenzuela等人,上述)通过分离自剪尾的DNA基因分型来确认和鉴定其中带有的内源Pdc1基因的外显子2和部分的Pdc1外显子3被人源化(即,883bp人DNA片段)的小鼠。将幼鼠进行基因分型并选择针对人源化Pdc1基因构建体杂合的动物队列进行表征。

[0223] 表4



[0224]

名称	引物	序列(5'-3')	
7106 hTU	正向	CCCAGCAGAGACTTCTCAATGAC	(SEQ ID NO:7)
	探针	TGGCCCTTCCAGAGCCCTTG	(SEQ ID NO:8)
	反向	CGGCCACCTGCTCACATC	(SEQ ID NO:9)
7106 hTD	正向	GGCATCTCTGTCCTCTAGCTC	(SEQ ID NO:10)
	探针	AAGCACCCCAGCCCCTCTAGTCTG	(SEQ ID NO:11)
	反向	GGGCTGTGGGCACTTCTG	(SEQ ID NO:12)
7106 TU	正向	CCTTCCTCACAGCTCTTTGTTC	(SEQ ID NO:13)
	探针	TCTGCATTTTCAGAGGTCCCAATGG	(SEQ ID NO:14)
	反向	GAGCCAGGCTGGGTAGAAG	(SEQ ID NO:15)
7106 TD	正向	CGGTGTCCTAGAACTCTATTCTTTG	(SEQ ID NO:16)
	探针	TCCTGGAGACCTCAACAAGATATCCCA	(SEQ ID NO:17)
	反向	TGAAACCGGCCTTCTGGTT	(SEQ ID NO:18)

[0225] 实施例2人源化PD-1在活化的T细胞上的表达

[0226] 本实施例展示根据实施例1的经修饰以包含人源化Pdcd1基因的非人动物(例如啮齿动物)在活化的淋巴细胞表面上表达人源化PD-1蛋白质。在本实施例中,将来自如实施例1中所述的针对内源Pdcd1基因的人源化杂合的小鼠的活化的T细胞用抗-PD-1抗体染色,以确定PD-1在分离自野生型和人源化小鼠的受刺激T细胞中的表达。

[0227] 简言之,从野生型小鼠和如实施例1中所述的针对内源Pdcd1基因的人源化杂合的小鼠中获取脾,并且通过机械解离加工成单细胞悬浮液。将细胞在培养基(RPMI,补有10% FBS)中洗涤并且以 $1 \times 10^6$ /mL重悬,将200 $\mu$ L(200,000个细胞)铺板在96孔板中。将所选细胞中的细胞用抗-CD3和抗-CD28抗体(均为1 $\mu$ g/mL)刺激72小时。根据制造商的说明用识别CD4、CD8、CD19和人(克隆MIH4,BD Biosciences)或小鼠(克隆J43,eBioscience)PD1的抗体对细胞进行染色以进行FACS。将染色的细胞在LSRII流式细胞仪上运行并使用Flowjo软件来分析数据。对CD8<sup>+</sup>T细胞设门(CD19<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>)以表达人和小鼠PD1。示例性结果在图4中示出。

[0228] 如图4中所示,如实施例1中所述的带有人源化Pdcd1基因的小鼠表达包含人部分和内源小鼠部分的PD-1多肽。可经由识别完整人PD-1多肽的抗体进行的识别来可检测地表达人部分。

[0229] 实施例3PD-1调节剂的体内功效

[0230] 本实施例展示根据实施例1的经修饰以包含人源化Pdcd1基因的非人动物(例如啮齿动物)可用于体内测定中,以筛选PD-1调节剂(例如抗-PD-1抗体)并确定多种特性,例如,肿瘤生长的抑制和/或肿瘤细胞的杀灭。在本实施例中,在如实施例1中所述的针对内源Pdcd1基因的人源化杂合的小鼠中筛选若干抗-PD-1抗体,以确定抑制肿瘤生长的最佳抗体剂量和抗-PD-1抗体介导肿瘤细胞杀灭的程度。

[0231] 简言之,根据体重将小鼠均匀分成五个治疗组或对照组以供研究1(n=5只/组)、八个治疗组或对照组以供研究2(n=5只/组)和五个治疗组或对照组以供研究3(n=7只/组)。在第零天,通过异氟烷吸入使小鼠麻醉,然后将MC38. 卵细胞在100 $\mu$ L DMEM中的悬浮液

经皮下注射到右侧腹(研究1: $5 \times 10^5$ ;研究2/3: $1 \times 10^6$ )。将MC38. 卵(小鼠克隆腺癌)细胞工程化以表达鸡卵清蛋白,从而提高肿瘤免疫原性。对于研究1,在实验的第3、7、10、14和17天,对治疗组腹膜内注射200 $\mu$ g三种抗-PD-1抗体中的任一种,或无关特异性的同种型对照抗体,而其中一组小鼠不做处理。对于研究2,在实验的第3、7、10、14和17天,对治疗组腹膜内注射10mg/kg或5mg/kg/剂量的三种抗-PD-1抗体中的任一种、10mg/kg/剂量的一种抗-PD-1抗体(Ab B, IgG4),或10mg/kg的无关特异性的同种型对照抗体。对于研究3,在实验的第3、7、10、14和17天,对治疗组腹膜内注射5mg/kg或2.5mg/kg/剂量两种抗-PD-1抗体中的任一种,或5mg/kg的对PD-1无特异性的对照抗体(对照)。表5示出各组小鼠的实验性给药和治疗方案。

[0232] 对于每个研究,记录每个治疗组在第14或17天和第23或24天的卡尺测量所确定的平均肿瘤体积和百分比存活率。在研究结束时(对于研究1为第42天,对于研究2和研究3为第31天)评估无肿瘤小鼠的数目。计算每个研究的平均肿瘤体积( $\text{mm}^3$ )( $\pm$ SD)、百分比存活率和无肿瘤小鼠的数目(表7-9)。示例性肿瘤生长曲线在图5中提供。

[0233] 如表6中所示,对于研究1,用Ab A治疗的小鼠在研究过程中未发展出任何可检测到的肿瘤。在研究的第17和24天,用Ab C治疗的小鼠相较于对照表现出持续减小的肿瘤体积;并且5只小鼠中有3只小鼠在实验结束时无肿瘤。相比之下,在本研究中,用Ab B进行的治疗相较于对照在减小肿瘤体积方面未展示出显著的功效。在研究的第23天,接受Ab B的组中的5只小鼠中有1只小鼠死亡,同种型对照治疗组中的5只小鼠中有2只小鼠死亡。在非治疗组和同种型对照组中,一些小鼠表现出肿瘤自然消退(分别是:5只小鼠中有1只小鼠;5只小鼠中有2只小鼠)。

[0234] 如表7中所示,对于研究2,用10mg/kg的Ab A治疗的小鼠在研究过程中未发展出可检测到的肿瘤。用10mg/kg的Ab C或Ab D治疗的小鼠相较于对照在研究的第17和24天表现出显著减小的肿瘤体积。用10mg/kg的Ab C或Ab D治疗的每个组中的5只小鼠中有4只小鼠在第31天无肿瘤,而同种型对照治疗组中的5只动物中仅有1只动物由于自然肿瘤消退而无肿瘤。以10mg/kg测试的Ab B相较于对照在研究的第17和24天展示出显著减小的肿瘤体积,但此抗体为功效最低的抗-PD1抗体,其中5只小鼠中仅有2只小鼠在实验结束时存活。

[0235] 在用Ab A、Ab C和Ab D中治疗的组中观察到测试剂量(5mg/kg和10mg/kg)下的肿瘤抑制中的剂量依赖性应答。5mg/kg的Ab A或Ab C疗法不太有效,其中在第31天实验结束时5只小鼠中有4只小鼠无肿瘤,而在10mg/kg Ab A剂量组中5只小鼠中有5只小鼠无肿瘤。双因素ANOVA多重比较的Dunnett测试显示,用作为参照的10mg/kg的同种型对照抗体治疗的组与用10mg/kg的Ab A、Ab C或Ab D治疗的组之间的肿瘤生长差异是统计上显著的, $p$ 值 $< 0.005$ 。用10mg/kg的同种型对照抗体治疗的组与用5mg/kg的Ab A、Ab C或Ab D治疗的组之间的肿瘤生长差异也是统计上显著的, $p$ 值 $< 0.05$ 。

[0236] 如表8中所示,对于研究3,用5mg/kg的Ab A或Ab C治疗的7只小鼠中有6只小鼠在实验结束时无肿瘤,而在同种型对照组中不存在无肿瘤动物。IgG4对照组中有一只荷瘤小鼠在植入后第17天死亡。用2.5mg/kg的Ab C治疗的7只小鼠中有4只小鼠在实验结束时无肿瘤。测试的抗-PD-1抗体与同种型对照组在第21天的肿瘤体积差异是统计上显著的,如通过单因素ANOVA通过Dunnett多重比较事后检验, $p < 0.01$ 。所有测试的四种抗-PD-1抗体在5mg/kg剂量时的功效同样均强于在2.5mg/kg剂量时的功效。

[0237] 在图5中所示,抗-PD-1抗体显著抑制了根据实施例1制备的PD-1人源化小鼠中的预防性MC38. 卵肿瘤生长模型中的肿瘤生长。10mg/kg的抗-PD-1Ab疗法在整个实验过程中促进所有小鼠 (5只小鼠中有5只小鼠) 种的肿瘤消退,而对照组中的5只小鼠中仅有1只小鼠由于自然肿瘤消退而保持无肿瘤。5mg/kg的抗-PD-1疗法的功效略低,其中5只小鼠中有4只小鼠在实验结束时无肿瘤。通过Dunnett多重比较事后检验的单因素ANOVA显示出抗-PD-1与对照抗体治疗之间的显著肿瘤体积差异,  $p$ 值 $<0.05$  (5mg/kg) 以及 $p$ 值 $<0.01$  (10mg/kg)。

[0238] 在类似的实验中,通过测量用抗-PD-1抗体治疗的荷瘤小鼠的脾中的CD8<sup>+</sup>T细胞和CD3<sup>+</sup>T细胞应答和IFN  $\gamma$  产生来研究根据实施例1制备的PD-1人源化小鼠中的完整功能性PD-1信号传导。

[0239] 简言之,从在第21天实验结束时用抗-PD-1或对照抗体治疗的PD-1人源化小鼠 (75% C57BL/6/25% 129) (上述) 获得脾细胞。分离总RNA,使用寡核苷酸和taqman探针混合物对反向转录的cDNA进行实时PCR,所述混合物对小鼠CD8b (正向引物: GCTCTGGCTG GTCTTCAGTA TG、SEQ ID NO:24;反向引物: TTGCCGTATG GTTGGTTGA AC、SEQ ID NO:25;探针: AGCAGCTCTGCCCTCAT、SEQ ID NO:26)、小鼠CD3 $\zeta$  (Mm00446171\_m1, Applied Biosystems)、小鼠IFN- $\gamma$  (Mm01168134\_m1, Applied Biosystems)、人PD-1 (正向引物: ACTTCCACAT GAGCGTGG、SEQ ID NO:27;反向引物: GGGCTGTGGGCACTTCTG、SEQ ID NO:28;探针: GCAGATCAAA GAGAGCCTGC、SEQ ID NO:29) 和小鼠PD-1 (Mm01285676\_m1, Applied Biosystems) 具有特异性。相对于小鼠亲环蛋白B的表达来使样本归一化。示例性结果在图6中提供。

[0240] 如图6中所示,抗-hPD-1抗体的施用引起荷载有MC38. 卵肿瘤的人源化小鼠 (根据实施例1制备) 的脾中的CD8<sup>+</sup>和CD3<sup>+</sup>T细胞的产生增加。另外,荷瘤PD-1人源化小鼠中的抗-hPD-1抗体的活性取决于IFN  $\gamma$ , 其确认了细胞表面上通过人源化PD-1的正确信号传导。总之,观察到两个治疗组中T细胞和IFN  $\gamma$  相较于对照治疗的小鼠的增加。

[0241] 用人特异性探针测量人PD-1mRNA表达,所述人特异性探针针对PD-1蛋白质的胞外部分设计并且确认人源化PD-1蛋白质在细胞表面上的正确表达。另外,用被设计来检测小鼠PD-1的胞外部分的引物测量小鼠PD-1mRNA表达未能产生结果。

[0242] 合在一起,本实施例展示本发明的非人动物可用于评估靶向PD-1的药物 (例如抗体) 的体内功效,并且此类动物可用于辨别抗-PD-1抗体的治疗效果。此外,本文所述的非人动物可用于评估靶向PD-1的药物可抑制肿瘤生长和/或介导肿瘤细胞杀灭的程度。本发明的非人动物 (例如小鼠) 展示出经由人源化PD-1的功能性PD-1-信号传导和正确的PD-1-依赖性免疫应答,如T细胞表达和细胞因子表达 (例如IFN- $\gamma$ ) 所证实。

[0243] 表5

研究编号	抗体	剂量
1	同种型对照	200μg
	未治疗	N/A
	Ab A	200μg
	Ab B	200μg
	Ab C	200μg
[0244] 2	同种型对照	10mg/kg
	Ab A	10mg/kg
	Ab A	5mg/kg
	Ab B	10mg/kg
	Ab C	10mg/kg
	Ab C	5mg/kg
	Ab D	10mg/kg
	Ab D	5mg/kg
3	同种型对照	5mg/kg
	Ab A	5mg/kg
	Ab A	2.5mg/kg
	Ab C	5mg/kg
	Ab C	2.5mg/kg

[0245] 表6

研究 1					
治疗组 (n=5)	平均肿瘤体积 (mm <sup>3</sup> , ±SD)		存活(%)		无肿瘤小鼠
	第 17 天	第 23 天	第 17 天	第 23 天	第 42 天
	200μg/小鼠	200μg/小鼠	200μg/小鼠	200μg/小鼠	200μg/小鼠
[0246] 未治疗	189 (±110)	554 (±317)	100%	100%	1/5
同种型对照	86 (±114)	515 (±859)	100%	60%	2/5
Ab A	0 (0)	0 (0)	100%	100%	5/5
Ab B	89 (±176)	445 (±889)	100%	80%	3/5
Ab C	14 (±19)	205 (±312)	100%	100%	3/5

[0247] 表7

[0248]

研究 2										
治 疗 组 (n=5)	平均肿瘤体积 (mm <sup>3</sup> ; ±SD)				存活(%)				无肿瘤小鼠	
	第 17 天		第 24 天		第 17 天		第 24 天		第 31 天	
	5 mg/kg	10 mg/kg	5 mg/kg	10 mg/kg	5 mg/kg	10 mg/kg	5 mg/kg	10 mg/kg	5 mg/kg	10 mg/kg
同种型对照	N/A	449 (±434)	N/A	824 (±858)	N/A	100%	N/A	60%	N/A	1/5
Ab A	17 (±38)	0 (0)	104 (±233)	0 (0)	100	100	100	100	4/5	5/5
Ab B	N/A	124 (±209)	N/A	359 (±657)	N/A	100	N/A	80	N/A	2/5
Ab C	91 (±204)	12 (±28)	228 (±509)	96 (±215)	100	100	80	100	4/5	4/5
Ab D	94 (±160)	10 (±21)	328 (±559)	67 (±150)	100	100	80	100	3/5	4/5

[0249] 表8

[0250]

研究 3										
治疗组 (n=7)	平均肿瘤体积 (mm <sup>3</sup> ; ±SD)				存活(%)				无肿瘤小鼠	
	第 14 天		第 21 天		第 14 天		第 21 天		第 31 天	
	2.5 mg/kg	5 mg/kg	2.5 mg/kg	5 mg/kg	2.5 mg/kg	5 mg/kg	2.5 mg/kg	5 mg/kg	2.5 mg/kg	5 mg/kg
同种型对照	N/A	94 (±44)	N/A	405 (±326)	N/A	100	N/A	86	N/A	0/7
Ab A	0 (0)	0 (0)	19 (±51)	13 (±35)	100	100	100	100	6/7	6/7
Ab C	41 (±68)	7 (±20)	87 (±123)	16 (±42)	100	100	100	100	4/7	6/7

[0251] 实施例4抗-PD-1肿瘤疗法的啮齿动物模型

[0252] 本实施例展示根据实施例1所述的经修饰以包含人源化Pdcd1基因的非人动物(例如啮齿动物)可用于肿瘤模型中,以确定PD-1调节剂(例如抗-PD-1抗体)的最佳治疗剂量。在本实施例中,将抗-PD-1抗体施用给如实施例1中所述的针对内源Pdcd1基因的人源化杂合的小鼠,以确定用于治疗已建立肿瘤的最佳治疗剂量。

[0253] 简言之,对包含人源化Pdcd1基因(如实施例1中所述)的小鼠皮下植入1×10<sup>6</sup>个MC38. 卵细胞(上述)并且一旦肿瘤体积达到80-120mm<sup>3</sup>(第0天)就将它们随机分成六个治疗组(n=8-9只/组)。向小鼠腹膜内施用0.3-25mg/kg的渐增剂量范围(即,0.3、1、3、10或25mg/kg)的抗-hPD-1抗体或25mg/kg的同种型对照抗体。在第0、3、7、10和13天投予抗体。在实验持续(60天)期间通过每周两次进行卡尺测量来监测肿瘤体积。示例性肿瘤生长曲线在图7中提供。

[0254] 如图7中所示,在实验结束时,施用对照抗体的小鼠没有小鼠无肿瘤。相比之下,剂

量范围为3-25mg/kg的抗-hPD-1抗体导致不同治疗组中具有约44-55%的无肿瘤小鼠。合在一起,本实施例展示本发明的非人动物可用作啮齿动物肿瘤模型,以确定靶向PD-1的药物(例如抗体)有效治疗已建立肿瘤的最佳剂量和/或剂量范围。

[0255] 等同物

[0256] 在如此地描述了本发明的至少一个实施方案的若干方面后,本领域技术人员将理解,各种改变、修改和改进对于本领域技术人员来说将是容易进行的。此类改变、修改和改进旨在是本公开内容的一部分,并且旨在处于本发明的精神和范围之内。因此,上述描述和附图仅仅作为举例的方式,并且本发明通过下面的权利要求进行详细描述。

[0257] 在权利要求中使用序数术语如“第一”、“第二”、“第三”等来修饰权利要求元素,其本身并不意味着一个权利要求要素相对于另一个要素的任何优先性、优先级或顺序或者其中执行方法行为的时间顺序,而是仅用作区分具有某一名称的一个权利要求元素与具有同一名称的另一个元素(但使用序数术语)的标记,以区分权利要求元素。

[0258] 除非明确地指出相反,否则本文说明书和权利要求中所使用的冠词“一个”和“一种”在说明书和权利要求中应被理解为包括多个指代物。在组的一个或多个成员之间包括“或”的权利要求或描述应当被视为是满足以下情况,即组成员中的一个、多于一个或全部存在于、被应用于给定的产品或方法中,或以其他方式与给定的产品或方法相关,除非指出相反或根据上下文文明显不同。本发明包括这样的实施方案,其中组中的一个确切成员存在于、被应用于给定的产品或方法中,或以其他方式与给定的产品或方法相关。本发明还包括这样的实施方案,其中多于一个组成员或全部组成员存在于、被应用于给定的产品或方法中,或以其他方式与给定的产品或方法相关。此外,应当理解,本发明包括涵盖所有的变型、组合和置换,其中来自一条或多条所列权利要求的一个或多个限制、要素、子句、描述性用语被引入从属于同一基础权利要求的另一个权利要求(或者相关的任何其他权利要求)中,除非另外指出或除非对于本领域普通技术人员来说明显会引起矛盾或不一致。当要素以列表的形式(例如以马库什组或类似形式)呈现时,应当理解这些要素的每个亚组也被公开,并且任何要素可从该组中去除。应当理解,通常,当本发明或本发明的方面被称为包含特定的要素、特征等时,本发明的某些实施方案或本发明的方面由此类要素、特征等组成或基本上由它们组成。为了简化的目的,这些实施方案并不是在每种情况下都明确用本文陈述的那么多用词来具体描述。应当理解,本发明的任何实施方案或方面可明确地从权利要求排除,不管在说明书中是否描述了此类具体排除。

[0259] 本领域技术人员将理解可归因于本文中所述的测定或其他方法中获得的值的典型标准偏差或误差。本文引用的用以描述本发明背景以及用以提供与其实施有关的其他细节的出版物、网站和其他参考材料均据此以引用方式并入。

[0001]	序列表
[0002]	<110> BUROVA, Elena
[0003]	MUJICA, Alexander O.
[0004]	LAI, Ka-Man Venus O.
[0005]	MURPHY, Andrew J.
[0006]	<120> 具有人源化程序性细胞死亡1基因的非人动物
[0007]	<130> 31969 (10121US1)
[0008]	<150> 62/086,518
[0009]	<151> 2014-12-02
[0010]	<150> 62/138,221
[0011]	<151> 2015-03-25
[0012]	<150> 62/014,181
[0013]	<151> 2014-06-19
[0014]	<160> 29
[0015]	<170> PatentIn 3.5版
[0016]	<210> 1
[0017]	<211> 1972
[0018]	<212> DNA
[0019]	<213> 小家鼠
[0020]	<400> 1
[0021]	tgagcagcgg ggaggaggaa gaggagactg ctactgaagg cgacactgcc aggggctctg 60
[0022]	ggcatgtggg tccggcaggt accctggtca ttcaattggg ctgtgctgca gttgagctgg 120
[0023]	caatcagggt ggcttctaga ggtccccaat gggccctgga ggtccctcac cttctacca 180
[0024]	gcctggctca cagtgtcaga gggagcaaat gccacctca cctgcagctt gtccaactgg 240
[0025]	tccgaggatc ttatgctgaa ctggaaccgc ctgagtcca gcaaccagac tgaaaaacag 300
[0026]	gccgccttct gtaatggttt gagccaaccc gtccaggatg cccgcttcca gatcatacag 360
[0027]	ctgccaaca ggcatgactt ccacatgaac atccttgaca cacggcgcaa tgacagtggc 420
[0028]	atctacctct gtggggccat ctccctgcac cccaaggcaa aaatcgagga gagccctgga 480
[0029]	gcagagctcg tggtaacaga gagaatcctg gagacctcaa caagatatcc cagcccctcg 540
[0030]	cccaaaccag aaggccggtt tcaaggcatg gtcatgtgta tcatgagtgc cctagtgggt 600
[0031]	atccctgtat tgctgctgct ggcttgggcc ctagctgtct tctgctcaac aagtatgtca 660
[0032]	gaggccagag gagctggaag caaggacgac actctgaagg aggagccttc agcagcacct 720
[0033]	gtccctagtg tggcctatga ggagctggac ttccaggga gagagaagac accagagctc 780
[0034]	cctaccgctt gtgtgcacac agaatatgcc accattgtct tcaactgaagg gctgggtgcc 840
[0035]	tccggccatgg gacgtagggg ctcagctgat ggccctgcagg gtccctggcc tccaagacat 900
[0036]	gaggatggac attgtttctt gcctctttga ccagattctt cagccattag catgctgcag 960
[0037]	accctccaca gagagcaccg gtccgtccct cagtcaagag gagcatgcag gctacagttc 1020
[0038]	agccaaggct cccagggtct gagctagctg gagtgcacgc ccagcgccctg caccaattcc 1080

[0039]	agcacatgca ctgttgagtg agagctcact tcaggtttac cacaagctgg gagcagcagg	1140
[0040]	cttcccggtt tcctattgtc acaaggtgca gagctggggc ctaagcctat gtctcctgaa	1200
[0041]	tcctactggt gggcacttct agggacttga gacactatag ccaatggcct ctgtgggttc	1260
[0042]	tgtgcctgga aatggagaga tctgagtaca gcctgctttg aatggccctg tgaggcaacc	1320
[0043]	ccaaagcaag ggggtccagg tatactatgg gccagcacc taaagccacc cttgggagat	1380
[0044]	gatactcagg tgggaaattc gtagactggg ggactgaacc aatcccaaga tctggaaaag	1440
[0045]	ttttgatgaa gacttgaaaa gtccttagct tcgggggtct gggaagcatg agcacttacc	1500
[0046]	aggcaaaagc tccgtgagcg tatctgtctg ctttctgcat gccaggtac ctcagttttt	1560
[0047]	ttcaacagca aggaaactag ggcaataaag ggaaccagca gagctagagc cacccacaca	1620
[0048]	tccagggggc acttgactct ccctactcct cctaggaacc aaaaggacaa agtccatggt	1680
[0049]	gacagcaggg aaggaaaggg ggatataacc ttgacgcaaa ccaacactgg ggtgttagaa	1740
[0050]	tctcttcatt cactctgtcc tggagttagg ttctggctct cttcacacc taggactctg	1800
[0051]	aaatgagcaa gcacttcaga cagtcagggt agcaagagtc tagctgtctg gtgggcaccc	1860
[0052]	aaaatgacca gggcttaagt ccccttcctt tggtttaagc ccgttataat taaatggtac	1920
[0053]	caaagcttt aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aa	1972
[0054]	<210> 2	
[0055]	<211> 288	
[0056]	<212> PRT	
[0057]	<213> 小家鼠	
[0058]	<400> 2	
[0059]	Met Trp Val Arg Gln Val Pro Trp Ser Phe Thr Trp Ala Val Leu Gln	
[0060]	1 5 10 15	
[0061]	Leu Ser Trp Gln Ser Gly Trp Leu Leu Glu Val Pro Asn Gly Pro Trp	
[0062]	20 25 30	
[0063]	Arg Ser Leu Thr Phe Tyr Pro Ala Trp Leu Thr Val Ser Glu Gly Ala	
[0064]	35 40 45	
[0065]	Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Leu Ser Asn Trp Ser Glu Asp Leu Met	
[0066]	50 55 60	
[0067]	Leu Asn Trp Asn Arg Leu Ser Pro Ser Asn Gln Thr Glu Lys Gln Ala	
[0068]	65 70 75 80	
[0069]	Ala Phe Cys Asn Gly Leu Ser Gln Pro Val Gln Asp Ala Arg Phe Gln	
[0070]	85 90 95	
[0071]	Ile Ile Gln Leu Pro Asn Arg His Asp Phe His Met Asn Ile Leu Asp	
[0072]	100 105 110	
[0073]	Thr Arg Arg Asn Asp Ser Gly Ile Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu	
[0074]	115 120 125	
[0075]	His Pro Lys Ala Lys Ile Glu Glu Ser Pro Gly Ala Glu Leu Val Val	
[0076]	130 135 140	
[0077]	Thr Glu Arg Ile Leu Glu Thr Ser Thr Arg Tyr Pro Ser Pro Ser Pro	



[0078]	145	150	155	160
[0079]	Lys Pro Glu Gly Arg Phe Gln Gly Met Val Ile Gly Ile Met Ser Ala			
[0080]		165	170	175
[0081]	Leu Val Gly Ile Pro Val Leu Leu Leu Leu Ala Trp Ala Leu Ala Val			
[0082]		180	185	190
[0083]	Phe Cys Ser Thr Ser Met Ser Glu Ala Arg Gly Ala Gly Ser Lys Asp			
[0084]		195	200	205
[0085]	Asp Thr Leu Lys Glu Glu Pro Ser Ala Ala Pro Val Pro Ser Val Ala			
[0086]		210	215	220
[0087]	Tyr Glu Glu Leu Asp Phe Gln Gly Arg Glu Lys Thr Pro Glu Leu Pro			
[0088]	225	230	235	240
[0089]	Thr Ala Cys Val His Thr Glu Tyr Ala Thr Ile Val Phe Thr Glu Gly			
[0090]		245	250	255
[0091]	Leu Gly Ala Ser Ala Met Gly Arg Arg Gly Ser Ala Asp Gly Leu Gln			
[0092]		260	265	270
[0093]	Gly Pro Arg Pro Pro Arg His Glu Asp Gly His Cys Ser Trp Pro Leu			
[0094]		275	280	285
[0095]	<210> 3			
[0096]	<211> 2115			
[0097]	<212> DNA			
[0098]	<213> 智人			
[0099]	<400> 3			
[0100]	agtttccctt ccgctcacct ccgcctgagc agtggagaag gcggcactct ggtggggctg	60		
[0101]	ctccaggcat gcagatccca caggcgccct ggccagtcgt ctgggcggtg ctacaactgg	120		
[0102]	gctggcggcc aggatggttc ttagactccc cagacaggcc ctggaacccc cccaccttct	180		
[0103]	ccccagccct gctcgtggtg accgaagggg acaacgccac cttcacctgc agcttctcca	240		
[0104]	acacatcgga gagcttcgtg ctaaactggt accgcatgag cccagcaac cagacggaca	300		
[0105]	agctggccgc cttccccgag gaccgcagcc agcccggcca ggactgccgc ttccgtgtca	360		
[0106]	cacaactgcc caacgggcgt gacttccaca tgagcgtggt cagggcccg gcaatgaca	420		
[0107]	gcggcaccta cctctgtggg gccatctccc tgcccccaa ggcgcagatc aaagagagcc	480		
[0108]	tgccggcaga gctcagggtg acagagagaa gggcagaagt gcccacagcc caccacagcc	540		
[0109]	cctcaccag gccagccggc cagttccaaa ccttggtggt tgggtgctg ggccgcctgc	600		
[0110]	tgggcagcct ggtgctgcta gtctgggtcc tgcccgatc ctgctcccg gccgcacgag	660		
[0111]	ggacaatagg agccagcgc accggccagc cctgaagga ggaccctca gccgtgcctg	720		
[0112]	tgttctctgt ggactatggg gagctggatt tccagtggcg agagaagacc ccggagcccc	780		
[0113]	ccgtgccctg tgccctgag cagacggagt atgccacat tgtctttcct agcggaatgg	840		
[0114]	gcacctcatc ccccgcccgc aggggctcag ctgacggccc tcggagtgcc cagccactga	900		
[0115]	ggcctgagga tggacactgc tcttgcccc tctgaccggc ttccttgccc accagtgttc	960		
[0116]	tgcagaccct ccacatgag cccgggtcag cgcatttcct caggagaagc aggcagggtg	1020		

[0117]	caggccattg caggccgtcc aggggctgag ctgcctgggg gcgaccgggg ctccagcctg	1080
[0118]	cacctgcacc aggcacagcc ccaccacagg actcatgtct caatgcccac agtgagccca	1140
[0119]	ggcagcaggt gtcaccgtcc cctacaggga gggccagatg cagtactgc ttcaggtcct	1200
[0120]	gccagcacag agctgcctgc gtccagctcc ctgaatctct gctgctgctg ctgctgctgc	1260
[0121]	tgctgctgcc tgcggcccgg ggctgaaggc gccgtggccc tgcctgacgc cccggagcct	1320
[0122]	cctgcctgaa cttgggggct ggttggagat ggccttggag cagccaaggt gcccctggca	1380
[0123]	gtggcatccc gaaacgccct ggacgcaggg cccaagactg ggcacaggag tgggaggtac	1440
[0124]	atggggctgg ggactcccca ggagttatct gctccctgca ggcctagaga agtttcaggg	1500
[0125]	aaggtcagaa gagctcctgg ctgtggtggg cagggcagga aaccctcca ctttacaca	1560
[0126]	tgcccaggca gcacctcagg ccctttgtgg ggcagggaag ctgaggcagt aagcgggcag	1620
[0127]	gcagagctgg aggcctttca ggcccagcca gactctggc ctctgcccgc cgcattccac	1680
[0128]	cccagccctt cacaccactc gggagaggga catcctacgg tccaagggtc aggagggcag	1740
[0129]	ggctgggggtt gactcaggcc cctccagct gtggccacct ggggtgttggg agggcagaag	1800
[0130]	tgcaggcacc tagggccccc catgtgcccc ccctgggagc tctccttggg acccattcct	1860
[0131]	gaaattatatt aaaggggttg gccgggctcc caccagggcc tgggtgggaa ggtacaggcg	1920
[0132]	ttccccggg gcctagtacc cccgccgtgg cctatccact cctcacatcc acacactgca	1980
[0133]	ccccactcc tggggcaggg ccaccagcat ccaggcggcc agcaggcacc tgagtggctg	2040
[0134]	ggacaaggga tcccccttcc ctgtggttct attatattat aattataatt aaatatgaga	2100
[0135]	gcatgctaag gaaaa	2115
[0136]	<210> 4	
[0137]	<211> 288	
[0138]	<212> PRT	
[0139]	<213> 智人	
[0140]	<400> 4	
[0141]	Met Gln Ile Pro Gln Ala Pro Trp Pro Val Val Trp Ala Val Leu Gln	
[0142]	1 5 10 15	
[0143]	Leu Gly Trp Arg Pro Gly Trp Phe Leu Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp	
[0144]	20 25 30	
[0145]	Asn Pro Pro Thr Phe Ser Pro Ala Leu Leu Val Val Thr Glu Gly Asp	
[0146]	35 40 45	
[0147]	Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val	
[0148]	50 55 60	
[0149]	Leu Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala	
[0150]	65 70 75 80	
[0151]	Ala Phe Pro Glu Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp Cys Arg Phe Arg	
[0152]	85 90 95	
[0153]	Val Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val Val Arg	
[0154]	100 105 110	
[0155]	Ala Arg Arg Asn Asp Ser Gly Thr Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu	

[0156]	115	120	125
[0157]	Ala Pro Lys Ala Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val		
[0158]	130	135	140
[0159]	Thr Glu Arg Arg Ala Glu Val Pro Thr Ala His Pro Ser Pro Ser Pro		
[0160]	145	150	155
[0161]	Arg Pro Ala Gly Gln Phe Gln Thr Leu Val Val Gly Val Val Gly Gly		
[0162]	165	170	175
[0163]	Leu Leu Gly Ser Leu Val Leu Leu Val Trp Val Leu Ala Val Ile Cys		
[0164]	180	185	190
[0165]	Ser Arg Ala Ala Arg Gly Thr Ile Gly Ala Arg Arg Thr Gly Gln Pro		
[0166]	195	200	205
[0167]	Leu Lys Glu Asp Pro Ser Ala Val Pro Val Phe Ser Val Asp Tyr Gly		
[0168]	210	215	220
[0169]	Glu Leu Asp Phe Gln Trp Arg Glu Lys Thr Pro Glu Pro Pro Val Pro		
[0170]	225	230	235
[0171]	Cys Val Pro Glu Gln Thr Glu Tyr Ala Thr Ile Val Phe Pro Ser Gly		
[0172]	245	250	255
[0173]	Met Gly Thr Ser Ser Pro Ala Arg Arg Gly Ser Ala Asp Gly Pro Arg		
[0174]	260	265	270
[0175]	Ser Ala Gln Pro Leu Arg Pro Glu Asp Gly His Cys Ser Trp Pro Leu		
[0176]	275	280	285
[0177]	<210> 5		
[0178]	<211> 1972		
[0179]	<212> DNA		
[0180]	<213> 人工序列		
[0181]	<220>		
[0182]	<223> 人源化Pdcd1		
[0183]	<400> 5		
[0184]	tgagcagcgg ggaggaggaa gaggagactg ctactgaagg cgacactgcc aggggctctg	60	
[0185]	ggcatgtggg tccggcaggt accctggtca ttacttggg ctgtgctgca gttgagctgg	120	
[0186]	caatcagggt ggcttctaga ctccccagac aggccctgga accccccac cttctcccca	180	
[0187]	gccctgctcg tggtagcga aggggacaac gccaccttca cctgcagctt ctccaacaca	240	
[0188]	tccgagagct tcgtgctaaa ctggtaccgc atgagcccca gcaaccagac ggacaagctg	300	
[0189]	gccgccttcc ccgaggaccg cagccagccc ggccaggact gccgttccg tgtcacacaa	360	
[0190]	ctgcccacg ggcgtgactt ccacatgagc gtggtcaggg cccggcgcaa tgacagcggc	420	
[0191]	acctacctct gtggggccat ctccctggcc cccaaggcgc agatcaaaga gagcctgcgg	480	
[0192]	gcagagctca gggtagacaga gagaagggca gaagtgccca cageccaccc cagcccctca	540	
[0193]	cccaggccag ccggccagtt ccaaaccctg gtcattggta tcatgagtgc ctagtgggt	600	
[0194]	atccctgtat tgctgctgct ggcctgggcc ctagctgtct tctgctcaac aagtatgtca	660	

[0195]	gaggccagag gagctggaag caaggacgac actctgaagg aggagccttc agcagcacct	720
[0196]	gtccctagtg tggcctatga ggagctggac ttccagggac gagagaagac accagagctc	780
[0197]	cctaccgcct gtgtgcacac agaatatgcc accattgtct tctactgaagg gctgggtgcc	840
[0198]	tcgcccatgg gacgtagggg ctgagctgat ggcctgcagg gtcctcggcc tccaagacat	900
[0199]	gaggatggac attgtttcttg gcctctttga ccagattctt cagccattag catgctgcag	960
[0200]	accctccaca gagagcaccg gtccgtccct cagtcaagag gagcatgcag gctacagttc	1020
[0201]	agccaaggct cccagggtct gagctagctg gactgacagc ccagcgcctg caccaattcc	1080
[0202]	agcacatgca ctgttgagtg agagctcact tcaggtttac cacaagctgg gagcagcagg	1140
[0203]	cttcccggtt tcctattgtc acaagggtgca gagctggggc ctaagcctat gtctcctgaa	1200
[0204]	tcctactgtt gggcacttct agggacttga gacactatag ccaatggcct ctgtgggttc	1260
[0205]	tgtgcctgga aatggagaga tctgagtaca gcctgctttg aatggccctg tgaggcaacc	1320
[0206]	ccaaagcaag ggggtccagg tatactatgg gccagcacc taaagccacc cttgggagat	1380
[0207]	gatactcagg tgggaaattc gtagactggg ggactgaacc aatcccaaga tctggaaaag	1440
[0208]	ttttgatgaa gacttgaaaa gctcctagct tcgggggtct gggaagcatg agcacttacc	1500
[0209]	aggcaaaagc tccgtgagcg tatctgctgt ccttctgcat gccaggtac ctgagttttt	1560
[0210]	ttcaacagca aggaaactag ggcaataaag ggaaccagca gagctagagc caccacaca	1620
[0211]	tccagggggc acttgactct ccctactcct cctaggaacc aaaaggacaa agtccatgtt	1680
[0212]	gacagcaggg aaggaaaggg ggatataacc ttgacgcaaa ccaacactgg ggtgttagaa	1740
[0213]	tctctcatt cactctgtcc tggagttggg ttctggctct ccttcacacc taggactctg	1800
[0214]	aaatgagcaa gcacttcaga cagtcagggt agcaagagtc tagctgtctg gtgggcaccc	1860
[0215]	aaaatgacca gggcttaagt ccctttcctt tggtttaagc ccgttataat taaatgggtac	1920
[0216]	caaaagcttt aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aa	1972
[0217]	<210> 6	
[0218]	<211> 288	
[0219]	<212> PRT	
[0220]	<213> 人工序列	
[0221]	<220>	
[0222]	<223> 人源化PD-1	
[0223]	<400> 6	
[0224]	Met Trp Val Arg Gln Val Pro Trp Ser Phe Thr Trp Ala Val Leu Gln	
[0225]	1 5 10 15	
[0226]	Leu Ser Trp Gln Ser Gly Trp Leu Leu Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp	
[0227]	20 25 30	
[0228]	Asn Pro Pro Thr Phe Ser Pro Ala Leu Leu Val Val Thr Glu Gly Asp	
[0229]	35 40 45	
[0230]	Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val	
[0231]	50 55 60	
[0232]	Leu Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala	
[0233]	65 70 75 80	

[0234]	Ala Phe Pro Glu Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp Cys Arg Phe Arg
[0235]	85 90 95
[0236]	Val Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val Val Arg
[0237]	100 105 110
[0238]	Ala Arg Arg Asn Asp Ser Gly Thr Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu
[0239]	115 120 125
[0240]	Ala Pro Lys Ala Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val
[0241]	130 135 140
[0242]	Thr Glu Arg Arg Ala Glu Val Pro Thr Ala His Pro Ser Pro Ser Pro
[0243]	145 150 155 160
[0244]	Arg Pro Ala Gly Gln Phe Gln Thr Leu Val Ile Gly Ile Met Ser Ala
[0245]	165 170 175
[0246]	Leu Val Gly Ile Pro Val Leu Leu Leu Leu Ala Trp Ala Leu Ala Val
[0247]	180 185 190
[0248]	Phe Cys Ser Thr Ser Met Ser Glu Ala Arg Gly Ala Gly Ser Lys Asp
[0249]	195 200 205
[0250]	Asp Thr Leu Lys Glu Glu Pro Ser Ala Ala Pro Val Pro Ser Val Ala
[0251]	210 215 220
[0252]	Tyr Glu Glu Leu Asp Phe Gln Gly Arg Glu Lys Thr Pro Glu Leu Pro
[0253]	225 230 235 240
[0254]	Thr Ala Cys Val His Thr Glu Tyr Ala Thr Ile Val Phe Thr Glu Gly
[0255]	245 250 255
[0256]	Leu Gly Ala Ser Ala Met Gly Arg Arg Gly Ser Ala Asp Gly Leu Gln
[0257]	260 265 270
[0258]	Gly Pro Arg Pro Pro Arg His Glu Asp Gly His Cys Ser Trp Pro Leu
[0259]	275 280 285
[0260]	<210> 7
[0261]	<211> 23
[0262]	<212> DNA
[0263]	<213> 人工序列
[0264]	<220>
[0265]	<223> 合成寡核苷酸:7106 hTU正向
[0266]	<400> 7
[0267]	cccagcagag acttctcaat gac
[0268]	<210> 8
[0269]	<211> 20
[0270]	<212> DNA
[0271]	<213> 人工序列
[0272]	<220>

[0273]	<223> 合成寡核苷酸:7106 hTU探针	
[0274]	<400> 8	
[0275]	tggcccttcc agagcccttg	20
[0276]	<210> 9	
[0277]	<211> 18	
[0278]	<212> DNA	
[0279]	<213> 人工序列	
[0280]	<220>	
[0281]	<223> 合成寡核苷酸:7106 hTU反向	
[0282]	<400> 9	
[0283]	cggccacctg ctcacatc	18
[0284]	<210> 10	
[0285]	<211> 21	
[0286]	<212> DNA	
[0287]	<213> 人工序列	
[0288]	<220>	
[0289]	<223> 合成寡核苷酸:7106 hTD正向	
[0290]	<400> 10	
[0291]	ggcatctctg tcctctagct c	21
[0292]	<210> 11	
[0293]	<211> 24	
[0294]	<212> DNA	
[0295]	<213> 人工序列	
[0296]	<220>	
[0297]	<223> 合成寡核苷酸:7106 hTD探针	
[0298]	<400> 11	
[0299]	aagcacccca gcccctctag tctg	24
[0300]	<210> 12	
[0301]	<211> 18	
[0302]	<212> DNA	
[0303]	<213> 人工序列	
[0304]	<220>	
[0305]	<223> 合成寡核苷酸:7106 hTD反向	
[0306]	<400> 12	
[0307]	gggctgtggg cacttctg	18
[0308]	<210> 13	
[0309]	<211> 22	
[0310]	<212> DNA	
[0311]	<213> 人工序列	

[0312]	<220>	
[0313]	<223> 合成寡核苷酸:7106 TU正向	
[0314]	<400> 13	
[0315]	ccttcctcac agctctttgt tc	22
[0316]	<210> 14	
[0317]	<211> 25	
[0318]	<212> DNA	
[0319]	<213> 人工序列	
[0320]	<220>	
[0321]	<223> 合成寡核苷酸:7106 TU探针	
[0322]	<400> 14	
[0323]	tctgcatttc agaggtcccc aatgg	25
[0324]	<210> 15	
[0325]	<211> 19	
[0326]	<212> DNA	
[0327]	<213> 人工序列	
[0328]	<220>	
[0329]	<223> 合成寡核苷酸:7106 TU反向	
[0330]	<400> 15	
[0331]	gagccaggct gggtagaag	19
[0332]	<210> 16	
[0333]	<211> 25	
[0334]	<212> DNA	
[0335]	<213> 人工序列	
[0336]	<220>	
[0337]	<223> 合成寡核苷酸:7106 TD正向	
[0338]	<400> 16	
[0339]	cgggtgtccta gaactctatt ctttg	25
[0340]	<210> 17	
[0341]	<211> 27	
[0342]	<212> DNA	
[0343]	<213> 人工序列	
[0344]	<220>	
[0345]	<223> 合成寡核苷酸:7106 TD探针	
[0346]	<400> 17	
[0347]	tcctggagac ctcaacaaga tatccca	27
[0348]	<210> 18	
[0349]	<211> 19	
[0350]	<212> DNA	

[0351]	<213> 人工序列	
[0352]	<220>	
[0353]	<223> 合成寡核苷酸:7106 TD反向	
[0354]	<400> 18	
[0355]	tgaaaccggc cttctggtt	19
[0356]	<210> 19	
[0357]	<211> 156	
[0358]	<212> DNA	
[0359]	<213> 人工序列	
[0360]	<220>	
[0361]	<223> 合成寡核苷酸	
[0362]	<400> 19	
[0363]	tcaaaggaca gaatagtagc ctccagaccc taggttcagt tatgctgaag gaagagccct	60
[0364]	ctcgagataa cttcgtataa tgtatgctat acgaagttat atgcatggcc tccgcgccgg	120
[0365]	gttttggcgc ctcccgccgg cgccccctc ctacag	156
[0366]	<210> 20	
[0367]	<211> 236	
[0368]	<212> DNA	
[0369]	<213> 人工序列	
[0370]	<220>	
[0371]	<223> 合成寡核苷酸	
[0372]	<400> 20	
[0373]	ctggaataac ttcgtataat gtatgctata cgaagttatg ctagtaacta taacggtcct	60
[0374]	aaggtagcga gctagcaaga ggctctgcag tggaggccag tgcccatccc cgggtggcag	120
[0375]	aggccccagc agagacttct caatgacatt ccagctgggg tggcccttcc agagcccttg	180
[0376]	ctgcccagagg gatgtgagca ggtggccggg gaggctttgt ggggccaccc agcccc	236
[0377]	<210> 21	
[0378]	<211> 160	
[0379]	<212> DNA	
[0380]	<213> 人工序列	
[0381]	<220>	
[0382]	<223> 合成寡核苷酸	
[0383]	<400> 21	
[0384]	cccttcaga gagaaggga gaagtgccca cagcccaccc cagcccctca ccaggccag	60
[0385]	cgggccagtt ccaaaccctg gtcattggta tcatgagtgc cctagtgggt atccctgtat	120
[0386]	tgctgctgct ggccctgggc ctagctgtct tctgctcaac	160
[0387]	<210> 22	
[0388]	<211> 232	
[0389]	<212> DNA	



[0390]	<213> 人工序列	
[0391]	<220>	
[0392]	<223> 合成寡核苷酸	
[0393]	<400> 22	
[0394]	tcaaaggaca gaatagtagc ctccagaccc taggttcagt tatgctgaag gaagagccct	60
[0395]	ctcgagataa cttcgtataa tgtatgctat acgaagttat gctagtaact ataacgggtcc	120
[0396]	taaggtagcg agctagcaag aggctctgca gtggaggcca gtgcccattcc ccgggtggca	180
[0397]	gaggccccag cagagacttc tcaatgacat tccagctggg gtggcccttc ca	232
[0398]	<210> 23	
[0399]	<211> 883	
[0400]	<212> DNA	
[0401]	<213> 人工序列	
[0402]	<220>	
[0403]	<223> 合成寡核苷酸:人883 bp DNA片段	
[0404]	<400> 23	
[0405]	aagaggctct gcagtggagg ccagtgccca tccccgggtg gcagaggccc cagcagagac	60
[0406]	ttctcaatga cattccagct ggggtggccc ttccagagcc cttgctgccc gagggatgtg	120
[0407]	agcaggtggc cggggaggct ttgtggggcc acccagcccc ttctcaccct ctctccatct	180
[0408]	ctcagactcc ccagacaggc cctggaaccc cccaccttc tccccagccc tgctcgtggt	240
[0409]	gaccgaagg gacaacgcca cttcacctg cagcttctcc aacacatcgg agagcttcgt	300
[0410]	gctaaactgg taccgcatga gccccagcaa ccagacggac aagctggccg ccttccccga	360
[0411]	ggaccgcagc cagcccggcc aggactgccg cttccgtgtc acacaactgc ccaacgggcg	420
[0412]	tgacttccac atgagcgtgg tcagggcccg gcgcaatgac agcggcacct acctctgtgg	480
[0413]	ggccatctcc ctggccccca aggccgagat caaagagagc ctgcgggcag agctcagggt	540
[0414]	gacaggtgcg gcctcggagg ccccggggca ggggtgagct gagccggtcc tgggggtgggt	600
[0415]	gtcccctcct gcacaggatc aggagctcca gggctcgtagg gcagggaccc cccagctcca	660
[0416]	gtccagggtc ctgtcctgca cctggggaat ggtgaccggc atctctgtcc tctagctctg	720
[0417]	gaagcacccc agcccctcta gtctgccctc acccctgacc ctgaccctcc accctgaccc	780
[0418]	cgctctaacc cctgaccttt gtgcccttcc agagagaagg gcagaagtgc ccacagccca	840
[0419]	ccccagcccc tcaccaggc cagccggcca gttccaaacc ctg	883
[0420]	<210> 24	
[0421]	<211> 22	
[0422]	<212> DNA	
[0423]	<213> 人工序列	
[0424]	<220>	
[0425]	<223> 合成寡核苷酸	
[0426]	<400> 24	
[0427]	gctctggctg gtcttcagta tg	22
[0428]	<210> 25	

[0429]	<211> 22	
[0430]	<212> DNA	
[0431]	<213> 人工序列	
[0432]	<220>	
[0433]	<223> 合成寡核苷酸	
[0434]	<400> 25	
[0435]	ttgccgtatg gttggtttga ac	22
[0436]	<210> 26	
[0437]	<211> 17	
[0438]	<212> DNA	
[0439]	<213> 人工序列	
[0440]	<220>	
[0441]	<223> 合成寡核苷酸	
[0442]	<400> 26	
[0443]	agcagctctg ccctcat	17
[0444]	<210> 27	
[0445]	<211> 18	
[0446]	<212> DNA	
[0447]	<213> 人工序列	
[0448]	<220>	
[0449]	<223> 合成寡核苷酸	
[0450]	<400> 27	
[0451]	acttccacat gagcgtgg	18
[0452]	<210> 28	
[0453]	<211> 18	
[0454]	<212> DNA	
[0455]	<213> 人工序列	
[0456]	<220>	
[0457]	<223> 合成寡核苷酸	
[0458]	<400> 28	
[0459]	gggctgtggg cacttctg	18
[0460]	<210> 29	
[0461]	<211> 20	
[0462]	<212> DNA	
[0463]	<213> 人工序列	
[0464]	<220>	
[0465]	<223> 合成寡核苷酸	
[0466]	<400> 29	
[0467]	gcagatcaaa gagagcctgc	20

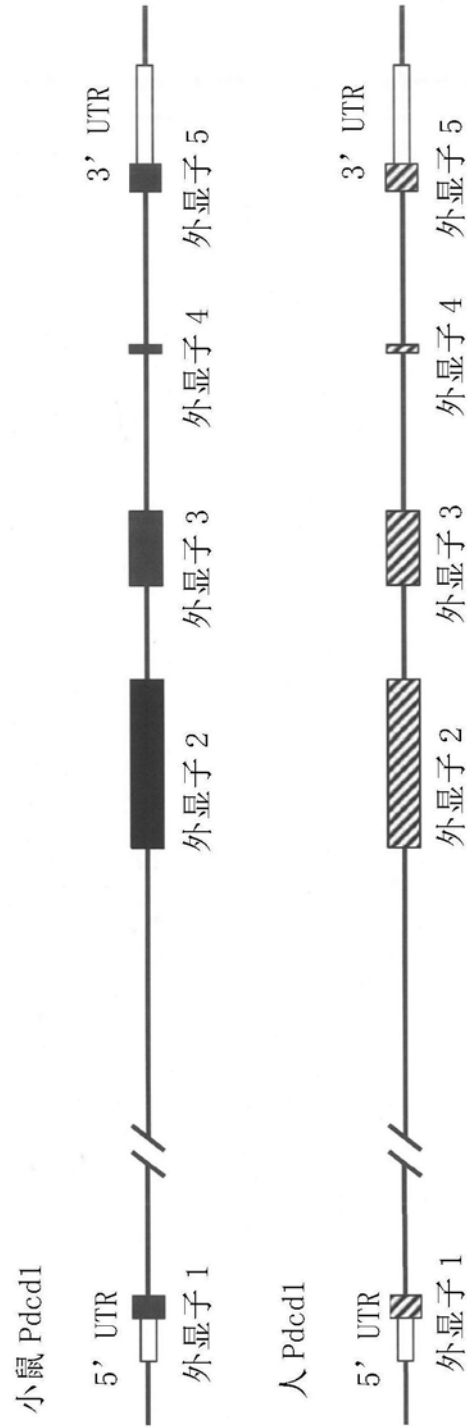


图1

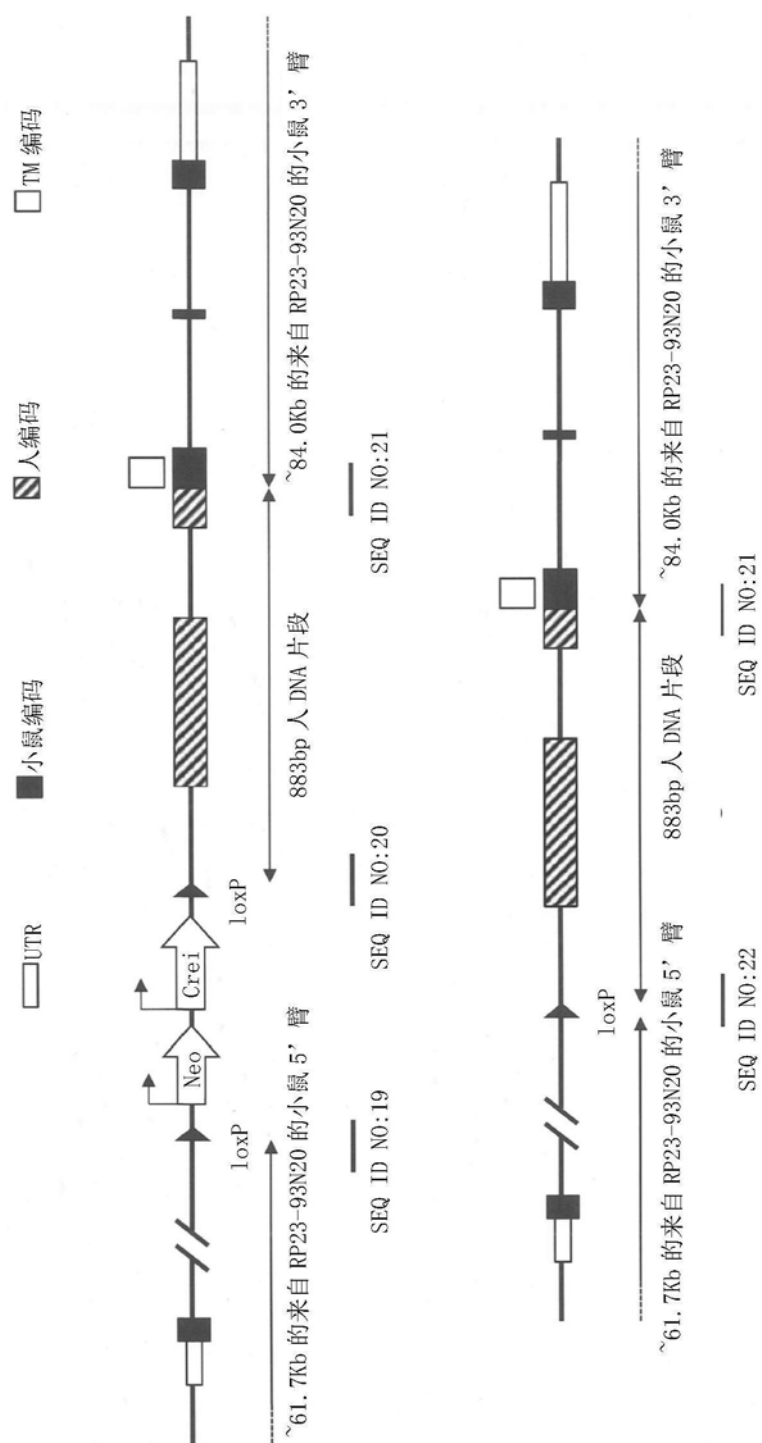


图2

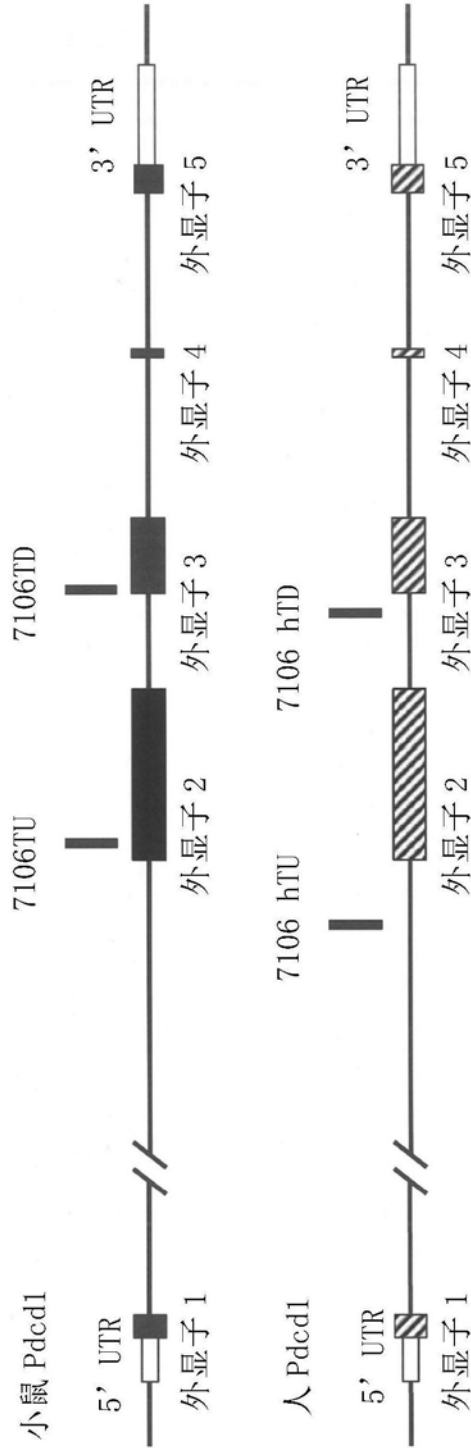


图3

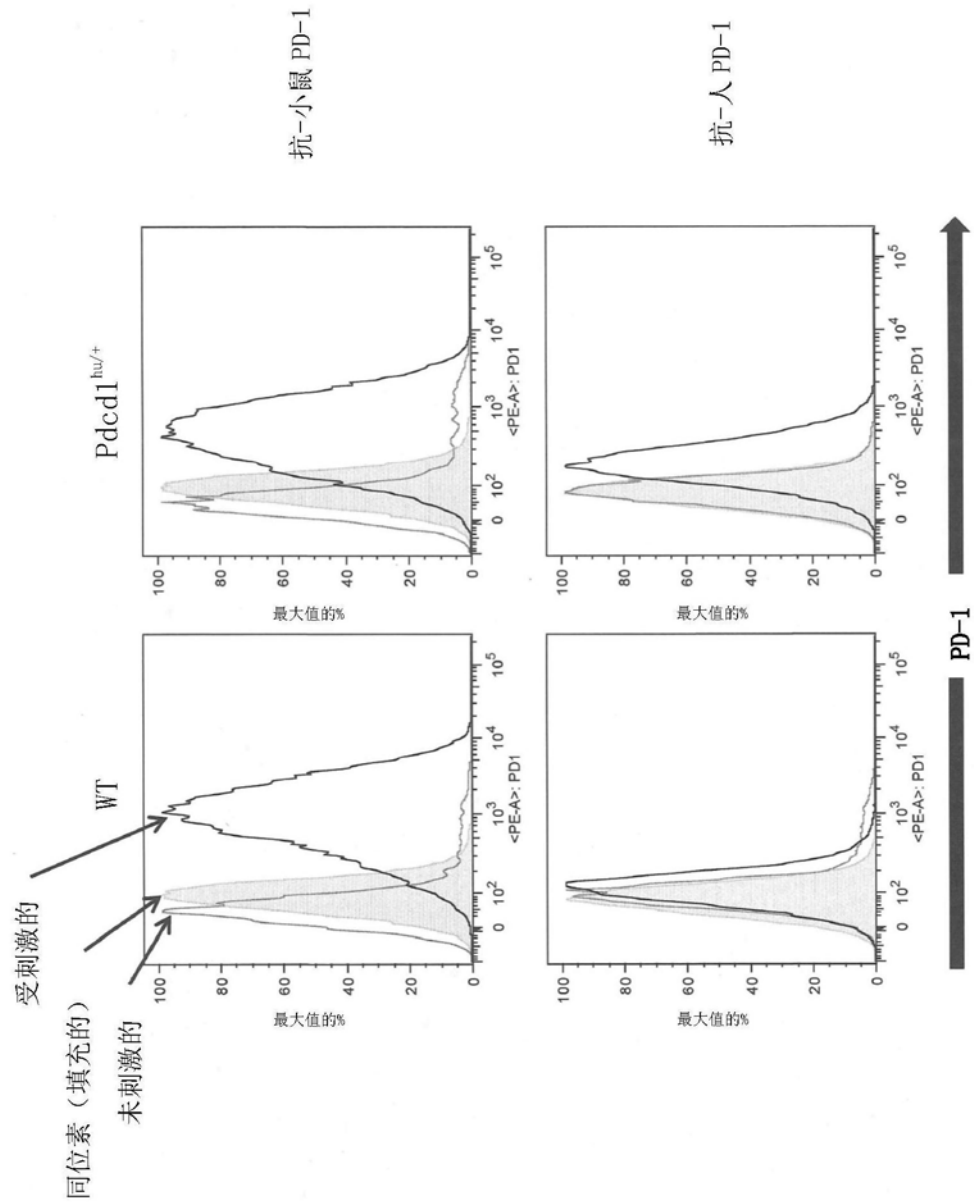


图4

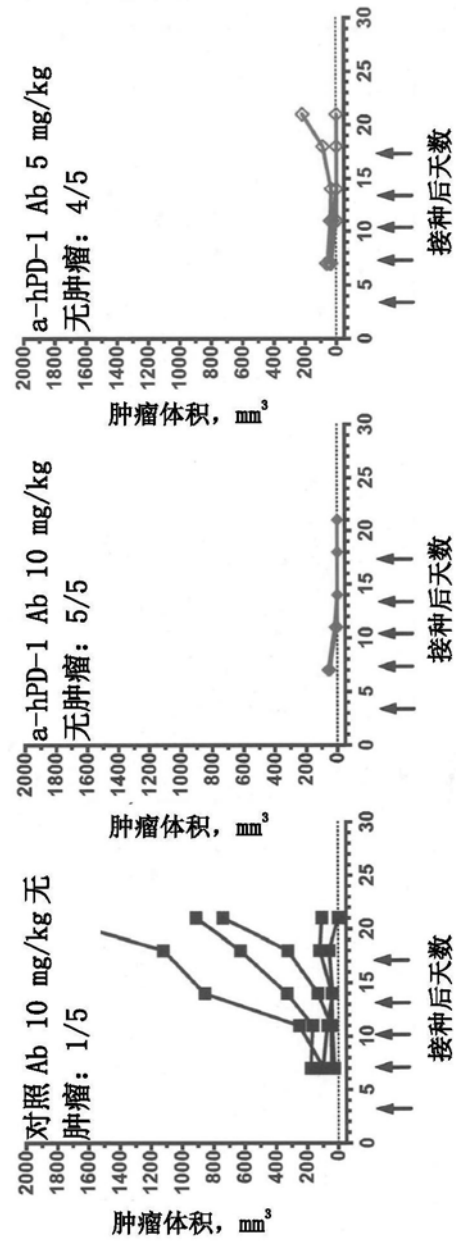


图5

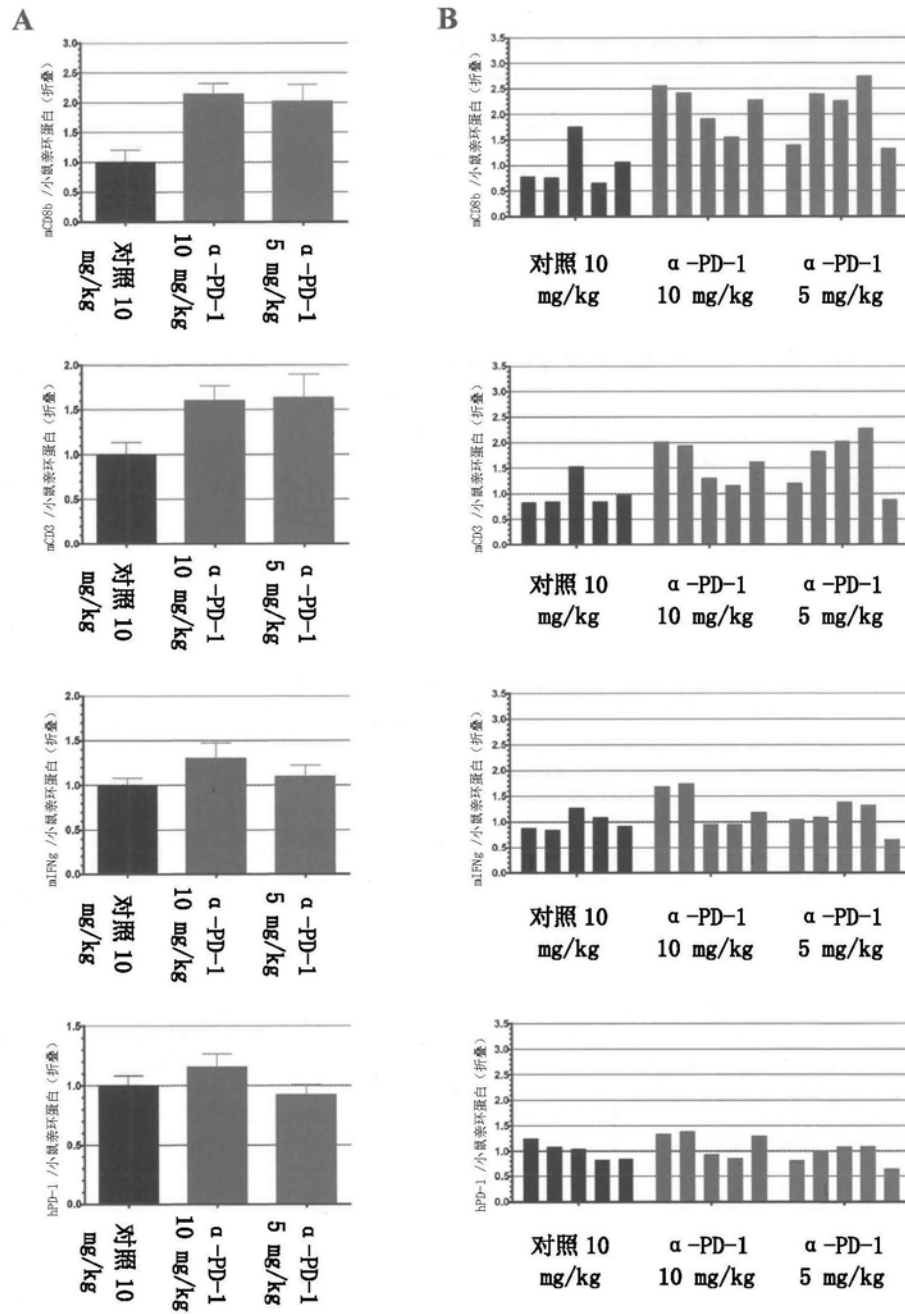


图6



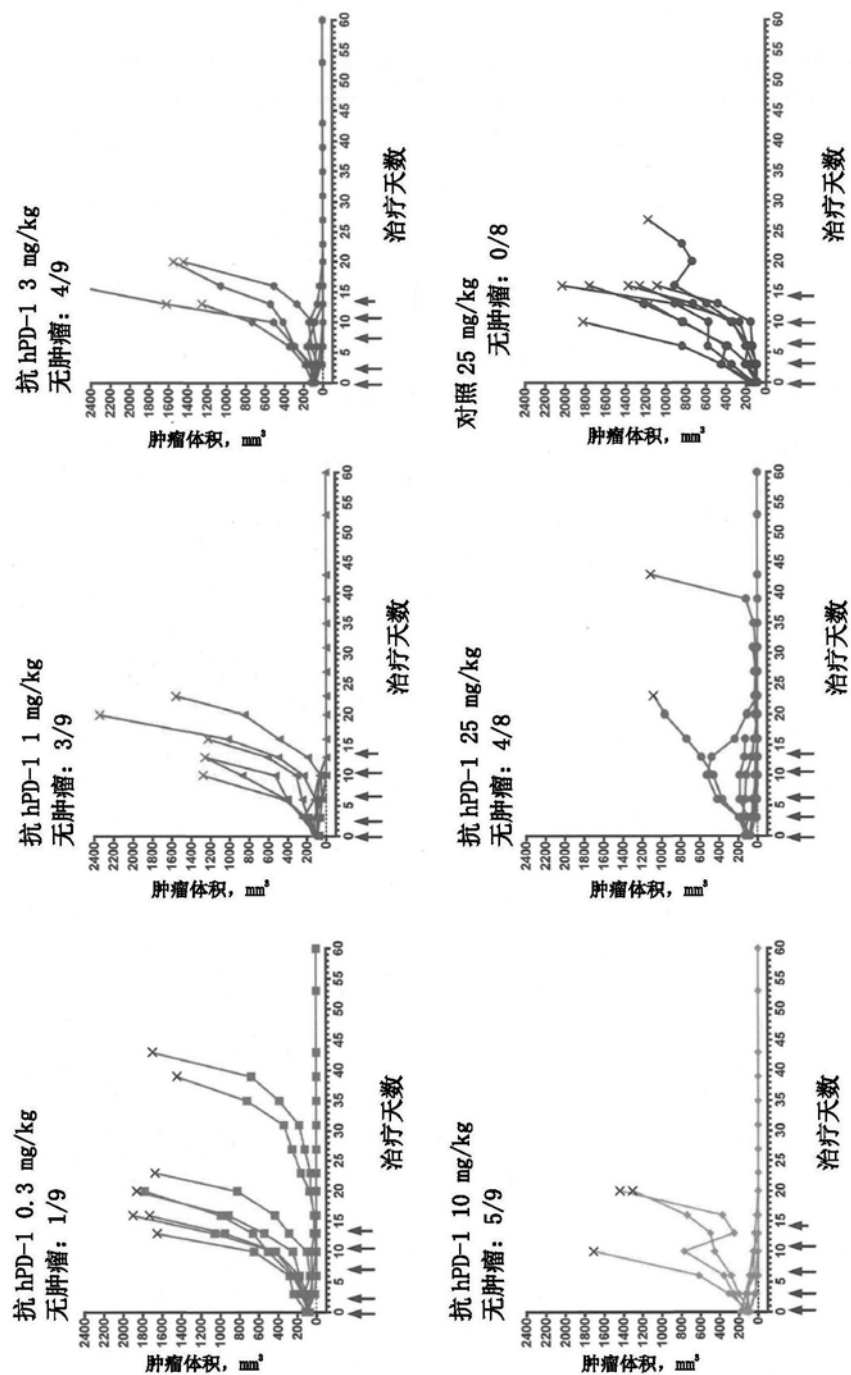


图7

小鼠 Pdcd1 mRNA (NM\_008798.2)

TGAGCAGCGGGGAGGAGGAAGAGGAGACTGCTACTGAAGGCGACACTGCCAGGGGCT  
CTGGGCATGTGGGTCCGGCAGGTACCCTGGTCATTCACTTGGGCTGTGCTGCAGT  
TGAGCTGGCAATCAGGGTGGCTTCTAGAGGTCCCCAATGGGCCCTGGAGGTCCCT  
CACCTTCTACCCAGCCTGGCTCACAGTGTGAGAGGAGCAAATGCCACCTTCACC  
TGCAGCTTGTCCAACCTGGTCGGAGGATCTTATGCTGAACTGGAACCGCTGAGTC  
CCAGCAACCAGACTGAAAAACAGGCCGCTTCTGTAATGGTTTGAGCCAACCCGT  
CCAGGATGCCGCTTCCAGATCATACAGCTGCCAACAGGCATGACTTCCACATG  
AACATCCTTGACACACGGCGCAATGACAGTGGCATCTACCTCTGTGGGGCCATCT  
CCCTGCACCCCAAGGCAAAATCGAGGAGAGCCCTGGAGCAGAGCTCGTGGTAA  
CAGAGAGAATCCTGGAGACCTCAACAAGATATCCAGCCCCCTCGCCCAAACCAGA  
AGGCCGGTTTCAAGGCATGGTCATTGGTATCATGAGTGCCCTAGTGGGTATCCCT  
GTATTGCTGCTGCTGGCCTGGGCCCTAGCTGTCTTCTGCTCAACAAGTATGTCAG  
AGGCCAGAGGAGCTGGAAGCAAGGACGACACTCTGAAGGAGGAGCCTTCAGCAG  
CACCTGTCCCTAGTGTGGCCTATGAGGAGCTGGACTTCCAGGGACGAGAGAAGAC  
ACCAGAGCTCCCTACCGCTGTGTGCACACAGAATATGCCACCATTGTCTTCACT  
GAAGGGCTGGGTGCCTCGGCCATGGGACGTAGGGGCTCAGCTGATGGCCTGCAG  
GGTCTCGGCCTCCAAGACATGAGGATGGACATTGTTCTTGGCCTCTTGACCAG  
ATTCTTCAGCCATTAGCATGCTGCAGACCCTCCACAGAGAGCACCGGTCCGTCCCTCAG  
TCAAGAGGAGCATGCAGGCTACAGTTTCAAGCAAGGCTCCAGGGTCTGAGCTAGCTGG  
AGTGACAGCCCAGCGCTGCACCAATTCCAGCACATGCACTGTTGAGTGAGAGCTCAC  
TTCAGGTTTACCACAAGCTGGGAGCAGCAGGCTTCCCGGTTTCTATTGTCACAAGGTG  
CAGAGCTGGGGCCTAAGCCTATGTCTCCTGAATCCTACTGTTGGGCACCTTCTAGGGACT  
TGAGACACTATAGCCAATGGCCTCTGTGGGTTCTGTGCCTGGAAATGGAGAGATCTGA  
GTACAGCCTGCTTTGAATGGCCCTGTGAGGCAACCCCAAAGCAAGGGGTCCAGGTAT  
ACTATGGGCCCAGCACCTAAAGCCACCCTTGGGAGATGATACTCAGGTGGGAAATTCG  
TAGACTGGGGGACTGAACCAATCCCAAGATCTGGAAGTCTTGTGATGAAGACTTGAAA  
AGCTCCTAGCTTCGGGGGTCTGGGAAGCATGAGCACTTACCAGGCAAAAGCTCCGTGA  
GCGTATCTGCTGTCTTCTGCATGCCAGGTACCTCAGTTTTTTTCAACAGCAAGGAAA  
CTAGGGCAATAAAGGGAACCAGCAGAGCTAGAGCCACCCACACATCCAGGGGGCACT  
TGACTCTCCCTACTCCTCTAGGAACCAAAAGGACAAAGTCCATGTTGACAGCAGGGA  
AGGAAAGGGGATATAACCTTGACGCAAAACCAACTGGGGTGTTAGAATCTCCTCAT  
TCACTCTGTCTGAGTTGGGTCTGGCTCTCCTTACACCTAGGACTCTGAAATGAGC  
AAGCACTTCAGACAGTCAGGTAGCAAGAGTCTAGCTGTCTGGTGGGCACCCAAAATG  
ACCAGGGCTTAAGTCCCTTCTCTTGGTTTAAGCCCGTTATAATTAATGGTACCAAAA  
GCTTTAAAAA (SEQ ID NO:1)

小鼠 PD-1 氨基酸(Q02242) MWVRQVPWSFTWAVLQLSWQSGWLLEVPNG (PWRSLTFYPAWLTVSEGANATFTCSL  
SNWSEDLMLNWNRLSPSNQTEKQA AFCNGLSQPVQDARFQIIQLPNRHDFHNMILDT  
RRNDSGIYLCGAISLHPKAKIEESPG) AELVVTERILETSTRYSPSPKPEGRFQGMVIGI  
MSALVGIPVLLLLAWALAVFCSTSMSEARGAGSKDDTLKEEPSAAPVPSVAYEELDFQGREKT  
PELPTACVHTEYATIVFTEGLGASAMGRRGSADGLQGPRPPRHEDGHCSWPL (SEQ ID NO:2)

图8

AGTTTCCCTTCCGCTCACCTCCGCTTGAGCAGTGGAGAAGGCGGCACCTCTGGTGGGGCT  
GCTCCAGGCATGCAGATCCCACAGGCGCCCTGGCCAGTCGTCTGGGCGGTGCTAC  
AACTGGGCTGGCGGCCAGGATGGTTCTTAGACTCCCCAGACAGGCCCTGGAACCC  
CCCCACCTTCTCCCCAGCCCTGCTCGTGGTGACCGAAGGGGACAACGCCACCTTC  
ACCTGCAGCTTCTCCAACACATCGGAGAGCTTCGTGCTAAACTGGTACCGCATGA  
GCCCCAGCAACCAGACGGACAAGCTGGCCGCTTCCCCGAGGACCGCAGCCAGC  
CCGGCCAGGACTGCCGCTTCCGTGTACACAACCTGCCCAACGGGCGTGACTTCCA  
CATGAGCGTGGTCAGGGCCCGGCGCAATGACAGCGGCACCTACCTCTGTGGGGC  
CATCTCCCTGGCCCCAAGGGCGCAGATCAAAGAGAGCCTGCGGGCAGAGCTCAG  
GGTGACAGAGAGAAGGGCAGAAGTGCCACAGCCACCCCAGCCCCCTACCCAG  
GCCAGCCGGCCAGTTCCAAACCCTGGTGGTTGGTGTCTGTGGGCGGCCCTGCTGGG  
CAGCCTGGTGTCTAGTCTGGGTCTGGCCGTCTCTGCTCCCCGGGCGGCACGA  
GGGACAATAGGAGCCAGGCGCACCGGCCAGCCCTGAAGGAGGACCCCTCAGCC  
GTGCCTGTGTTCTCTGTGGACTATGGGGAGCTGGATTTCAGTGGCGAGAGAAGA  
CCCCGGAGCCCCCGTGCCCTGTGTCCCTGAGCAGACGGAGTATGCCACCATTGT  
CTTTCTAGCGGAATGGGCACCTCATCCCCGCCCCGAGGGGCTCAGCTGACGGC  
CCTCGGAGTGCCAGCCACTGAGGCTGAGGATGGACACTGCTCTTGGCCCCCTCT  
GACCGGCTTCCTTGGCCACCAGTGTCTGCAGACCCTCCACCATGAGCCCGGGTCAGCG  
CATTTCTCAGGAGAAGCAGGCAGGGTGCAGGCCATTGCAGGCCGTCCAGGGGCTGAG  
CTGCCTGGGGGCGACCGGGGCTCCAGCCTGCACCTGCACCAGGCACAGCCCCACCACA  
GGACTCATGTCTCAATGCCCACAGTGAGCCAGGCAGCAGGTGTACCGTCCCCCTACA  
GGGAGGGCCAGATGCAGTCACTGCTTCAGGTCTGCCAGCACAGAGCTGCCTGCGTCC  
AGCTCCCTGAATCTCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCGGCCCGGGC  
TGAAGGCGCCGTGGCCCTGCCTGACGCCCCGGAGCCTCTGCCTGAACTTGGGGGCTG  
GTTGGAGATGGCCTTGGAGCAGCCAAGGTGCCCCCTGGCAGTGGCATCCCGAAACGCC  
TGGACGCAGGGCCCAAGACTGGGCACAGGAGTGGGAGGTACATGGGGCTGGGGACTC  
CCCAGGAGTTATCTGCTCCCTGCAGGCCTAGAGAAGTTTCAGGGAAGGTGAGAAGAGC  
TCCTGGCTGTGGTGGGCAGGGCAGGAAACCCCTCCACCTTTACACATGCCAGGCAGC  
ACCTCAGGCCCTTTGTGGGGCAGGGAAGCTGAGGCAGTAAGCGGGCAGGCAGAGCTG  
GAGGCCTTTACAGGCCAGCCAGCACTCTGGCCTCTGCCCGGCATTCCACCCAGCCC  
CTCACACCACTCGGGAGAGGGACATCCTACGGTCCCAAGGTCAGGAGGGCAGGGCTGG  
GGTTGACTCAGGCCCTCCAGCTGTGGCCACCTGGGTGTTGGGAGGGCAGAAGTGCA  
GGCACCTAGGGCCCCCATGTGCCACCCTGGGAGCTCTCCTTGAACCCATTCTGAA  
ATTATTTAAAGGGTTGGCCGGGCTCCCACCAGGGCCTGGGTGGGAAGGTACAGGCGT  
TCCCCGGGGCCTAGTACCCCCCGGTGGCCTATCCACTCCTCACATCCACACACTGCA  
CCCCCACTCCTGGGGCAGGGCCACCAGCATCCAGGCGGCCAGCAGGCACCTGAGTGGC  
TGGGACAAGGGATCCCCCTTCCCTGTGGTTCTATTATATTATAATTATAATTAAATATG  
AGAGCATGCTAAGGAAAA (SEQ ID NO:3)

67

人 PD-1 氨基酸(Q15116)

MQIPQAPWPVVWAVLQLGWRPGWFLDSPDRPWN (PTFSPALLVTEGDNATFTCSFS  
NTSESVFLNWMSPSNQTDKLAAPEDRSQPGQDCRFRVTQLPNGRDFHMSVVRAR  
RNDSGTYLCGAISLAPKAQIKESLRAELRVT)ERRAEVPTAHPSPSPRAGQFQTLVVG  
VVGGLLSLVLLVWVLAVI CSRAARGTIGARRTGQPLKEDPSAVPVFSVDYGELDFQWREKTP  
EPPVPCVPEQTEYATIVFPSGMTSSPARRGSADGPRSAQPLRPEDGHCSWPL (SEQ ID NO:4)

人源化 Pdcd1 mRNA TGAGCAGCGGGGAGGAGGAAGAGGAGACTGCTACTGAAGGCGACACTGCCAGGGGCT

CTGGGCATGTGGGTCCGGCAGGTACCCTGGTCATTCACTTGGGCTGTGCTGCAGT  
TGAGCTGGCAATCAGGGTGGCTTCTAG (ACTCCCCAGACAGGCCCTGGAACCCCC  
CCACCTTCTCCCCAGCCCTGCTCGTGGTGACCGAAGGGGACAACGCCACCTTCAC  
CTGCAGCTTCTCCAACACATCGGAGAGCTTCGTGCTAAACTGGTACCGCATGAGC  
CCCAGCAACCAGACGGACAAGCTGGCCGCCTTCCCCGAGGACCGCAGCCAGCCC  
GGCCAGGACTGCCGCTTCCGTGTACACAACCTGCCAACGGGCGTGACTTCCACA  
TGAGCGTGGTCAGGGCCCCGGCGCAATGACAGCGGCACCTACCTCTGTGGGGCCA  
TCTCCCTGGCCCCCAAGGCGCAGATCAAAGAGAGCCTGCGGGCAGAGCTCAGGG  
TGACAGAGAGAAGGGCAGAAGTGCCACAGCCACCCAGCCCCTCAGCCAGGC  
CAGCCGGCCAGTTCCAAACCCTG) GTCATTGGTATCATGAGTGCCCTAGTGGGTAT  
CCCTGTATTGCTGCTGCTGGCCTGGGCCCTAGCTGTCTTCTGCTCAACAAGTATG  
TCAGAGGCCAGAGGAGCTGGAAGCAAGGACGACACTCTGAAGGAGGAGCCTTCA  
GCAGCACCTGTCCCTAGTGTGGCCTATGAGGAGCTGGACTTCCAGGGACGAGAG  
AAGACACCAGAGCTCCCTACCGCCTGTGTGCACACAGAATATGCCACCATTGTCT  
TCACTGAAGGGCTGGGTGCCCTCGGCCATGGGACGTAGGGGCTCAGCTGATGGCC  
TGCAGGGTCTCTGGCCTCCAAGACATGAGGATGGACATTGTTCTTGGCCTCTTTG  
ACCAGATTCTTCAGCCATTAGCATGCTGCAGACCCTCCACAGAGAGCACCAGTCCGTCC  
CTCAGTCAAGAGGAGCATGCAGGCTACAGTTCAGCCAAGGCTCCCAGGGTCTGAGCTA  
GCTGGAGTGACAGCCCAGCGCTGCACCAATTCCAGCACATGCACTGTTGAGTGAGAG  
CTCACTTCAGGTTTACCACAAGCTGGGAGCAGCAGGCTTCCCGGTTTCCTATTGTCACA  
AGGTGCAGAGCTGGGGCCTAAGCCTATGTCTCCTGAATCCTACTGTTGGGCACTTCTAG  
GGACTTGAGACACTATAGCCAATGGCCTCTGTGGGTTCTGTGCCTGGAAATGGAGAGA  
TCTGAGTACAGCCTGCTTTGAATGGCCCTGTGAGGCAACCCCAAAGCAAGGGGTCCA  
GGTATACTATGGGCCAGCACCTAAAGCCACCCTTGGGAGATGATACTCAGGTGGGAA  
ATTCGTAGACTGGGGGACTGAACCAATCCCAAGATCTGGAAAAGTTTTGATGAAGACT  
TGAAAAGCTCCTAGCTTCGGGGGTCTGGGAAGCATGAGCACTTACCAGGCAAAAGCTC  
CGTGAGCGTATCTGCTGTCCTTCTGCATGCCAGGTACCTCAGTTTTTTTTCAACAGCAA  
GGAACTAGGGCAATAAAGGGAACCAGCAGAGCTAGAGCCACCCACACATCCAGGGG  
GCACTTGACTCTCCCTACTCCTCCTAGGAACCAAAAGGACAAAAGTCCATGTTGACAGC  
AGGGAAGGAAAGGGGATATAACCTTGACGCAAAACCAACTGGGGTGTTAGAATCT  
CCTCATTCACTCTGTCTGGAGTTGGGTTCTGGCTCTCCTTCACACCTAGGACTCTGAAA  
TGAGCAAGCACTTCAAGAGTCAGGGTAGCAAGAGTCTAGCTGTCTGGTGGGCACCCA  
AAATGACCAGGGCTTAAGTCCCTTTCCTTTGGTTTAAGCCCGTTATAATTAATGTTAC  
CAAAAGCTTTAAA  
(SEQ ID NO:5)

图8(续)



人源化 PD-1 氨基酸

MWVRQVPWSFTWAVLQLSWGWL**LDSPDRPWN****P**(PTFSPALLVVTEGDNATFTCSFS  
**NTSESFVLNWYRMSPSNQTDKLA****AFPEDRSQPGQDCRFRVTQLP****NGRDFHMSVVRAR**  
**RNDSGTYLCGAISLAPKAQIKESLRAELRV****T**)ERRAEVPTAHPSPSPRPAGQ**FQ**TLVIGI  
MSALVGIPVLLLLAWALAVFCSTSMSEARGAGSKDDTLKEEPSAAPVPSVAYEELDFQGREKT  
PELPTACVHTEYATIVFTEGLGASAMGRRGSADGLQGPRPPRHEDGHCSWPL (SEQ ID NO:6)

人 883bpDNA 片段 AAGAGGCTCTGCAGTGGAGGCCAGTGCCCATCCCCGGGTGGCAGAGGCCCCAGCAGA  
GACTTCTCAATGACATTCCAGCTGGGGTGGCCCTTCCAGAGCCCTTGCTGCCCCGAGGGA  
TGTGAGCAGGTGGCCGGGGAGGCTTTGTGGGGCCACCCAGCCCCTTCCTCACCTCTCTC  
CATCTCTCAGACTCCCCAGACAGGCCCTGGAACCCCCCACCTTCTCCCCAGCCCTGCT  
CGTGGTGACCGAAGGGGACAACGCCACCTTACCTGCAGCTTCTCCAACACATCGGAG  
AGCTTCGTGCTAAACTGGTACCGCATGAGCCCCAGCAACCAGACGGACAAGCTGGCCG  
CCTTCCCCGAGGACCGCAGCCAGCCCGGCCAGGACTGCCGCTTCCGTGTCACACAACT  
GCCCCAACGGGCGTGACTTCCACATGAGCGTGGTCAGGGCCCCGGCGCAATGACAGCGGC  
ACCTACCTCTGTGGGGCCATCTCCCTGGCCCCCAAGGCGCAGATCAAAGAGAGCCTGC  
GGGCAGAGCTCAGGGTGACAGGTGCGGCCTCGGAGGCCCCGGGGCAGGGGTGAGCTG  
AGCCGGTCCTGGGGTGGGTGTCCCCTCCTGCACAGGATCAGGAGCTCCAGGGTCGTAG  
GGCAGGGACCCCCAGCTCCAGTCCAGGGCTCTGTCCTGCACCTGGGGAATGGTGACC  
GGCATCTCTGTCTCTAGCTCTGGAAGCACCCCAGCCCCTCTAGTCTGCCCTCACCCCT  
GACCCTGACCCTCCACCCTGACCCCGTCCTAACCCCTGACCTTTGTGCCCTTCCAGAGA  
GAAGGGCAGAAGTGCCACAGCCCACCCAGCCCCTCACCCAGGCCAGCCGGCCAGTT CCAAACCCTG (SEQ ID  
NO:23)

图8 (续)