(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107858332 A
(43)申请公布日 2018.03.30

(21)申请号 201710930555.X

(22)申请日 2012.10.26

(30)优先权数据
61/552,582 2011.10.28 US
61/621,198 2012.04.06 US
61/700,908 2012.09.14 US

(62)分案原申请数据
201280064216.3 2012.10.26

(71)申请人 瑞泽恩制药公司
地址 美国纽约州

(72)发明人 L·麦克唐纳 A·J·莫菲
J·麦克沃克 N·图
V·沃罗宁那 C·古雷尔
K·梅格尔 S·史蒂文斯

(74)专利代理机构 北京市君合律师事务所 11517
代理人 张怡 顾云峰

(51)Int.Cl.
C12N 5/10(2006.01)
C12N 15/12(2006.01)
C12N 15/85(2006.01)
C07K 14/725(2006.01)

权利要求书1页 说明书40页
序列表15页 附图31页

(54)发明名称

T细胞受体基因修饰小鼠

(57)摘要

本发明提供了一种基因修饰的非人动物，在其基因组中包含未经重排的T细胞受体可变基因基因座，以及提供了包含该未经重排的T细胞受体可变基因基因座的非人胚胎、细胞和组织。还提供了用于制备所述基因修饰的非人动物的构建体以及制备所述基因修饰的非人动物的方法。本发明还提供了使用所述基因修饰的非人动物的多种方法。

CN 107858332 A

1.一种分离的非人动物细胞，其包含：

未经重排的T细胞受体(TCR)α可变基因基因座，其包括至少一个人源Vα区段和至少一个人源Jα区段，其中所述未经重排的TCRα可变基因基因座与非人源TCRα恒定基因序列可操作地连接，其中所述未经重排的TCRα可变基因基因座取代内源性非人源TCRα可变基因基因座，和/或

未经重排的TCRβ可变基因基因座，其包括至少一个人源Vβ区段、至少一个人源Dβ区段和至少一个人源Jβ区段，其中所述未经重排的TCRβ可变基因基因座与非人源TCRβ恒定基因序列可操作地连接，其中所述未经重排的TCRβ可变基因基因座取代内源性非人源TCRβ可变基因基因座。

2.根据权利要求1所述的分离的非人动物细胞，其中所述细胞是胚胎干细胞。

3.一种分离的非人动物细胞，包括重排的人源Vα/Jα序列和/或重排的Vβ/Dβ/Jβ序列，其中所述细胞在其细胞表面表达包含人源TCRα和/或TCRβ可变区和非人源恒定区的T细胞受体。

4.根据权利要求3所述的分离的非人动物细胞，其中所述细胞是CD4+T细胞或CD8+T细胞。

5.一种组织，其包含根据权利要求1-4中任一项所述的非人动物细胞。

6.一种离体组合物，其包含根据权利要求1-4中任一项所述的非人动物细胞。

7.一种获得编码人源TCR可变区的核酸序列的方法，包括确定由权利要求3-4中任一项所述的分离的非人动物细胞表达的人源TCR可变区的核酸序列。

8.一种核酸，其包含与非人TCRα恒定区序列可操作地连接的重排的TCRα可变区基因序列，和/或与非人TCRβ恒定区序列可操作地连接的TCRβ可变区基因序列。

9.一种靶向载体，其包含未经重排的人TCRα可变区序列或TCRβ可变区序列，其中每个所述序列的侧翼为靶向臂以将所述靶向载体靶向非人动物ES细胞中的内源性非人动物TCR可变基因座。

10.一种人源或非人源TCR多肽，包括与非人TCRα恒定区可操作地连接的TCRα可变结构域，和/或与非人TCRβ恒定区可操作地连接的TCRβ可变结构域。

T细胞受体基因修饰小鼠

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请是申请号为201280064216.3、申请日为2012年10月26日、发明名称为“T细胞受体基因修饰小鼠”的中国发明专利申请的分案申请，原申请为国际申请号为PCT/US2012/062065的国家阶段申请，该国际申请要求美国临时申请号61/552,582，申请日为2011年10月28日；美国临时申请号61/621,198，申请日为2012年4月6日和美国临时申请号61/700,908，申请日为2012年9月14日的优先权，其全部内容通过引用并入本申请。

发明领域

[0003] 本发明涉及基因修饰的非人动物例如啮齿动物(例如小鼠或大鼠)，在所述动物的基因组中包含人源或人源化的T细胞受体(TCR)可变基因基因座(例如TCRα和TCRβ可变基因基因座和/或TCRδ和TCRγ可变基因基因座)，并且表达来自人源或人源化的TCR可变基因基因座的人源或人源化的TCR多肽(例如TCRα和TCRβ多肽和/或TCRδ和TCRγ多肽)。具有本发明的人源或人源化的TCR可变基因基因座的非人动物在内源性非人源TCR基因座包含未经重排的人源TCR可变区基因区段(例如V、D和/或J区段)。本发明还涉及胚胎、组织和细胞(例如T细胞)，其包含人源或人源化的TCR可变基因基因座并且表达人源或人源化的TCR多肽。本申请还提供了制备包含人源或人源化的TCR可变基因基因座的基因修饰非人动物的方法；以及使用包含人源或人源化的TCR可变基因基因座并且表达来自这些基因座的人源或人源化的TCR多肽的非人动物、胚胎、组织和细胞的方法。

[0004] 发明背景

[0005] 在适应性免疫应答中，通过B淋巴细胞(例如免疫球蛋白)和T淋巴细胞(例如T细胞受体或TCR)上的受体分子识别外来抗原。血液和细胞外空间中的病原体是在体液免疫应答过程中由抗体识别的，而在细胞内对病原体的破坏是在细胞免疫应答过程中由T细胞介导的。

[0006] T细胞识别并攻击在主要组织相容性复合物(MHC)背景下递呈至细胞表面上的抗原。抗原识别由T细胞表面上表达的TCR介导。有两大类T细胞具有这种功能：细胞毒性T细胞，其表达细胞表面蛋白CD8，和辅助T细胞，其表达细胞表面蛋白CD4。细胞毒性T细胞活化信号级联导致递呈该抗原的细胞被直接破坏(在MHC I背景下)，而辅助T细胞分化成几种类型，并且其活化(在MHC II背景下通过识别递呈的抗原而激发)导致巨噬细胞介导的病原体破坏和刺激B细胞产生抗体。

[0007] 由于其具有抗原特异性，因而目前对抗体针对多种人类疾病的治疗潜力进行了广泛研究。为生成能够中和人类靶点的抗体，但避免同时激活针对这种抗体的免疫应答，科学家们集中精力在生产人源或人源化的免疫球蛋白上。在体内生产人源化的抗体的一种方法是使用VELOCIMMUNE®小鼠，这种人源化小鼠包含(1)彼此之间可操作地连接的未经重排的人源免疫球蛋白V、D和J区段库，所述区段库和小鼠恒定区位于内源性小鼠免疫球蛋白重链基因座，以及(2)彼此之间可操作地连接的未经重排的人源Vκ和Jκ区段库，所述区段库和小鼠恒定κ区位于内源性小鼠免疫球蛋白κ轻链基因座。这样，VELOCIMMUNE®小鼠提

供了用于工程化制备人源抗体的高度多样化的重排抗体可变结构域的丰富来源。

[0008] 与抗体类似，T细胞受体包含可变区，其由包含V(D)J可变区区段的未经重排的基因座(α和β基因座，或者δ和γ基因座)编码，并且该可变区赋予了T细胞抗原结合特异性。亦与抗体类似，TCR对其抗原的特异性能够用于开发新疗法。因此，在本领域中需要非人动物(例如啮齿动物，例如大鼠或小鼠)，所述动物包含能够重排以形成编码人源T细胞受体可变结构域基因的未经重排的人源T细胞可变区基因区段，包括彼此间同源的结构域和与目的抗原特异性结合的结构域。还需要一种包含T细胞可变区基因座的非人动物，所述基因座包含保守的人源化，其包括包含未经重排的人源基因区段的非人动物，所述人源基因区段能够重排以形成与非人源(内源性)T细胞受体恒定基因序列连接的T细胞受体可变区基因。还需要能够生成多样性的人源T细胞受体可变序列库的非人动物。需要在对目的抗原应答时能够重排大部分或全部功能性T细胞受体可变区区段以形成包含完全人源可变结构域的T细胞受体多肽的非人动物。

[0009] 发明概述

[0010] 本申请提供了非人动物例如啮齿动物，所述动物包含表达在细胞免疫应答中具有功能的人源化的分子的非人源细胞。本申请还提供了包含未经重排的TCR可变基因基因座的非人动物。本申请提供了体内和体外系统，所述系统包含人源化的啮齿动物细胞，其中所述啮齿动物细胞表达一种或多种人源化的免疫系统分子。本申请还提供了编码人源化的TCR蛋白的未经重排的人源化的TCR啮齿动物基因座。

[0011] 在一个方面，本申请提供了一种基因修饰的非人动物(例如啮齿动物，例如小鼠或大鼠)，所述动物在其基因组中包含(a)未经重排的TCRα可变基因基因座，其包含与非人源(例如啮齿动物，例如小鼠或大鼠)TCRα恒定基因序列可操作地连接的至少一个人源Vα区段和至少一个人源Jα区段，和/或(b)未经重排的TCRβ可变基因基因座，其包含与非人源(例如啮齿动物，例如小鼠或大鼠)TCRβ恒定基因序列可操作地连接的至少一个人源Vβ区段、至少一个人源Dβ区段和至少一个人源Jβ区段。

[0012] 在一个实施方式中，所述未经重排的TCRα可变基因基因座取代在内源性TCRα可变基因基因座的内源性非人源(例如啮齿动物)TCRα可变基因基因座。在一个实施方式中，所述未经重排的TCRβ可变基因基因座取代在内源性TCRβ可变基因基因座的内源性非人源(例如啮齿动物)TCRβ可变基因基因座。在一个实施方式中，所述内源性非人源(例如啮齿动物)Vα和Jα区段无法重排以形成经重排的Vα/Jα序列。在一个实施方式中，所述内源性非人源(例如啮齿动物)Vβ、Dβ和Jβ区段无法重排以形成经重排的Vβ/Dβ/Jβ序列。在一个实施方式中，所述非人动物包含缺失以使得所述动物的基因组不包含功能性Vα和功能性Jα区段。在一个实施方式中，所述非人动物包含缺失以使得所述动物的基因组不包含功能性内源性Vβ、功能性内源性Dβ和功能性内源性Jβ区段。在一个实施方式中，所述动物包含全部功能性内源性Vα和Jα区段的缺失。在一个实施方式中，所述啮齿动物包含全部功能性内源性Vβ、Dβ和Jβ区段的缺失。在一些实施方式中，所述人源Vα和Jα区段重排以形成经重排的Vα/Jα序列。在一些实施方式中，所述人源Vβ、Dβ和Jβ区段重排以形成经重排的Vβ/Dβ/Jβ序列。因此，在不同实施方式中，所述非人动物(例如啮齿动物)在T细胞表面表达包含人源可变区和非人源(例如啮齿动物)恒定区的T细胞受体。

[0013] 在一些方面，所述非人动物的T细胞在胸腺中经历T细胞发育以产生CD4和CD8单阳

性T细胞。在一些方面，所述非人动物包含正常的脾脏CD3+T细胞与总脾脏细胞的比率。在不同实施方式中，所述非人动物在外周生成中心和效应记忆T细胞群。

[0014] 在一个实施方式中，在本申请所描述的非人动物中未经重排的TCRα可变基因基因座包含61个人源Jα区段和8个人源Vα区段。在另一个实施方式中，在非人动物中未经重排的TCRα可变基因基因座包含完整的人源Jα区段库和完整的人源Vα区段库。

[0015] 在一个实施方式中，在本申请所描述的非人动物中未经重排的TCRβ可变基因基因座包含14个人源Jβ区段、2个人源Dβ区段和14个人源Vβ区段。在另一个实施方式中，在非人动物中未经重排的TCRβ可变基因基因座包含完整的人源Jβ区段库、完整的人源Dβ区段库和完整的人源Vβ区段库。

[0016] 在一个附加的实施方式中，本申请所描述的非人动物(例如啮齿动物)在人源化的TCRα基因座进一步包含人源TCRδ可变区段的核苷酸序列。在一个实施方式中，所述非人动物(例如啮齿动物)进一步包含至少一个人源Vδ、Dδ和Jδ区段，例如在人源化的TCRα基因座完整的人源Vδ、Dδ和Jδ区段库。

[0017] 在一个实施方式中，所述非人动物保留内源性非人源TCRα和/或TCRβ基因座，其中所述基因座是非功能性基因座。

[0018] 在一个实施方式中，所述非人动物是啮齿动物。在一个实施方式中，所述啮齿动物选自小鼠和大鼠。在一个实施方式中，所述啮齿动物是小鼠。

[0019] 在一个方面，本发明提供了一种基因修饰的小鼠，所述小鼠在其基因组中包含(a)未经重排的TCRα可变基因基因座，其包含与非人源(例如小鼠或大鼠)TCRα恒定基因序列可操作地连接的人源Jα区段库和人源Vα区段库，和/或(b)未经重排的TCRβ可变基因基因座，其包含与非人源(例如小鼠或大鼠)TCRβ恒定基因序列可操作地连接的人源Jβ区段库、人源Dβ区段库和人源Vβ区段库。在一个实施方式中，所述小鼠包含完整的人源Vα区段库。在一个实施方式中，所述小鼠包含完整的人源Vβ区段库。在一个实施方式中，所述小鼠包含完整的人源Vα区段和人源Jα区段库。在一个实施方式中，所述小鼠包含完整的人源Vα区段和人源Vβ区段库。在一个实施方式中，所述小鼠包含完整的人源Vα、人源Jα、人源Vβ、人源Dβ和人源Jβ区段库。

[0020] 在一个实施方式中，所述小鼠包含至少一个内源性小鼠Vα和至少一个内源性小鼠Jα区段，其中所述内源性区段无法重排以形成经重排的Vα/Jα区段，并且其还包含至少一个内源性小鼠Vβ、至少一个内源性小鼠Dβ和至少一个内源性小鼠Jβ区段，其中所述内源性区段无法重排以形成经重排的Vβ/Dβ/Jβ序列。

[0021] 在一个实施方式中，包含人源TCRα可变区区段的未经重排的TCRα可变基因基因座取代在内源性小鼠TCRα可变基因座的小鼠TCRα可变基因，并且包含人源TCRβ可变区区段的未经重排的TCRβ可变基因基因座取代在内源性小鼠TCRβ可变基因座的小鼠TCRβ可变基因。

[0022] 在一个实施方式中，所述人源Vα和Jα区段重排以形成经重排的人源Vα/Jα序列，并且所述人源Vβ、Dβ和Jβ区段重排以形成经重排的人源Vβ/Dβ/Jβ序列。在一个实施方式中，所述经重排的人源Vα/Jα序列可操作地与小鼠TCRα恒定区序列连接。在一个实施方式中，所述经重排的人源Vβ/Dβ/Jβ序列可操作地与小鼠TCRβ恒定区序列连接。因此，在不同实施方式中，所述小鼠在T细胞表面表达T细胞受体，其中所述T细胞受体包含人源可变区和小鼠恒定区。

[0023] 在一个实施方式中，所述小鼠在人源化的TCRα基因座进一步包含人源TCRδ可变区区段(例如人源Vδ、Jδ和Dδ区段)库。在一个实施方式中，所述人源TCRδ可变区区段库是完整的人源TCRδ可变区区段库。在一个实施方式中，所述人源TCRδ可变区区段在内源性TCRα基因座。在一个实施方式中，所述人源TCRδ可变区区段取代内源性小鼠TCRδ可变区区段。

[0024] 在一个实施方式中，所述基因修饰的小鼠在T细胞表面表达包含人源可变区和小鼠恒定区的T细胞受体。在一个方面，所述小鼠的T细胞经历胸腺T细胞发育以产生CD4和CD8单阳性T细胞。在一个方面，所述小鼠包含正常的脾脏CD3+T细胞与总脾脏细胞的比率；在一个方面，所述小鼠针对目的抗原产生中心和效应记忆T细胞群。

[0025] 本申请还提供了制备本申请所述的基因修饰的非人动物(例如啮齿动物，例如小鼠或大鼠)的方法。

[0026] 在一个方面，本申请提供了一种制备人源化的啮齿动物(例如小鼠或大鼠)的方法，所述方法包括在内源性啮齿动物TCR基因座用人源未经重排的TCRα和TCRβ可变区区段取代啮齿动物TCRα和TCRβ可变区区段，而非啮齿动物恒定基因。在一个实施方式中，所述方法包含用人源TCRα可变区区段(Vα和/或Jα)取代啮齿动物TCRα可变区区段(Vα和/或Jα)，其中所述TCRα可变区区段可操作地与非人源TCR恒定区基因连接以形成人源化的TCRα基因座，以及用人源TCRβ可变区区段(Vβ和/或Dβ和/或Jβ)取代啮齿动物TCRβ可变区区段(Vβ和/或Dβ和/或Jβ)，其中所述TCRβ可变区区段可操作地与非人源TCR恒定区基因连接以形成人源化的TCRβ基因座。在一个实施方式中，所述人源化的啮齿动物是小鼠并且所述小鼠的种系包含在内源性TCRα基因座可操作地与内源性小鼠TCRα恒定序列连接的人源TCRα可变区区段；并且所述小鼠的种系包含在内源性TCRβ基因座可操作地与内源性小鼠TCRβ恒定序列连接的人源TCRβ可变区区段。

[0027] 在一个实施方式中，本申请提供了一种制备基因修饰的非人动物(例如啮齿动物，例如小鼠或大鼠)的方法，所述动物在T细胞表面表达包含人源或人源化的可变区和非人源(例如啮齿动物)恒定区的T细胞受体，所述方法包括：在第一非人动物的内源性非人源TCRα可变基因基因座用未经重排的人源化的TCRα可变基因基因座取代内源性非人源TCRα可变基因基因座，所述人源化的TCRα可变基因基因座包括至少一个人源Vα区段和至少一个人源Jα区段，其中所述人源化的TCRα可变基因基因座可操作地与内源性非人源TCRα恒定区连接；在第二非人动物的内源性非人源TCRβ可变基因基因座用未经重排的人源化的TCRβ可变基因基因座区段取代内源性非人源TCRβ可变基因基因座，所述人源化的TCRβ可变基因基因座包括至少一个人源Vβ区段、至少一个人源Dβ区段和至少一个人源Jβ区段，其中所述人源化的TCRβ可变基因基因座可操作地与内源性TCRβ恒定区连接；以及将所述第一和第二非人动物交配以获得表达包含人源或人源化可变区和非人源恒定区的T细胞受体的非人动物。

[0028] 在所述方法的一个实施方式中，所述内源性非人源(例如啮齿动物)Vα和Jα区段无法重排以形成经重排的Vα/Jα序列并且所述内源性非人源(例如啮齿动物)Vβ、Dβ和Jβ区段无法重排以形成经重排的Vβ/Dβ/Jβ序列。在所述方法的一个实施方式中，所述人源Vα和Jα区段重排以形成经重排的Vα/Jα序列并且所述人源Vβ、Dβ和Jβ区段重排以形成经重排的Vβ/Dβ/Jβ序列。在所述方法的一个实施方式中，所述未经重排的人源化的TCRα可变基因基因座包含61个人源Jα区段和8个人源Vα区段，以及所述未经重排的人源化的TCRβ可变基因基因座包含14个人源Vβ区段、2个人源Dβ区段和14个人源Jβ区段。在所述方法的另一个实施方式

中，所述未经重排的人源化的TCRα可变基因基因座包含完整的人源Jα区段库和完整的人源Vα区段库，以及所述未经重排的人源化的TCRβ可变基因基因座包含完整的人源Vβ区段库、完整的人源Dβ区段库和完整的人源Jβ区段库。

[0029] 在所述方法的一个方面，所述非人动物(例如啮齿动物)的T细胞经历胸腺T细胞发育以产生CD4和CD8单阳性T细胞。在一个方面，所述非人动物(例如啮齿动物)包含正常的脾脏CD3+T细胞与总脾脏细胞的比率。在一个方面，所述非人动物(例如啮齿动物)针对目的抗原生成中心和效应记忆T细胞群。

[0030] 在一些实施方式中，本申请所述的内源性非人源TCRα可变基因基因座的取代在单个ES细胞中进行，并且将所述单个ES细胞引入非人源(例如啮齿动物，例如小鼠或大鼠)胚胎以制备基因修饰的非人动物(即，第一非人动物，例如第一啮齿动物)；以及本申请所述的内源性非人源TCRβ可变基因基因座的取代在单个ES细胞中进行，并且将所述单个ES细胞引入非人源(例如啮齿动物，例如小鼠或大鼠)胚胎以制备基因修饰的非人动物(即，第二非人动物，例如第二啮齿动物)。在一个实施方式中，将所述第一啮齿动物和第二啮齿动物交配以形成子代，其中所述子代在其种系中包含人源化的TCRα可变基因座和人源化的TCRβ可变基因座。

[0031] 在所述方法的一个实施方式中，所述非人动物是啮齿动物例如小鼠。因此，本发明还提供了一种制备基因修饰的小鼠的方法。

[0032] 本申请还提供了一种来源于本申请所述的非人动物(例如啮齿动物，例如小鼠或大鼠)的细胞，例如分离的T细胞(例如细胞毒性T细胞、辅助T细胞、记忆T细胞等)。本申请还提供了来源于本申请所述的非人动物的组织和胚胎。

[0033] 在一个方面，本申请提供了一种制备人源TCR可变结构域的方法，所述方法包含如本申请所述的将啮齿动物进行基因修饰使其包含人源化的TCRα基因座和/或人源化的TCRβ基因座，将所述啮齿动物保持在足以形成T细胞的条件下，其中所述T细胞表达人源TCRα和/或人源TCRβ可变结构域。

[0034] 在一个方面，本申请提供了一种制备编码与目的表位结合的人源TCR可变结构域的核酸序列的方法，所述方法包括将如本申请所述的非人动物与目的表位接触，使所述非人动物保持在足以使所述动物将目的表位递呈至动物的人源化的TCR上的条件下，并且鉴定所述动物编码与目的表位结合的人源TCR可变结构域多肽的核酸。

[0035] 在一个方面，本申请提供了将如本申请所述的非人动物用于制备人源化的TCR受体的用途。在一个方面，本申请提供了将如本申请所述的非人动物用于制备人源TCR可变结构域的用途。在一个方面，本申请提供了将如本申请所述的非人动物用于制备编码人源TCR可变结构域的核酸序列的用途。

[0036] 在一个方面，本申请提供了编码人源TCR可变结构域或其片段的核酸序列用于制备抗原结合蛋白的用途。在一个实施方式中，所述抗原结合蛋白包含TCR可变结构域，其包含与目的抗原结合的人源TCRα和/或人源TCRβ可变结构域。

[0037] 在一个方面，本申请提供了如本申请所述的非人动物用于制备在其表面上表达人源化的T细胞受体的非人源细胞的用途。

[0038] 在一个方面，本申请提供了来自如本申请所述的非人动物的人源化的T细胞受体。

[0039] 在一个方面，本申请提供了在如本申请所述的非人动物中制备的编码人源TCR可

变结构域或其片段的核酸序列。

[0040] 本申请所述的任何实施方式和方面均可以彼此结合使用，除非另有说明或在上下文中是显而易见的。通过对随后的详细描述的综述其他实施方式对本领域技术人员而言将是显而易见的。下文的详细描述包括对本发明不同实施方式的示例性描述，其对所主张的发明不具有限制性。附图构成了本说明书的一部分，其与说明书一起仅用于展示实施方式，而不是限制本发明。

[0041] 附图的简要说明

[0042] 图1描述了在小鼠中TCR分子和MHC分子之间的相互作用：左图显示了人源化的TCR小鼠的小鼠T细胞(上)，其包含具有人源可变TCR结构域和小鼠恒定TCR结构域的T细胞受体，其识别由抗原递呈细胞(下)通过MHC I类分子递呈的抗原(灰色的球)；右图显示了通过MHC II类分子递呈的相同过程。MHC I和MHC II复合物与其各自的辅助受体CD8和CD4一起显示。小鼠区用黑色表示和人源区用白色表示。

[0043] 图2描述了(未按照比例)小鼠(上图，第一基因座)和人源(上图，第二基因座)TCRα基因座的一般组织结构。下图展示了在14号染色体的内源性小鼠基因座用人源TCRα可变区区段(空心符号)取代小鼠中(实心符号)的TCRα可变区区段的策略；具有人源Vα和Jα区段的人源化的TCRα基因座与小鼠恒定区和小鼠增强子在图中一起显示；在所显示的实施方式中，TCRδ基因座在人源化过程中缺失。

[0044] 图3描述了(未按照比例)将小鼠TCRα基因座逐步人源化的策略，其中TCRα可变区基因区段被顺序添加至初始人源化的缺失的小鼠基因座(MAID1540)的上游。小鼠序列以实心符号表示；人源序列以空心符号表示。MAID指代经修饰的等位基因ID编号。TRAV＝TCR Vα区段，TRAJ＝TCR Jα区段(hTRAJ＝人源TRAJ)，TRAC＝TCR Cα结构域，TCRD＝TCRδ。

[0045] 图4是对在TCRα基因座逐步人源化策略的详细描述(未按照比例)。图4A描述了小鼠TCRαV和J区段的缺失过程；图4B描述了将2V和61J人源区段插入缺失的小鼠TCRα基因座的策略；图4C描述了插入附加人源V区段的策略，导致产生共计8个V和61个J人源区段；图4D描述了插入附加人源V区段的策略，导致产生共计23个V和61个J人源区段；图4E描述了导致产生35个V和61个J人源区段的附加人源V区段的插入的策略；图4F描述了导致产生48个V和61个J人源区段的附加人源区段的插入的策略；和图4G描述了导致产生54个V和61个J人源区段的附加人源区段的插入的策略。MAID指代经修饰的等位基因ID编号。

[0046] 图5描述了(未按照比例)小鼠TCRα基因座人源化策略的一个实施方式，其中人源TCRδ序列(TCRδVs、TCRδDs、TCRδJs、TCRδenh(增强子)和TCRδ恒定(C))也位于人源化的TCRα基因座。小鼠序列以实心符号表示；人源序列以空心符号表示。LTVEC表示较大的靶向载体；hTRD＝人源TCRδ。

[0047] 图6描述了(未按照比例)小鼠(上图，第一基因座；在小鼠6号染色体上)和人源(上图，第二基因座；在人7号染色体上)TCRβ基因座的一般组织结构。下图展示了在小鼠6号染色体的内源性小鼠基因座用人源TCRβ可变区区段(空心符号)取代小鼠中(实心符号)的TCRβ可变区区段的策略。具有人源Vβ，Dβ，and Jβ区段的人源化的TCRβ基因座与小鼠恒定区和小鼠增强子在图中一起显示；在所显示的实施方式中，所述人源化的基因座保留了小鼠胰蛋白酶原基因(实心长方形)；以及在所显示的特定实施方式中，在5’小鼠胰蛋白酶原基因上游保留了单一小鼠V区段。

[0048] 图7描述了(未按照比例)将小鼠TCRβ基因座逐步人源化的策略,其中TCRβ可变区基因区段被顺序添加至缺失的小鼠TCRβ可变基因座。小鼠序列以实心符号表示;人序列以空心符号表示。MAID指代经修饰的等位基因ID编号。TRBV或TCRBV=TCRβV区段。

[0049] 图8是对在TCRβ基因座逐步人源化策略的详细描述。图8A描述了小鼠TCRβV区段缺失的策略;图8B描述了将14个V区段插入缺失的TCRβ基因座的策略;图8C描述了将2个D和14个J区段插入TCRβ基因座(i)的策略,随后loxP位点缺失(ii),导致产生14个V、2个D和14个J人源区段;图8D描述了导致产生40个V、2个D和14个J人源区段的附加人源V区段的插入的策略;和图8E描述了导致产生66个V、2个D和14个J人源区段的附加人源V区段的插入的策略;图8F描述了对小鼠增强子下游的小鼠V区段的取代,导致产生67个V、2个D和14个J人源区段。在这个特定的实施方式中,一个小鼠V区段是保留的小鼠胰蛋白酶原基因的5'端。

[0050] 图9描述了使用抗-CD3抗体染色的脾细胞百分率的典型FACS分析直方图(其中Y轴是细胞数,X轴是平均荧光强度,以及分子栅显示了在单一淋巴细胞群中CD3+T细胞的频率)。其中所包括的小鼠种类有:野生型(WT)小鼠、缺失TCRα基因座的纯合子小鼠(第一幅上图;图3的MAID 1540);缺失TCRα基因座且包含8个人源Vα和61个人源Jα区段的纯合子小鼠(第二幅上图;图3的MAID 1767或人源化的TCRα小鼠);除了一个上游和一个下游小鼠Vβ区段以外缺失了TCRβ基因座的纯合子小鼠(第一幅下图;图7的MAID 1545);缺失了除一个上游和一个下游小鼠Vβ区段外的TCRβ基因座且包含14个人源Vβ、2个人源Dβ和14个人源Jβ区段的纯合子小鼠(第二幅下图;图7的MAID 1716或人源化的TCRβ小鼠)以及TCRα和TCRβ基因座缺失(除了所述的两个小鼠Vβ区段以外)且在内源性TCRα基因座包含8个人源Vα和61个人源Jα区段以及在内源性TCRβ基因座包含14个人源Vβ、2个人源Dβ和14个人源Jβ区段的纯合子小鼠(MAID1767/1716或人源化的TCRα/β小鼠)。

[0051] 图10是来自使用抗-CD4(Y轴)和抗-CD8(X轴)抗体(上图)以及抗-CD44(Y轴)和抗-CD25(X轴)抗体(下图)染色的WT、人源化的TCRα纯合子(1767 HO;hTCRα)、人源化的TCRβ纯合子(1716 HO;hTCRβ)和人源化的TCRα/β纯合子小鼠(1716 HO 1767 HO;hTCRα/β)的小鼠胸腺细胞的典型FACS等高线图。在上图中的FACS曲线能够区分双阴性(DN)、双阳性(DP)、CD4单阳性(CD4SP)和CD8单阳性(SP CD8)T细胞。在下图中的FACS曲线能够区分在T细胞发育过程中不同阶段的双阴性T细胞(DN1、DN2、DN3和DN4)。1716和1767指代图3和图7中指定的MAID编号。

[0052] 图11表示在WT、hTCRα(1767 HO);hTCRβ(1716 HO)或hTCRα/β(1716 HO 1767 HO)小鼠(n=4)的胸腺中DN、DP、CD4SP和CD SP T细胞的频率(上图)或绝对数量(下图)。

[0053] 图12是WT、hTCRα(1767 HO)、hTCRβ(1716 HO)或hTCRα/β(1716 HO 1767 HO)小鼠脾细胞的典型FACS分析:左图表示基于抗-CD19抗体(Y轴;对B淋巴细胞染色)或抗-CD3抗体(X轴;对T淋巴细胞染色)染色的单细胞的分析;中图表示基于抗-CD4(Y轴)或抗-CD8(X轴)抗体染色的CD3+细胞的分析和右图表示基于抗-CD44(Y轴)或抗-CD62L(X轴)抗体染色的CD4+或CD8+细胞的分析,所述染色能够区分外周不同类型的T细胞(初始T细胞vs.中心记忆T细胞(Tcm)vs.效应或效应记忆T细胞(Teff/Tem))。

[0054] 图13表示了WT、hTCRα(1767 HO)、hTCRβ(1716 HO)或hTCRα/β(1716 HO 1767 HO)小鼠(n=4)每个脾脏(Y轴)中CD4+(左图)或CD8+(右图)T细胞的数量。

[0055] 图14表示了WT、hTCRα(1767 HO)、hTCRβ(1716 HO)或hTCRα/β(1716 HO 1767 HO)

小鼠(n＝4)每个脾脏(Y轴)的CD4+(上图)或CD8+(下图)T细胞中T初始、Tcm和Teff/em细胞的数量。

[0056] 图15为汇总了在WT、hTCRβ(1716 HO)或hTCRα/β(1716 HO 1767 HO)小鼠的脾脏CD8+T细胞(图15A)或CD4+T细胞(图15B)中不同人源TCRβV区段的表达情况(使用可变区段特异性抗体通过FACS分析确定)的表格。数据以平均值±SD表示(n＝4只小鼠每组)。

[0057] 图16描述了在胸腺或脾脏T细胞中存在于WT、hTCRα(1767 HO);hTCRβ(1716 HO)或hTCRα/β(1716 HO 1767 HO)小鼠的的不同人源TCRβV区段mRNA的表达情况(Y轴);图16A表示对人源TCRβ可变区段(hTRBV)18、19、20和24mRNA表达情况的分析和图16B表示对hTRBV25、27、28和29mRNA表达情况的分析。

[0058] 图17描述了使用抗-CD3抗体染色的脾细胞(其中Y轴是细胞数,X轴是平均荧光强度和分子栅显示了在单一淋巴细胞群中CD3+T细胞的频率)的典型FACS直方图。其中所包括的小鼠有:WT小鼠、缺失TCRα基因座的纯合子小鼠(TCRAΔV)、缺失TCRα基因座且具有2个人源V区段和61个人源J区段的纯合子小鼠(TCRA 2hV;图3的MAID 1626)、缺失TCRα基因座且具有8个人源V区段和61个人源J区段的纯合子小鼠(TCRA 8hV;图3的MAID 1767)以及缺失TCRα基因座且具有23个人源V区段和61个人源J区段的纯合子小鼠(TCRA 23hV;图3的MAID 1979)。。

[0059] 图18,左上图,是使用抗-CD4(Y轴)或抗-CD8(X轴)抗体染色的从WT或具有23个人源V区段和61个人源J区段的纯合hTCRα小鼠(1979HO)获得的胸腺的CD3+T细胞典型FACS分析;左下图是抗-CD44(Y轴)或抗-CD25(X轴)染色的来自WT或1979小鼠的DN T细胞的FACS分析;右图是表示在WT或1979HO小鼠(n＝4)中DN、DP、CD4SP或CD8SP的胸腺细胞的百分率(Y轴)的图。

[0060] 图19,左图是使用抗-CD19或抗-CD3抗体染色的来自WT或1979Ho小鼠的脾脏淋巴细胞的典型FACS分析;右图是表示从WT和1979HO小鼠(n＝4)获得的CD3+的脾脏细胞百分率(Y轴)的图。

[0061] 发明详述

[0062] 定义

[0063] 本发明提供了基因修饰的非人动物,例如啮齿动物例如小鼠或大鼠,其表达人源化的T细胞受体。本发明还涉及基因修饰的非人动物,所述动物在其种系中包含未经重排的T细胞受体可变基因基因座。本申请还提供了包含其的胚胎、细胞和组织;制备其的方法;以及使用其的方法。除非另有定义,否则本申请使用的所有术语和短语包括所述术语和短语在本领域中所具有的含义,除非有相反的明确说明或根据使用所述术语或短语的上下文是显而易见的。

[0064] 当用于描述保守的氨基酸取代时,术语“保守的”包括氨基酸残基被另一个具有带有相似化学特性(例如电荷或疏水性)的侧链R基的氨基酸残基取代。保守的氨基酸取代可以通过修饰核苷酸序列来实现以引入将会编码保守取代的核苷酸变化。在通常情况下,保守的氨基酸取代将基本上不会改变目的蛋白的功能性特性,例如T细胞识别由MHC分子递呈的肽的能力。具有带有相似化学特性的侧链的氨基酸基团的例子包括脂肪族侧链如甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸;脂肪族-羟基侧链如丝氨酸和苏氨酸;含有酰胺的侧链如天冬酰胺和谷胺酰胺;芳香侧链如苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸;碱性侧链如赖氨酸、

精氨酸和组氨酸;酸性侧链如天冬氨酸和谷氨酸;和含硫侧链如半胱氨酸和甲硫氨酸。保守的氨基酸取代基团包括例如缬氨酸/亮氨酸/异亮氨酸、苯丙氨酸/酪氨酸、赖氨酸/精氨酸、丙氨酸/缬氨酸、谷氨酸/天冬氨酸和天冬酰胺/谷氨酰胺。在一些实施方式中,保守的氨基酸取代可以是蛋白中的任意天然残基被丙氨酸取代,例如用于丙氨酸扫描诱变。在一些实施方式中,制备在PAM250log-似然性矩阵中具有正值的保守取代,如Gonnet等,((1992)Exhaustive Matching of the Entire Protein Sequence Database,Science 256:1443-45)所公开的,其通过引用并入本申请。在一些实施方式中,所述取代是适度的保守取代,其中所述取代在PAM250log-似然性矩阵中具有非负值。

[0065] 因此,本发明还包括一种基因修饰的非人动物,所述动物表达人源化的TCRα和β多肽(和/或人源化的TCRδ和TCRγ多肽),其中所述多肽包含本申请所述的氨基酸序列的保守氨基酸取代。

[0066] 本领域技术人员将理解,除了本申请所述的编码人源化的TCRα和β多肽的核酸残基以外,由于遗传密码的简并性,其他核酸也可以编码本发明的多肽。因此,除了在其基因组中包含编码人源化的TCR多肽的核苷酸序列的基因修饰非人动物以外,本申请还提供了由于遗传密码的简并性使得在其基因组包含不同于本申请所述的核酸序列的非人动物。

[0067] 术语"同一性"当与序列一起使用时包括由本领域公知的能够用于测定核苷酸和/或氨基酸序列同一性的多种不同算法所确定的同一性。在本申请所述的一些实施方式中,使用open gap罚分为10.0和extend gap罚分为0.1的ClustalW v.1.83(slow)算法和使用Gonnet相似性矩阵(MacVector™10.0.2,MacVector Inc.,2008)确定同一性。用于序列同一性比较的序列的长度取决于特定的序列。在不同实施方式中,通过从其N末端至C末端对成熟蛋白的序列进行比较确定同一性。在不同实施方式中,当将人源/非人源嵌合序列与人序列进行比较时,将所述人源/非人源嵌合序列的人源部分(而不是非人源部分)用于比较,以确定人源序列和人源/非人源嵌合序列的人源部分之间的同一性水平(例如对人源/小鼠嵌合蛋白的人源胞外域与人源蛋白的人源胞外域进行比较)。

[0068] 关于序列的术语"同源性"或"同源的",例如核苷酸或氨基酸序列,是指的两条序列经最佳排列对齐和比较,具有至少约75%的核苷酸或氨基酸、至少约80%的核苷酸或氨基酸、至少约90-95%的核苷酸或氨基酸,例如超过97%的核苷酸或氨基酸是相同的。本领域技术人员将理解,对于最佳基因靶向而言,靶向构建体应含有与内源性DNA序列同源的臂(即"同源臂");因此,在靶向构建体与被靶向的内源性序列之间能够发生同源重组。

[0069] 术语"可操作地连接"指并列,其中被这样描述的组分处于允许其以预计方式发挥功能的关系中。由此,编码蛋白的核酸序列可以可操作地与调控序列(例如启动子、增强子、沉默子序列等)连接,以保留合适的转录调控。此外,本发明的人源化的蛋白的不同部分可以可操作地与细胞中保留合适的折叠、加工、靶向、表达和其他功能特性的蛋白连接。除非另有明示,本发明的人源化的蛋白的不同结构域彼此之间被可操作地连接。

[0070] 关于基因取代的术语"取代"指在内源性遗传基因座放入外源性遗传物质,以用直系同源或同源核酸序列取代全部或部分内源性基因。在一个例子中,内源性非人源基因或其片段被相应的人源基因或其片段取代。相应的人源基因或其片段是所取代的内源性非人基因或其片段的直系同源物、同源物或在结构和/或功能上与其基本相同或相同的人源基因或其片段。如下文中的实施例所示,内源性非人源TCRα和β可变基因基因座的核苷酸序列

被与人源TCRα和β可变基因基因座对应的核苷酸序列取代。

[0071] 如本申请所使用的“功能性”，例如功能性蛋白，指保留通常与天然蛋白相关联的至少一个生物活性的蛋白。例如，在本发明的一些实施方式中，在内源性基因座的取代(例如在内源性非人源TCRα、TCRβ、TCRδ和/或TCRγ可变基因基因座的取代)使得基因座无法表达功能性内源性蛋白。

[0072] 如本申请所使用的TCR基因座或TCR基因基因座(例如TCRα基因座或TCRβ基因座)指包含TCR编码区的基因组DNA，其包括整个TCR编码区，包括未经重排的V(D)J序列、增强子序列、恒定序列和任意上游或下游(UTR、调控区等)或介于中间的DNA序列(内含子等)。TCR可变基因座或TCR可变基因基因座(例如TCRα可变基因基因座或TCRβ可变基因基因座)指包含包括TCR可变区区段(V(D)J区)但不包括TCR恒定序列的区域的基因组DNA，并且在不同实施方式中，不包含增强子序列。出于基因操作(例如选择性表达盒、限制性位点等)的目的其他序列可以包括在TCR可变基因基因座中，并且这些包括在本申请中。

[0073] 基因修饰的TCR动物

[0074] 在不同实施方式中，本发明通常提供了基因修饰的非人动物，其中所述非人动物在其基因组中包含未经重排的人源化的TCR可变基因基因座。

[0075] T细胞结合与主要组织相容性复合物(MHC；在小鼠中)或人白细胞抗原(HLA；在人中)复合物结合的抗原递呈细胞表面上的小抗原决定簇上的表位。T细胞通过T细胞表面上的T细胞受体(TCR)复合物与这些表位结合。T细胞受体是由两种类型的链组成的异二聚体结构：α(alpha)和β(beta)链，或者γ(gamma)和δ(delta)链。α链是由位于α基因座(在人或小鼠14号染色体上)内的核酸序列编码的，其也包括整个δ基因座，并且β链是由位于β基因座(在小鼠6号染色体或人7号染色体上)内的核酸序列编码的。大多数T细胞具有αβTCR；而少数T细胞具有γδTCR。TCR与MHC I类(递呈至CD8+T细胞)和MHC II类(递呈至CD4+T细胞)分子之间的相互作用见图1(实心符号表示非人源序列；空心符号表示人源序列，显示了本发明TCR蛋白的一个特定实施方式)。

[0076] T细胞受体α和β多肽(以及类似地γ和δ多肽)通过二硫键彼此连接。组成TCR的两个多肽中的每一个均含有胞外结构域，所述胞外结构域包含恒定和可变区、跨膜结构域和胞质尾(跨膜结构域和胞质尾也是恒定区的一部分)。TCR的可变区决定其抗原特异性，并且与免疫球蛋白类似，其包含3个互补性决定区(CDR)。亦与免疫球蛋白基因类似，T细胞受体可变基因基因座(例如TCRα和TCRβ基因座)含有多个未经重排的V(D)J片段(可变(V)、连接(J)以及在TCRβ和δ中的多样性(D)区段)。在胸腺中的T细胞发育过程中，TCRα可变基因基因座经历重排，以使得所得到的TCRα链由VJ区段的特定组合(Vα/Jα序列)编码；以及TCRβ可变基因基因座经历重排，以使得所得到的TCRβ链由VDJ区段的特定组合(Vβ/Dβ/Jβ序列)编码。

[0077] 与胸腺基质的相互作用触发胸腺细胞经历若干发育阶段，其特征为表达不同细胞表面标记物。在胸腺中不同发育阶段特征性细胞表面标记物的概述见表1。在TCRβ可变基因基因座的重排始于DN2阶段并且在DN4阶段结束，而TCRα可变基因基因座的重排发生在DP阶段。在TCRβ基因座重排完成后，所述细胞在细胞表面表达TCRβ链以及替代性α链pTα。参见Janeway’s Immunobiology，第7章，如上所述。

[0078] 表1：在胸腺中T细胞的发育阶段

[0079]

发育阶段	DN1	DN2	DN3	DN4	DP	SP
标记物	CD44+/CD25-	CD44+/CD25+	CD4 低/CD25+	CD44-/CD25-	CD4+/CD8+	CD4+或CD8+

[0080] 初始CD4+和CD8+T细胞离开胸腺并进入外周淋巴器官(例如脾脏)与抗原接触,并且其被活化以克隆扩增并分化成多个效应T细胞(Teff),例如细胞毒性T细胞、T_{REG}细胞、T_H17细胞、T_H1细胞、T_H2细胞等。感染之后,多个T细胞持续作为记忆T细胞,并且被分类为中心记忆T细胞(Tcm)或效应记忆T细胞(Tem)。Sallusto等,(1999)Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions,Nature 401:708-12and Commentary by Mackay(1999)Dual personality of memory T cells, Nature 401:659-60。Sallusto及其同事提出在最初感染后,Tem细胞是在外周组织中易于获得的具有效应功能的抗原激发的记忆T细胞的混合物,而Tcm细胞是在外周淋巴器官中抗原激发的记忆T细胞,其在次级刺激后能够形成新的效应T细胞。尽管所有记忆T细胞均表达CD45的CD45RO同种型(初始T细胞表达CD45RA同种型),但是Tcm的特征为表达L-选择素(也称为CD62L)和CCR7+,其对于与外周淋巴器官和淋巴结的结合和传递信号非常重要,如上所述。因此,在外周淋巴器官(例如初始T细胞、Tcm细胞等)中的所有T细胞均表达CD62L。除了CD45RO以外,已知所有记忆T细胞均表达多种不同的细胞表面标记物例如CD44。对T细胞上不同细胞表面标记物的概述,参见Janeway's Immunobiology,第10章,如上所述。

[0081] 尽管TCR可变结构域的功能主要是抗原识别,但是TCR恒定结构域的胞外部分以及跨膜和胞质结构域均具有重要功能。完整的TCR受体复合物不仅需要α和β或γ和δ多肽;还需要其他分子包括CD3γ、CD3δ和CD3ε以及ζ链同源二聚体(ζζ)。在TCRβ重排完成后,当细胞表达TCRβ/pTα时,该前-TCR复合物与CD3一起存在于细胞表面。在细胞表面的TCRα(或pTα)在其跨膜结构域具有两个碱性残基,一个募集CD3γε异二聚体,另一个通过其各自的酸性残基募集ζζ。TCRβ在其跨膜结构域具有附加的碱性残基,据信其募集CD3δε异二聚体。参见例如Kuhns等,(2006)Deconstructing the Form and Function of the TCR/CD3 Complex,Immunity 24:133-39;Wucherpfennig等,(2009)Structural Biology of the T-cell Receptor:Insights into Receptor Assembly,Ligand Recognition,and Initiation of Signaling,Cold Spring Harb.Perspect.Biol.2:a005140。组装的复合物,包含TCRαβ异二聚体、CD3γε、CD3δε和ζζ,在T细胞表面表达。已提出跨膜结构域的极性残基是用于控制离开内质网的TCR链的质量;已证实在缺乏CD3亚基时,TCR链保留在ER中并靶向降解。参见例如Call和Wucherpfennig(2005)The T Cell Receptor:Critical Role of the Membrane Environment in Receptor Assembly and Function, Annu.Rev.Immunol.23:101-25。

[0082] 由于TCRαβ异二聚体(或TCRγδ异二聚体)自身缺乏信号转导活性,所组装复合物的CD3和ζ链提供了TCR信号的组分。每个CD3链各具有一个免疫受体酪氨酸活化基序(ITAM),而ζ链含有三个串联ITAM。ITAM含有能够被相连的激酶磷酸化的酪氨酸残基。因此,组装的TCR-CD3复合物含有10个ITAM基序。参见例如Love和Hayes(2010)ITAM-Mediated Signaling by the T-Cell Antigen Receptor,Cold Spring Harb.Perspect.Biol.2: e002485。在TCR接合后,ITAM基序被Src家族酪氨酸激酶Lck和Fyn磷酸化,启动信号级联,导

致Ras活化、钙动员、肌动蛋白细胞骨架重排和转录因子活化，其最终均会导致T细胞分化、增殖和效应器作用。如上所述，亦参见Janeway's Immunobiology，第7版，Murphy等编写，Garland Science，2008，其均通过引用并入本申请。

[0083] 此外，认为TCRβ跨膜和胞质结构域在线粒体靶向和诱导凋亡中具有作用；事实上，天然发生的N-末端截短的TCRβ分子存在于胸腺细胞中。Shani等，(2009) Incomplete T-cell receptor--βpeptides target the mitochondrion and induce apoptosis，Blood 113:3530-41。因此，TCR恒定区具有若干重要的功能(其在不同实施方式中包含部分胞外以及跨膜和胞质结构域)；并且在不同实施方式中，当设计人源化的TCR或表达其的基因修饰的非人动物时应考虑这一区域的结构。

[0084] 经重排的T细胞受体序列的转基因小鼠是本领域公知的。本发明涉及基因修饰的非人动物(例如啮齿动物，例如大鼠、小鼠)，所述动物包含未经重排的人源或人源化的T细胞可变基因基因座，所述基因座能够重排以形成编码人源T细胞受体可变结构域的核酸序列，其包括包含T细胞的动物，所述T细胞包含经重排的人源可变结构域和非人源(例如小鼠或大鼠)恒定区。本发明还提供了非人动物(例如啮齿动物，例如大鼠、小鼠)，所述动物能够生成多样性的人源T细胞受体可变区序列库；因此，本发明提供了非人动物，所述动物表达具有完全人源可变结构域的TCR，其针对目的抗原产生应答并且与目的抗原的表位结合。在一些实施方式中，本申请提供了非人动物，所述动物生成能够与不同抗原反应的多样性的T细胞受体库，所述抗原包括但不限于抗原递呈细胞(APC)递呈的抗原。

[0085] 在一个实施方式中，本发明提供了基因修饰的非人动物(例如啮齿动物，例如大鼠、小鼠)，所述动物在其基因组中包含未经重排的人源TCR可变区区段(V(D)J区段)，其中所述未经重排的人源TCR可变区区段在内源性非人源(例如啮齿动物)TCR可变基因基因座(例如TCRα、β、δ和/或γ可变基因基因座)取代内源性非人源TCR可变区区段。在一个实施方式中，未经重排的人源TCR可变基因基因座取代内源性非人源TCR可变基因基因座。

[0086] 在另一个实施方式中，本发明提供了基因修饰的非人动物(例如啮齿动物，例如大鼠、小鼠)，所述动物在其基因组中包含未经重排的人源TCR可变区区段(V(D)J区段)，其中所述未经重排的人源TCR可变区区段可操作地与非人源TCR恒定区基因序列连接，导致产生人源化的TCR基因座，其中所述人源化的TCR基因座在基因组中的位点不同于内源性非人源TCR基因座。因此，在一个实施方式中，本申请还提供了一种包含转基因的非人动物(例如啮齿动物，例如小鼠、大鼠)，所述转基因包含与非人源TCR恒定区序列可操作地连接的未经重排的人源TCR可变区区段。

[0087] 在一个方面，本发明基因修饰的非人动物在其基因组中包含人源TCR可变区区段，同时保留非人源(例如啮齿动物，例如小鼠、大鼠)TCR恒定基因区段。在不同实施方式中，恒定区包括TCR的跨膜结构域和胞质尾。因此，在本发明的不同实施方式中，所述基因修饰的非人动物保留了内源性非人源TCR跨膜结构域和胞质尾。在其他实施方式中，非人动物包含非人源非内源性TCR恒定基因序列，例如非人源非内源性TCR跨膜结构域和胞质尾。如上文所示，TCR的恒定区参与在抗原激发T细胞活化中启动的信号级联；因此，内源性TCR恒定区与T细胞中的多种非人锚定和信号蛋白相互作用。因此，在一个方面，本发明的基因修饰的非人动物表达人源化的T细胞受体，所述受体保留了募集多种内源性非人源锚定或信号分子的能力，例如CD3分子(例如CD3γ、CD3δ、CD3ε)、ζ链、Lck、Fyn、ZAP-70等。被募集至TCR复

合物的分子的非限制性列表如Janeway's Immunobiology中所述，如上所述。此外，与VELOCIMMUNE®小鼠类似，其显示出正常的B细胞发育和正常的克隆选择过程，据信这至少部分是由于可变区位于内源性小鼠基因座和对小鼠恒定结构域的保留导致的，在一个方面，本发明的非人动物显示出正常的T细胞发育和T细胞分化过程。

[0088] 在一些实施方式中，本申请提供了一种非人动物，所述动物在其基因组中包含未经重排的人源TCRα可变区区段，其中所述未经重排的人源TCRα可变区区段可操作地与非人源TCRα恒定区基因序列连接产生人源化的TCRα基因座。在一个实施方式中，所述人源化的TCRα基因座在基因组中的位点不同于内源性非人源TCRα基因座。在另一个实施方式中，所述未经重排的人源TCRα可变区区段取代内源性非人源TCRα可变区区段而保留内源性非人源TCRα恒定区。在一个实施方式中，所述未经重排的人源TCRα可变基因基因座取代内源性非人源TCRα可变基因基因座。在一些实施方式中，所述动物保留了内源性非人源TCRβ可变区和恒定区基因序列。因此，所述动物表达包含人源/非人源嵌合(即人源化的)TCRα链和非人源TCRβ链的TCR。

[0089] 在其他实施方式中，本申请提供了一种非人动物，所述动物在其基因组中包含未经重排的人源TCRβ可变区区段，其中所述未经重排的人源TCRβ可变区区段可操作地与非人源TCRβ恒定区基因序列连接产生人源化的TCRβ基因座。在一个实施方式中，所述人源化的TCRβ基因座在基因组中的位点不同于内源性非人源TCRβ基因座。在另一个实施方式中，所述未经重排的人源TCRβ可变区区段取代内源性非人源TCRβ可变区区段而保留内源性非人源TCRβ恒定区。在一个实施方式中，所述未经重排的人源TCRβ可变基因基因座取代内源性非人源TCRβ可变基因基因座。在一些实施方式中，所述动物保留了内源性非人源TCRα可变区和恒定区基因序列。因此，所述动物表达包含人源/非人源嵌合(即人源化的)TCRβ链和非人源TCRα链的TCR。

[0090] 在一些特定实施方式中，本发明提供了一种基因修饰的非人动物(例如啮齿动物，例如小鼠或大鼠)，所述动物在其基因组中包括(a)未经重排的T细胞受体(TCR)α可变基因基因座，所述基因座包含至少一个人源Vα区段和至少一个人源Jα区段，其可操作地与内源性非人源(例如啮齿动物，例如小鼠或大鼠)TCRα恒定基因序列连接，和/或(b)未经重排的TCRβ可变基因基因座，所述基因座包含至少一个人源Vβ区段、至少一个人源Dβ区段和至少一个人源Jβ区段，其可操作地与内源性非人源(例如啮齿动物，例如小鼠或大鼠)TCRβ恒定基因序列连接。

[0091] 在本发明的不同实施方式中，未经重排的人源或人源化的TCR可变基因基因座(例如TCRα和/或TCRβ可变基因基因座)包含在非人动物(例如啮齿动物，例如小鼠或大鼠)的种系中。在不同实施方式中，TCR V(D)J片段被未经重排的人源TCR V(D)J片段(例如Vα和Jα，和/或Vβ和Dβ和Jβ片段)的取代在内源性非人源TCR可变基因座(或基因座)上，其中未经重排的人源V和J和/或V和D和J区段可操作地与非人源TCR恒定区基因连接。

[0092] 在本发明的一些实施方式中，所述非人动物包含两个拷贝的未经重排的人源或人源化的TCRα可变基因基因座和/或两个拷贝的未经重排的人源或人源化的TCRβ可变基因基因座。因此，所述非人动物针对一个或两个未经重排的人源或人源化的TCRα和TCRβ可变基因基因座是纯合子。在本发明的一些实施方式中，所述非人动物包含一个拷贝的未经重排的人源或人源化的TCRα可变基因基因座和/或一个拷贝的未经重排的人源或人源化的TCRβ

可变基因基因座。因此，所述非人动物针对一个或两个未经重排的人源或人源化的TCRα和TCRβ可变基因基因座是杂合子。

[0093] 在一个实施方式中，包含人源可变区区段(例如人源Vα和Jα区段)的未经重排的TCRα可变基因基因座位于非人源基因组中以使得所述人源可变区区段取代相应的非人源可变区区段。在一个实施方式中，包含人源可变区区段的未经重排的TCRα可变基因基因座取代内源性TCRα可变基因基因座。在一个方面，内源性非人源Vα和Jα区段无法重排以形成经重排的Vα/Jα序列。因此，在一个方面，在未经重排的TCRα可变基因基因座的人源Vα和Jα区段能够重排以形成经重排的人源Vα/Jα序列。

[0094] 类似地，在一个实施方式中，包含人源可变区区段(例如人源Vβ、Dβ和Jβ区段)的未经重排的TCRβ可变基因基因座位于非人源基因组中以使得所述人源可变区区段取代相应的非人源可变区区段。在一个实施方式中，包含人源可变区区段的未经重排的TCRβ可变基因基因座取代内源性TCRβ可变基因基因座。在一个方面，内源性非人源Vβ、Dβ和Jβ区段不能重排以形成经重排的Vβ/Dβ/Jβ序列。因此，在一个方面，在未经重排的TCRβ可变基因基因座中的人源Vβ、Dβ和Jβ区段能够重排以形成经重排的人源Vαβ/Dβ/Jβ序列。

[0095] 在又一个实施方式中，包含人源可变区区段的未经重排的TCRα和β可变基因基因座分别取代内源性TCRα和β可变基因基因座。在一个方面，内源性非人源Vα和Jα区段无法重排以形成将重排的Vα/Jα序列，并且内源性非人源Vβ、Dβ和Jβ区段无法重排以形成经重排的Vβ/Dβ/Jβ序列。因此，在一个方面，在未经重排的TCRα可变基因基因座的人源Vα和Jα区段能够重排以形成经重排的人源Vα/Jα序列并且在未经重排的TCRβ可变基因基因座的人源Vβ、Dβ和Jβ区段能够重排以形成经重排的人源Vαβ/Dβ/Jβ序列。

[0096] 在本发明的一些方面，所述包含人源化的TCRα和/或TCRβ基因座(包含未经重排的TCRα和/或TCRβ可变基因基因座)的非人动物保留了内源性非人源TCRα和/或TCRβ可变基因基因座。在一个实施方式中，所述内源性非人源TCRα和/或TCRβ可变基因基因座是非功能性基因座。在一个实施方式中，所述非功能性基因座是无活性的基因座，例如反向基因座(例如编码可变基因基因座的核酸序列与恒定区序列的方向相反，这样不可能利用反向基因座的可变区区段成功重排)。在一个实施方式中，所述人源化的TCRα和/或TCRβ可变基因基因座位于内源性非人源TCRα和/或TCRβ可变基因基因座和内源性非人源TCRα和/或TCRβ恒定基因基因座之间。

[0097] 可以使用www.imgt.org的IMGT数据库确定人源和小鼠TCR基因座V和J和/或V、D和J区段的编号、名称、位置以及其他方面。小鼠TCRα可变基因座约为1.5百万碱基并且包含共计110个Vα和60个Jα区段(图2)。人源TCRα可变基因座约为1百万碱基并且包含共计54个Vα和61个Jα区段，据信45个Vα和50个Jα是具有功能的。除非另有明示，在说明书通篇人源V(D)J区段的数量均是指V(D)J区段的总数。在本发明的一个实施方式中，所述基因修饰的非人动物(例如啮齿动物，例如小鼠或大鼠)包含至少一个人源Vα和至少一个人源Jα区段。在一个实施方式中，所述非人动物包含人源化的TCRα基因座，所述基因座包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、23、25、30、35、40、45、48、50或多至54个人源Vα区段。在一些实施方式中，所述人源化的TCRα基因座包含2、8、23、35、48或54个人源Vα区段。因此，在一些实施方式中，在非人动物中的所述人源化的TCRα基因座可以包含5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、

99％或100％的人源Vα；在一些实施方式中，其可以包含约2％、约3％、约15％、约65％、约90％或100％的人源Vα。

[0098] 在一个实施方式中，所述非人动物包含人源化的TCRα基因座，所述基因座包含含有连续的人源Vα40至Vα41(Vα区段也称为“TRAV”或“TCRAV”)人源序列的DNA片段和含有连续的61个人源Jα区段(Jα区段也称为“TRAJ”或“TCRAJ”)人源序列的DNA片段。在一个实施方式中，所述非人动物包含人源化的TCRα基因座，所述基因座包含含有连续的人源TRAV35至TRAV41人源序列的DNA片段和含有连续的61个人源TRAJ人源序列的DNA片段。在一个实施方式中，所述非人动物包含人源化的TCRα基因座，所述基因座包含含有连续的人源TRAV22至TRAV41人源序列的DNA片段和含有连续的61个人源TRAJ人源序列的DNA片段。在一个实施方式中，所述非人动物包含人源化的TCRα基因座，所述基因座包含含有连续的人源TRAV13-2至TRAV41人源序列的DNA片段和含有连续的61个人源TRAJ人源序列的DNA片段。在一个实施方式中，所述非人动物包含人源化的TCRα基因座，所述基因座包含含有连续的人源TRAV6至TRAV41和61个人源TRAJ人源序列的DNA片段。在一个实施方式中，所述非人动物包含人源化的TCRα基因座，所述基因座包含含有连续的人源TRAV1-1至TRAV41和61个人源TRAJ人源序列的DNA片段。在不同实施方式中，包含连续人源TCRα可变区区段人源序列的DNA片段还包含限制性内切酶位点、选择性表达盒、核酸内切酶位点或插入的其他位点以便于在基因座人源化过程中的克隆和选择。在不同实施方式中，这些附加位点不会干扰TCRα基因座不同基因的正常功能(例如重排、剪接等)。

[0099] 在一个实施方式中，所述人源化的TCRα基因座包含61个人源Jα区段，或者100％的人源Jα区段。在一个特定实施方式中，人源化的TCRα基因座包含8个人源Vα区段和61个人源Jα区段；在另一个特定实施方式中，人源化的TCRα基因座包含23个人源Vα区段和61个人源Jα区段。在另一个特定实施方式中，所述人源化的TCRα基因座包含完整的人源Vα和Jα区段库，即由α基因座编码的全部人源可变α区基因区段，或者54个人源Vα和61个人源Jα区段。在不同实施方式中，所述非人动物在TCRα基因座不包含任何内源性非人源Vα或Jα区段。

[0100] 小鼠TCRβ可变基因座约为0.6百万碱基并且包含共计33个Vβ、2个Dβ和14个Jβ区段(图6)。人源TCRβ可变基因座约为0.6百万碱基并且包含共计67个Vβ、2根本Dβ和14个Jβ区段。在本发明的一个实施方式中，所述基因修饰的非人动物(例如啮齿动物，例如小鼠或大鼠)包含至少一个人源Vβ，至少一个人源Dβ和至少一个人源Jα区段。在一个实施方式中，所述非人动物包含人源化的TCRβ基因座，所述基因座包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、23、25、30、35、40、45、48、50、55、60或多至67个人源Vβ区段。在一些实施方式中，所述人源化的TCRβ基因座包含8、14、40、66或67个人源Vβ区段。因此，在一些实施方式中，在非人动物中的所述人源化的TCRβ基因座可以包含5％、10％、15％、20％、25％、30％、35％、40％、45％、50％、55％、60％、65％、70％、75％、80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％、99％或100％的人源Vβ；在一些实施方式中，其可以包含约20％、约60％、约15％、约98％或100％的人源Vβ。

[0101] 在一个实施方式中，所述非人动物包含人源化的TCRβ基因座，所述基因座包含含有连续的人源Vβ18至Vβ29-1(Vβ区段也称为“TRBV”或“TCRBV”)人源序列的DNA片段。在一个实施方式中，所述非人动物包含人源化的TCRβ基因座，所述基因座包含含有连续的人源Vβ18至Vβ29-1人源序列的DNA片段、包含连续的人源Dβ1-Jβ1人源序列的分离的DNA片段(即人源Dβ1-Jβ1-1-Jβ1-6区段)以及包含连续的人源Dβ2-Jβ2人源序列的分离的DNA片段(即人源

Dβ2-Jβ2-1-Jβ2-7区段)。在一个实施方式中,所述非人动物包含人源化的TCRβ基因座,所述基因座包含含有连续的人源TRBV6-5至TRBV29-1人源序列的DNA片段、包含连续的人源Dβ1-Jβ1人源序列的分离的DNA片段(即人源Dβ1-Jβ1-1-Jβ1-6区段)以及包含连续的人源Dβ2-Jβ2人源序列的分离的DNA片段(即人源Dβ2-Jβ2-1-Jβ2-7区段)。在一个实施方式中,所述非人动物包含人源化的TCRβ基因座,所述基因座包含含有连续的人源TRBV1至TRBV29-1人源序列的DNA片段、包含连续的人源Dβ1-Jβ1人源序列的分离的DNA片段以及包含连续的人源Dβ2-Jβ2人源序列的分离的DNA片段。在一个实施方式中,所述非人动物包含人源化的TCRβ基因座,所述基因座包含含有连续的人源TRBV1至TRBV29-1人源序列的DNA片段、包含连续的人源Dβ1-Jβ1人源序列的分离的DNA片段、包含连续的人源Dβ2-Jβ2人源序列的分离的DNA片段以及包含人源TRBV30序列的分离的DNA片段。在不同实施方式中,包含连续人源TCRβ可变区区段人源序列的DNA片段还包含限制性内切酶位点、选择性表达盒、核酸内切酶位点或插入的其他位点以便于在基因座人源化过程中的克隆和选择。在不同实施方式中,这些附加位点不会干扰TCRβ基因座不同基因的正常功能(例如重排、剪接等)。

[0102] 在一个实施方式中,所述人源化的TCRβ基因座包含14个人源Jβ区段或者100%的人源Jβ区段,以及2个人源Dβ区段或者100%人源Jβ区段。在另一个实施方式中,所述人源化的TCRβ基因座包含至少一个人源Vβ区段,例如14个人源Vβ区段,和全部小鼠Dβ和Jβ区段。在一个特定实施方式中,所述人源化的TCRβ基因座包含14个人源Vβ区段、2个人源Dβ区段和14个人源Jβ区段。在另一个特定实施方式中,所述人源化的TCRβ基因座包含完整的人源Vβ、Dβ和Jβ区段库,即由β基因座或者67个人源Vβ、2个人源Dβ和14个人源Jβ区段编码的全部人源可变β区基因区段。在一个实施方式中,所述非人动物在人源化的TCRβ基因座包含一个(例如5')非人源Vβ区段。在不同实施方式中,所述非人动物在TCRβ基因座不包含任何内源性非人源Vβ、Dβ或Jβ区段。

[0103] 在不同实施方式中,其中所述非人动物(例如啮齿动物)包含人源TCRα和TCRβ(和可选择地人源TCRδ和TCRγ)可变区区段库(例如完整的可变区区段库),动物利用不同区段(例如完整的不同区段库)的库针对不同抗原生成多样性的TCR分子库。

[0104] 在不同方面,所述非人动物包含连续的人基因组TCR可变基因座部分,其包含排布在未经重排的人源基因组可变基因座中的V、D和J,或者D和J,或者V和J或者V区段,例如包含排布在人源基因组TCR可变基因座中的启动子序列、先导序列、基因间序列、调控序列等。在其他方面,所述不同区段排布在未经重排的非人基因组TCR可变基因座中。在人源化的TCRα和/或β基因座的不同实施方式中,所述人源化的基因座可以包含两个或多个未并列出现在人源基因组中的人源基因组区段,例如位于与恒定区邻近的人源基因组中的人源V基因座的V区段片段与位于人源V基因座上游末端的人源基因组中的人源V基因座的V区段片段并列。

[0105] 在小鼠和人中,所述TCRδ基因区段位于TCRα基因座(参见图2和5)。TCRδJ和D区段位于Vα和Jα区段之间,而TCRδV区段遍布TCRα基因座,其大部分位于不同Vα区段中。可以从IMGT数据库确定不同TCRδ区段的编号和位置。由于TCRδ基因区段在TCRα基因座中的基因组排布,在TCRα基因座中成功的重排通常删除了TCRδ基因区段。

[0106] 在本发明的一些实施方式中,包含未经重排的人源TCRα可变基因基因座的非人动物还包含至少一个人源Vδ区段,例如多至完整的人源Vδ区段库。因此,在一些实施方式中,

对内源性TCRα可变基因基因座的取代会导致至少一个非人源Vδ区段被人源Vδ区段取代。在其他实施方式中，本发明的非人动物在未经重排的人源化的TCRα基因座包含完整的人源Vδ、Dδ和Jδ区段库；在又一个实施方式中，所述非人源动物在未经重排的人源化的TCRα基因座包含完整的未经重排的人源TCRδ基因座(即包括人源可变区区段以及人源增强子和恒定区的TCRδ基因座)。图5中描述了构建包含完整的未经重排的TCRδ基因座的未经重排的人源化的TCRα基因座的一个示例性实施方式。

[0107] 在又一个实施方式中，本发明的非人动物进一步包含未经重排的人源化的TCRγ基因座，例如包含至少一个人源Vγ和至少一个人源Jγ区段的TCRγ基因座(例如完整的人源Vγ和人源Jγ可变区区段库)。人源TCRγ基因座在人7号染色体上，而小鼠TCRγ基因座在小鼠13号染色体上。TCRγ基因座的详细情况参见IMGT数据库。

[0108] 在一个方面，包含本申请所述的人源化的TCRα和β可变基因基因座(以及可选择地人源化的TCRδ/γ可变基因基因座)的非人动物(例如啮齿动物，例如小鼠或大鼠)在T细胞表面表达人源化的T细胞受体，所述受体包含人源可变区和非人源(例如啮齿动物，例如小鼠或大鼠)恒定区。在一些方面，所述非人动物能够表达识别多种递呈抗原的多样性人源化的T细胞受体库。

[0109] 在本发明的不同实施方式中，本申请所述的人源化的T细胞受体多肽包含人源先导序列。在替代实施方式中，将所述人源化的TCR受体核酸序列进行改造，以使得所述人源化的TCR多肽包含非人源先导序列。

[0110] 本申请所述的人源化的TCR多肽可以在内源性非人源调控元件(例如啮齿动物调控元件)的调控下表达，例如启动子、沉默子、增强子等。或者，本申请所述的人源化的TCR多肽可以在人源调控元件的调控下表达。在不同实施方式中，本申请所述的非人动物进一步包含在人源基因组的原位中通常可见的所有调控序列和其他序列。

[0111] 在不同实施方式中，所述人源化的TCR蛋白的人源可变区能够与相同细胞或其他细胞表面上的不同蛋白相互作用。在一个实施方式中，所述人源化的TCR的人源可变区与在另一个细胞例如抗原递呈细胞(APC)表面上递呈抗原的MHC蛋白(例如MHC I类或II类蛋白)相互作用。在一些实施方式中，所述MHC I或II蛋白是非人源(例如啮齿动物，例如小鼠或大鼠)蛋白。在其他实施方式中，所述MHC I或II蛋白是人源蛋白。在一个方面，所述另一个细胞例如APC是表达人源或人源化的MHC分子的内源性非人源细胞。在不同的实施方式中，所述另一个细胞是表达人源MHC分子的人源细胞。

[0112] 在一个方面，所述非人动物在T细胞表面上表达具有非人源恒定区的人源化T细胞受体，其中所述受体能够与非人源分子例如T细胞上表达的锚定或信号分子(例如CD3分子、ζ链或者通过CD3分子或ζ链锚定于TCR上的其他蛋白)相互作用。

[0113] 因此在一个方面，本申请提供了一种细胞复合物，所述复合物包含表达TCR的非人源T细胞，所述TCR含有本申请所述的人源化的TCRα链和本申请所述的人源化的TCRβ链，以及非人源抗原递呈细胞，其含有与MHC I或MHC II结合的抗原。在一个实施方式中，非人源恒定TCRα和TCRβ链与非人源(ζ)同源二聚体和CD3异二聚体复合。在一个实施方式中，所述细胞复合物是体内细胞复合物。在一个实施方式中，所述细胞复合物是体外细胞复合物。

[0114] 基因修饰的非人动物可以选自下组：小鼠、大鼠、家兔、猪、牛(例如奶牛、公牛、水牛)、鹿、绵羊、山羊、鸡、猫、狗、雪貂、灵长类动物(例如狨猴、猕猴)。对于不易于获得适宜的

可基因修饰的ES细胞的非人动物而言，可以使用其他方法制备包含基因修饰的非人动物。这种方法包括例如修饰非ES细胞基因组(例如成纤维细胞或诱导的多能干细胞)以及应用核转移以便将经修饰的基因组转移至适宜细胞例如卵母细胞，并且在适宜条件下在非人动物中使经修饰的细胞(例如经修饰的卵细胞)妊娠以形成胚胎。

[0115] 在一个方面，所述非人动物是哺乳动物。在一个方面，所述非人动物是小型哺乳动物，例如跳鼠科或鼠科超家族。在一个实施方式中，所述基因修饰的动物是啮齿动物。在一个实施方式中，所述啮齿动物选自小鼠、大鼠和仓鼠。在一个实施方式中，所述啮齿动物选自鼠科超家族。在一个实施方式中，所述基因修饰的动物来自选自丽仓鼠科(例如小鼠样仓鼠)、仓鼠科(例如仓鼠、新世界大鼠和小鼠、田鼠)、鼠科(真小鼠和大鼠、沙鼠、刺毛鼠、冠毛大鼠)、马岛鼠科(登山小鼠、岩小鼠、有尾大鼠、马达加斯加大鼠和小鼠)、刺山鼠科(例如多刺睡鼠)和鼹形鼠科(例如摩尔大鼠、竹大鼠和鼢鼠)家族。在一个特定实施方式中，所述基因修饰的啮齿动物选自真小鼠或大鼠(鼠科)、沙鼠、刺毛鼠和黄冠鼠。在一个实施方式中，所述基因修饰的小鼠是鼠科家族成员。在一个实施方式中，所述动物是啮齿动物。在一个特定实施方式中，所述啮齿动物选自小鼠和大鼠。在一个实施方式中，所述非人动物是小鼠。

[0116] 在一个特定实施方式中，所述非人动物是啮齿动物，其是C57BL品系的小鼠，选自C57BL/A、C57BL/An、C57BL/GrFa、C57BL/KaLwN、C57BL/6、C57BL/6J、C57BL/6ByJ、C57BL/6NJ、C57BL/10、C57BL/10ScSn、C57BL/10Cr和C57BL/Ola。在另一个实施方式中，所述小鼠是选自下组的129品系：129P1、129P2、129P3、129X1、129S1(例如129S1/SV、129S1/SvIm)、129S2、129S4、129S5、129S9/SvEvH、129S6(129/SvEvTac)、129S7、129S8、129T1、129T2(参见例如Festing等(1999)Revised nomenclature for strain 129mice,Mammalian Genome 10:836，亦参见Auerbach等(2000)Establishment and Chimera Analysis of 129/SvEv- and C57BL/6-Derived Mouse Embryonic Stem Cell Lines)。在一个特定实施方式中，所述基因修饰的小鼠是前述129品系和前述C57BL/6品系的混合物。在另一个特定实施方式中，所述小鼠是前述129品系的混合物或前述BL/6品系的混合物。在一个特定实施方式中，所述混合的129品系是129S6(129/SvEvTac)品系。在另一个实施方式中，所述小鼠是BALB品系，例如BALB/c品系。在又一个实施方式中，所述小鼠是BALB品系和另一个前述品系的混合物。

[0117] 在一个实施方式中，所述非人动物是大鼠。在一个实施方式中，所述大鼠选自Wistar大鼠、LEA品系、Sprague Dawley品系、Fischer品系、F344、F6和Dark Agouti。在一个实施方式中，所述大鼠品系是两种或多种选自下组的品系的混合物：Wistar、LEA、Sprague Dawley、Fischer、F344、F6和Dark Agouti。

[0118] 因此，在一个实施方式中，本发明提供了一种基因修饰的小鼠，所述小鼠在其基因组中包含未经重排的人源或人源化的TCR可变基因基因座，例如TCRα、TCRβ、TCRδ和/或TCRγ可变基因基因座。在一些实施方式中，所述未经重排的人源或人源化的TCR可变基因基因座取代内源性小鼠TCR可变基因基因座。在其他实施方式中，未经重排的人源或人源化的TCR可变基因基因座在基因组中的位点不同于相应的内源性小鼠TCR基因组。在一些实施方式中，人源或人源化未经重排的TCR可变基因基因座可操作地与小鼠TCR恒定区连接。

[0119] 在一个实施方式中，本申请提供了一种基因修饰的小鼠，其中所述小鼠在其基因组中包含未经重排的T细胞受体(TCR)α可变基因基因座，所述基因座包含至少一个人源Jα区段和至少一个人源Vα区段，其可操作地与小鼠TCRα恒定基因序列连接，以及未经重排的

TCRβ可变基因基因座，所述基因座包含至少一个人源Jβ区段、至少一个人源Dβ区段和至少一个人源Vβ区段，其可操作地与小鼠TCRβ恒定基因序列连接。在一个特定实施方式中，所述小鼠在其基因组中包含未经重排的TCRα可变基因基因座，所述基因座包含完整的人源Jα区段库和完整的人源Vα区段库，其可操作地与小鼠TCRα恒定基因序列连接，以及未经重排的TCRβ可变基因基因座，所述基因座包含完整的人源Jβ区段库、完整的人源Dβ区段库和完整的人源Vβ区段库，其可操作地与小鼠TCRβ恒定基因序列连接。

[0120] 在一些实施方式中，所述未经重排的TCRα可变基因基因座包含人源TCRα可变区区段取代内源性小鼠TCRα可变基因基因座，以及所述未经重排的TCRβ可变基因基因座包含人源TCRβ可变区区段取代内源性小鼠TCRβ可变基因基因座。在一些实施方式中，所述内源性小鼠Vα和Jα区段无法重排以形成经重排的Vα/Jα序列，以及所述内源性小鼠Vβ、Dβ和Jβ区段无法重排以形成经重排的Vβ/Dβ/Jβ序列。在一些实施方式中，所述人源Vα和Jα区段重排以形成经重排的人源Vα/Jα序列，以及所述人源Vβ、Dβ和Jβ区段重排以形成经重排的人源Vβ/Dβ/Jβ序列。

[0121] 在不同实施方式中，本申请所述的非人动物(例如啮齿动物，例如小鼠或大鼠)产生的T细胞能够经历胸腺发育，其发育过程为从DN1至DN2至DN3至DN4至DP以及至CD4或CD8SP T细胞。本发明非人动物的这种T细胞表达的细胞表面分子通常由T细胞在特定的胸腺发育阶段(例如CD25、CD44、kit、CD3、pTα等)产生。因此，本申请所述的非人动物表达的pTα在胸腺发育DN3阶段与TCRβ复合。本申请所述的非人动物表达的T细胞能够经历胸腺发育以产生CD4+和CD8+T细胞。正常情况下，胸腺中CD4+与CD8+T细胞的生理比值在约2:1和3:1之间。参见例如Ge和Stanley(2008)The O-fucose glycan in the ligand-binding domain of Notch 1regulates embryogenesis and T cell development, Proc.Natl.Acad.Sci.USA105:1539-44。因此，在一个实施方式中，本申请所述非人动物在胸腺中产生的CD4+与CD8+T细胞的比值在约2:1和3:1之间(CD4+:CD8+)。

[0122] 在不同实施方式中，本申请所述的非人动物产生的T细胞能够经历在外周中的正常T细胞分化。在一些实施方式中，本申请所述的非人动物能够产生正常的效应T细胞库，例如CTL(细胞毒性T淋巴细胞)、T_H1、T_H2、T_{REG}、T_H17等。因此，在这些实施方式中，本申请所述的非人动物生成的效应T细胞履行特定T细胞类型不同的典型功能，例如对外来抗原的识别、结合和应答。在不同实施方式中，本申请所述的非人动物产生在MHC I分子背景下表达的效应T细胞杀死展示胞浆病原体肽片段的细胞；识别来源于在胞内囊泡中降解并通过MHC II分子将其递呈至巨噬细胞表面的抗原的肽并诱导巨噬细胞杀死微生物；产生驱动B细胞分化的细胞因子；活化B细胞以产生促进调理作用的抗体；诱导上皮细胞产生募集中性粒细胞至感染部位的趋化因子等等。

[0123] 在附加的实施方式中，本申请所述的非人动物在外周例如在脾脏中包含正常数量的CD3+T细胞。在一些实施方式中，在本申请所述的非人动物中外周CD3+T细胞的百分率与野生型动物(即包含所有内源性TCR可变区区段的动物)相当。在一个实施方式中，本申请所述的非人动物包含正常的脾脏CD3+T细胞与总脾细胞的比率。

[0124] 在其他方面，本申请所述的非人动物能够在对目的抗原的应答中生成记忆T细胞群。例如，所述非人动物针对抗原例如目的抗原(例如用于疫苗研发所检测的抗原等)生成中心记忆T细胞(Tcm)和效应记忆T细胞(Tem)。

[0125] 未接收到足够信号(例如Notch信号)的DN1和DN2细胞可以发育成B细胞、髓样细胞(例如树突状细胞)、肥大细胞和NK细胞。参见例如Yashiro-Ohtani et al.(2010)Notch regulation of early thymocyte development,Seminars in Immunology 22:261-69。在一些实施方式中,本申请所述的非人动物发育正常数量的B细胞、髓样细胞(例如树突状细胞)、肥大细胞和NK细胞。在一些实施方式中,本申请所述的非人动物在胸腺中发育正常的树突状细胞群。

[0126] 在T细胞表面表达的T细胞受体主要类型是TCRα/β,少数细胞表达TCRδ/γ。在本发明的一些实施方式中,包含人源化的TCRα和/或β基因座的非人动物的T细胞显示出对TCRα/β和TCRδ/γ基因座正常的利用,例如对TCRα/β和TCRδ/γ基因座的利用与野生型动物类似(例如本申请所述非人动物的T细胞表达的TCRα/β和TCRδ/γ蛋白与野生型动物表达的具有相似的比例)。因此,在一些实施方式中,包含人源化的TCRα/β和内源性非人源TCRδ/γ基因座的非人动物显示出对所有基因座正常的利用。

[0127] 除了基因改造的非人动物以外,本申请还提供了非人胚胎(例如啮齿动物胚胎,例如小鼠或大鼠胚胎),其中所述胚胎包含供体ES细胞,其来源于如本申请所述的非人动物(例如啮齿动物,例如小鼠或大鼠)。在一个方面,所述胚胎包含包括未经重排的人源化的TCR基因座的ES供体细胞和宿主胚胎细胞。

[0128] 本申请还提供了一种组织,其中所述组织来源于如本申请所述的非人动物(例如小鼠或大鼠),并且表达人源化的TCR多肽(例如TCRα和/或TCRβ,或者TCRδ,和/或TCRγ多肽)。

[0129] 此外,本申请提供了分离自如本申请所述的非人动物的非人细胞。在一个实施方式中,所述细胞是ES细胞。在一个实施方式中,所述细胞是T细胞。在一个实施方式中,所述T细胞是CD4+T细胞。在另一个实施方式中,所述T细胞是CD8+T细胞。

[0130] 本申请还提供了一种非人细胞,所述细胞包含如本申请所述的非人动物的染色体或其片段。在一个实施方式中,所述非人细胞包含如本申请所述的非人动物的细胞核。在一个实施方式中,所述非人细胞包含核转移得到的染色体或其片段。

[0131] 本申请还提供了一种表达TCR蛋白的非人源细胞,所述TCR蛋白包含人源可变区和非人源恒定区。所述TCR蛋白可以包含TCRα、TCRβ或其组合。在一个实施方式中,所述细胞是T细胞,例如CD4+或CD8+T细胞。

[0132] 在一个方面,本申请提供了一种非人源诱导的多能干细胞,所述细胞包含编码如本申请所述的人源化的TCR多肽的未经重排的人源化的TCR基因座。在一个实施方式中,所述诱导的多能干细胞来源于如本申请所述的非人动物。

[0133] 在一个方面,本申请提供了一种杂交瘤或四价体瘤,其来源于如本申请所述的非人动物细胞。在一个实施方式中,所述非人动物是啮齿动物,例如小鼠或大鼠。

[0134] 本申请还提供了一种制备如本申请所述的基因修饰的非人动物(例如啮齿动物,例如小鼠或大鼠)的方法。制备基因修饰的非人动物的方法使得在所述动物的基因组中包含人源化的未经重排的TCR基因座(例如人源化的未经重排的TCRα、TCRβ、TCRδ和/或TCRγ基因座)。在一个实施方式中,本申请提供了一种制备基因修饰的非人动物(例如啮齿动物,例如小鼠或大鼠)的方法,所述动物在T细胞表面表达T细胞受体,所述受体包含人源可变区和非人源(例如啮齿动物,例如小鼠或大鼠)恒定区,其中所述方法包括在第一非人动物中用包含至少一个人源Vα区段和至少一个人源Jα区段的未经重排的人源化的TCRα可变基因

基因座取代内源性非人源TCRα可变基因基因座，其中所述人源化的TCRα可变基因基因座可操作地与内源性TCRα恒定区连接；在第二非人动物中用包含至少一个人源Vβ区段、一个人源Dβ区段和一个人源Jβ区段的未经重排的人源化的TCRβ可变基因基因座取代内源性非人源TCRβ可变基因基因座，其中所述人源化的TCRβ可变基因基因座可操作地与内源性TCRβ恒定区连接；以及将所述第一和第二非人源动物交配以获得表达包含人源可变区和非人源恒定区的T细胞受体的非人动物。在其他实施方式中，本申请提供了一种制备基因修饰的其基因组包含人源化的未经重排的TCRα基因座的非人动物，或者其基因组包含人源化的未经重排的TCRβ基因座的非人动物的方法，其根据本申请所述的方法生成。在不同实施方式中，所述取代在内源性基因座进行。在一些实施方式中，如实施例中所描述的，所述方法利用使用VELOCIGENE®技术制备的一个或多个靶向构建体，将所述构建体引入ES细胞并使用VELOCIMOUSE®技术将被靶向的ES细胞克隆引入小鼠胚胎。在一些实施方式中，所述ES细胞来源于129和C57BL/6品系混合的小鼠。在不同实施方式中，所述方法包含逐步进行的人源化策略，其中在每个随后的人源化步骤中将包含附加可变区区段的构建体引入ES细胞，最终使得在小鼠中包含完整的人源可变区区段库(参见例如图3和图7)。

[0135] 因此，本申请还提供了用于生成本申请所述的基因改造的非人动物的核苷酸构建体。在一个方面，所述核苷酸构建体包含：5'和3'同源臂、包含人源TCR可变区基因区段的人源DNA片段以及在重组位点之间的选择性表达盒。在一个实施方式中，所述人源DNA片段是TCRα基因片段并且其包含至少一个人源TCRα可变区区段。在另一个实施方式中，所述人源DNA片段是TCRβ片段并且其包含至少一个人源TCRβ可变区基因区段。在一个方面，至少一个同源臂是非人源同源臂并且其与非人源TCR基因座(例如非人源TCRα或TCRβ基因座)具有同源性。

[0136] 选择性表达盒是插入靶向构建体的核苷酸序列，其有助于选择已整合入目的构建体的细胞(例如ES细胞)。多种适宜的选择性表达盒是本领域公知的。通常，在存在特定抗生素(例如Neo、Hyg、Pur、CM、Spec等)的条件下选择性表达盒使得选择成阳性。此外，选择性表达盒可以在重组位点之间，这使得在使用重组酶处理后可以将选择性表达盒去除。常用的重组位点是loxP和Frt，其分别由Cre和Flp酶识别，但其他的也是本领域公知的。

[0137] 在一个实施方式中，所述选择性表达盒位于人源DNA片段的5'端。在另一个实施方式中，所述选择性表达盒位于人源DNA片段的3'端。在另一个实施方式中，所述选择性表达盒位于人源DNA片段中，例如人源内含子中。在另一个实施方式中，所述选择性表达盒位于人源和小鼠DNA片段的连接处。

[0138] 用于生成基因改造的非人动物、构建体和使用的靶向载体的靶向策略的多种示例性实施方式见图3、4、5、7和8。

[0139] 在基因靶向完成后，对ES细胞或基因修饰的非人动物进行筛选以确证成功掺入了目的外源性核苷酸序列或表达了外源性多肽(例如人源TCR可变区区段)。多种技术是本领域技术人员公知的，包括(但不限于)Southern印迹、长PCR、定量PCT(例如使用TAQMAN®的实时PCR)、荧光原位杂交、Northern印迹、流式细胞术、Western分析、免疫细胞化学、免疫组化等。在一个例子中，可以通过筛选小鼠等位基因的缺失情况和/或人源等位基因的获得情况对携带目的基因修饰的非人动物(例如小鼠)进行鉴定，其采用Valenzuela等，(2003)High-throughput engineering of the mouse genome coupled with high-resolution expression analysis,Nature Biotech.21(6):652-659中所述的经修订的等位基因检测。

鉴定基因修饰动物中的特定核苷酸或氨基酸序列的其他检测是本领域技术人员所公知的。

[0140] 本公开还提供了一种修饰非人动物的TCR可变基因基因座(例如TCRα、TCRβ、TCRδ和/或TCRγ基因基因座)以表达本申请所述的人源化的TCR蛋白的方法。在一个实施方式中,本发明提供了一种修饰TCR可变基因基因座以便在T细胞表面表达人源化的TCR蛋白的方法,其中所述方法包含在非人动物中用未经重排的人源化的TCR可变基因基因座取代内源性非人源TCR可变基因基因座。在一个实施方式中,其中所述TCR可变基因基因座是TCRα可变基因基因座,所述未经重排的人源化的TCR可变基因基因座包含至少一个人源Vα区段和至少一个人源Jα区段。在一个实施方式中,其中所述TCR可变基因基因座是TCRβ可变基因基因座,所述未经重排的人源化的TCR可变基因基因座包含至少一个人源Vβ区段、至少一个人源Dβ区段和至少一个人源Jβ区段。在不同的方面,所述未经重排的人源化的TCR可变基因基因座可操作地与相应的内源性非人源TCR恒定区连接。

[0141] 本申请还提供了一种由本申请所述的非人动物(例如啮齿动物,例如小鼠或大鼠)制备的人源化的TCR蛋白,其中所述人源化的TCR蛋白包含人源可变区和非人源恒定区。因此,所述人源化的TCR蛋白在其可变结构域中包含人源互补性决定区(即人源CDR1、2和3)以及非人源恒定区。

[0142] 尽管下述实施例描述了一种基因改造动物,在所述动物的基因组中包含人源化的TCRα和/或人源化的TCRβ可变基因基因座,本领域技术人员将理解可以使用类似的策略生产其基因组中包含人源化的TCRδ和/或TCRγ可变基因基因座的基因改造动物。本申请还提供了全部四个TCR可变基因基因座均人源化的基因改造的非人动物。

[0143] 基因修饰的TCR动物的用途

[0144] 在不同实施方式中,本发明的基因修饰的非人动物使T细胞在其表面上具有人源化的TCR分子,并且作为结果其将以人样方式识别由MHC复合物递呈给其的肽。本申请所述的基因修饰的非人动物可以用于研究人源T细胞的发育和功能以及免疫耐受过程;检测人源疫苗候选物;生成用于TCR基因治疗的具有某些特异性的TCR;生成疾病相关抗原的TCR文库(例如肿瘤相关抗原(TAA)等)。

[0145] 在本领域中对T细胞治疗有越来越多的兴趣,因为T细胞(例如细胞毒性T细胞)能被导向以攻击并导致目的抗原例如病毒抗原、细菌抗原、肿瘤抗原等或递呈其的细胞的破坏。对癌症T细胞治疗最初的研究旨在从肿瘤细胞块中分离肿瘤浸润淋巴细胞(TIL;在可能包含对肿瘤抗原反应的T细胞的肿瘤块中的淋巴细胞群),使用T细胞生长因子在体外将其扩增,并且在一个被称为过继T细胞治疗的过程中将其转移回患者体内。参见例如Restifo等,(2012)Adoptive immunotherapy for cancer:harnessing the T cell response,Nature Reviews 12:269-81;Linnermann等,(2011)T-Cell Receptor Gene Therapy:Critical Parameters for Clinical Success,J.Invest.Dermatol.131:1806-16。然而,到目前为止这些疗法的成功仅限于黑色素瘤和肾细胞癌;并且TIL过继性转移不是特异性针对所定义的肿瘤相关抗原(TAA)的。Linnermann等,如上所述。

[0146] 对启动TCR基因治疗已经有一些尝试,其中T细胞被选择或设定以靶向至目的抗原例如TAA。目前TCR基因治疗依赖于对针对特异性抗原例如肿瘤相关抗原的TCR序列的鉴定。例如,Rosenberg和其同事已发表了一些研究结果,他们转导了来源于具有编码对黑色素瘤相关抗原MART-1表位具有特异性的TCRα和β链的基因的黑色素瘤患者的外周血淋巴细胞,

并使用所扩增得到的淋巴细胞进行过继T细胞治疗。Johnson等,(2009)Gene therapy with human and mouse T-cell receptors mediates cancer regression and targets normal tissues expressing cognate antigen,Blood 114:535-46;Morgan等,(2006) Cancer Regression in Patients After Transfer of Genetically Engineered Lymphocytes,Science 314:126-29。MART-1特异性TCR是从经历TIL治疗后肿瘤消退的患者中分离得到。然而,这种TCR特别是高亲合力TCR(其最有可能在治疗上是有用的)的鉴定是复杂的,因为大部分肿瘤抗原是自身抗原,主要由于免疫耐受,靶向这些抗原的TCR通常缺失或具有次优的亲和性。

[0147] 在不同实施方式中,本发明通过提供在其基因组中包含未经重排的人源TCR可变基因基因座的基因改造的非人动物解决了这一问题。本申请所述的非人动物能够生成具有多样性的人源化的T细胞受体库的T细胞。因此,本申请所述的非人动物可以作为多样性人源化T细胞受体库的来源,例如用于过继T细胞治疗的高亲合力人源化的T细胞受体。

[0148] 因此,在一个实施方式中,本发明提供了一种生成针对人源抗原的T细胞受体的方法,所述方法包括使用目的抗原免疫本申请所述的非人动物(例如啮齿动物,例如小鼠或大鼠),使所述动物产生免疫应答,从所述动物分离对目的抗原具有特异性的活化的T细胞,并且确定抗原特异性T细胞表达的T细胞受体的核酸序列。

[0149] 在一个实施方式中,本发明提供了一种产生对目的抗原(例如疾病相关抗原)具有特异性的人源T细胞受体的方法,所述方法包括使用目的抗原免疫本申请所述的非人动物;使所述动物产生免疫应答;从所述动物分离对目的抗原具有反应性的T细胞;确定T细胞表达的人源TCR可变区的核酸序列;将所述人源TCR可变区克隆入包含人源TCR恒定区的核酸序列的核苷酸构建体,以使得人源TCR可变区可操作地与人源TCR恒定区连接;并且从所述构建体表达对目的抗原具有特异性的人源T细胞受体。在一个实施方式中,使用本领域技术人员公知的标准技术进行分离T细胞、确定T细胞表达的人源TCR可变区的核酸序列、将人源TCR可变区克隆至包含人源TCR恒定区核酸序列的核苷酸构建体以及表达人源T细胞受体的步骤。

[0150] 在一个实施方式中,编码对目的抗原具有特异性的T细胞受体的核苷酸序列是在细胞中表达。在一个实施方式中,表达所述TCR的细胞选自CHO、COS、293、HeLa、PERC.6™细胞等。

[0151] 所述目的抗原可以是已知导致或与疾病或状况相关的任意抗原,例如肿瘤相关抗原;病毒、细菌或其他病原体等的抗原。多种肿瘤相关抗原均是本领域公知的。肿瘤相关抗原的选择参见癌症免疫(癌症研究所的期刊)肽数据库(archive.cancerimmunity.org/peptidedatabase/Tcellepitopes.htm)。在本发明的一些实施方式中,目的抗原是人源抗原,例如人肿瘤相关抗原。在一些实施方式中,所述抗原是细胞类型特异性细胞内抗原,并且T细胞受体用于杀死表达所述抗原的细胞。

[0152] 在一个实施方式中,本申请提供了一种鉴定对目的抗原例如肿瘤相关抗原具有特异性的T细胞的方法,所述方法包括使用目的抗原免疫本申请所述的非人动物,使所述动物产生免疫应答,并且从所述非人动物分离对目的抗原具有特异性的T细胞。

[0153] 本发明提供了用于过继T细胞疗法的新方法。因此,本申请提供了一种在主体(例如哺乳动物主体,例如人主体)中治疗或缓解疾病或状况(例如癌症)的方法,所述方法包括使用与所述疾病或状况相关的抗原免疫本申请所述的非人动物,使所述动物产生免疫应答,从所述动物分离抗原特异性T细胞群,并且将所分离的抗原特异性T细胞输入至所述主

体。在一个实施方式中，本发明提供了一种在人主体中治疗或缓解疾病或状况的方法，所述方法包括使用目的抗原(例如疾病或状况相关抗原，例如肿瘤相关抗原)免疫本申请所述的非人动物，使所述动物产生免疫应答，从所述动物分离抗原特异性T细胞群，确定抗原特异性T细胞表达的T细胞受体的核酸序列，将所述T细胞受体的核酸序列克隆至表达载体(例如逆转录病毒载体)，将所述载体引入来源于主体的T细胞以使得所述T细胞表达抗原特异性T细胞受体，并且将所述T细胞输入主体。在一个实施方式中，在引入来源于主体的T细胞之前将所述T细胞受体的核酸序列进一步人源化，例如对编码非人源恒定区的序列进行修饰使其更加类似于人源TCR恒定区(例如使用人源恒定区取代非人源恒定区)。在一些实施方式中，所述疾病或状况是癌症。在一些实施方式中，在输入主体前将抗原特异性T细胞群扩增。在一些实施方式中，在输入抗原特异性T细胞前将主体的免疫细胞群免疫耗竭。在一些实施方式中，所述抗原特异性TCR是高亲合力TCR，例如对肿瘤相关抗原具有高亲合力的TCR。在一些实施方式中，所述T细胞是细胞毒性T细胞。在其他实施方式中，所述疾病或状况由病毒或细菌导致。

[0154] 在另一个实施方式中，所述疾病或状况是自身免疫性疾病。T_{REG}细胞是维持对自身抗原耐受并阻止病理性自行反应的T细胞亚群。因此，本申请还提供了治疗自身免疫性疾病的方法，所述方法依赖于在本发明的非人动物中生成抗原特异性T_{REG}细胞。

[0155] 本申请还提供了一种在主体中治疗或缓解疾病或病症(例如癌症)的方法，所述方法包括将所述主体的疾病或病症受累细胞(例如癌细胞)引入非人动物，使所述动物针对所述细胞产生免疫应答，从所述动物分离对所述细胞具有反应性的T细胞群，确定所述T细胞表达的T细胞受体的核酸序列，将所述T细胞受体序列克隆入载体，将所述载体引入来源于所述主体的T细胞，并且将所述主体携带T细胞受体的T细胞输入主体。

[0156] 本申请还提供了如本申请所述的非人动物制备编码人源TCR可变结构域(例如TCRα和/或β可变结构域)的核酸序列的用途。在一个实施方式中，本申请提供了一种制备编码人源TCR可变结构域的核酸序列的方法，所述方法包括使用所关注的抗原免疫如本申请所述的非人动物，使所述非人动物针对所关注的抗原产生免疫应答，并且从其中获得编码与所关注的抗原结合的人源TCR可变结构域的核酸序列。在一个实施方式中，所述方法进一步包括制备编码与非人源TCR恒定区可操作地连接的人源TCR可变结构域的核酸序列，其包括从本申请所述的非人动物中分离T细胞并且从其中获得编码与TCR恒定区可操作地连接的TCR可变结构域的核酸序列。

[0157] 本申请还提供了一种使用如本申请所述的非人动物制备人用治疗剂的用途，所述用途包含使用所关注的抗原(例如肿瘤相关抗原)免疫非人动物，使所述非人动物产生免疫应答，获得对所关注的抗原具有反应性的动物T细胞，获得编码与所关注的抗原结合的人源化的TCR蛋白的核酸序列，并且在人用治疗剂中使用编码人源化的TCR蛋白的核酸序列。

[0158] 因此，本申请还提供了一种制备人用治疗剂的方法，所述方法包括使用所关注的抗原免疫如本申请所述的非人动物，使所述非人动物产生免疫应答，获得对所关注的抗原具有反应性的动物T细胞，获得编码与所关注的抗原结合的人源化的T细胞受体的核酸序列，并且在人用治疗剂中使用人源化的T细胞受体。

[0159] 在一个实施方式中，所述人用治疗剂是携带所关注核酸序列(例如转染或转导或通过其他方式引入所关注的核酸)的T细胞(例如人源T细胞，例如来源于人主体的T细胞)，以使得T细胞表达对所关注抗原具有亲和性的人源化的TCR蛋白。在一个方面，使用治疗剂

的主体需要针对特定疾病或状况进行治疗，并且所述抗原与所述疾病或状况相关。在一个方面，所述T细胞是细胞毒性T细胞，所述抗原是肿瘤相关抗原以及所述疾病或状况是癌症。在一个方面，所述T细胞来源于主体。

[0160] 在另一个实施方式中，所述人用治疗剂是T细胞受体。在一个实施方式中，所述治疗性受体是可溶性T细胞受体。在生成用于治疗剂的可溶性T细胞受体或TCR可变区方面已经投入了大量精力。可溶性T细胞受体的生成依赖于经重排的TCR可变区的获得。一种方法是设计含有TCRα和TCRβ的单链TCR，并且与scFv免疫球蛋白形式类似，通过接头将其融合在一起(参见例如国际申请号WO 2011/044186)。所得到的scTv，如果与scFv类似，将提供热稳定和可溶形式的TCRα/β结合蛋白。替代方法包括设计具有TCRβ恒定结构域的可溶性TCR(参见例如Chung等，(1994)Functional three-domain single-chain T-cell receptors, Proc.Natl.Acad.Sci.USA.91:12654-58)；以及在TCR恒定结构域之间的交界处设计非天然存在的二硫键(Boulter和Jakobsen综述(2005)Stable,soluble,high-affinity, engineered T cell receptors:novel antibody-like proteins for specific targeting of peptide antigens,Clinical and Experimental Immunology 142:454-60;亦参见美国专利号No.7,569,664)。对其他形式的可溶性T细胞受体也有描述。本申请所述的非人动物可以用于确定与所关注抗原高亲和性结合的T细胞受体的序列，并且随后根据所述序列设计可溶性T细胞受体。

[0161] 由非人动物表达的来源于TCR受体序列的可溶性T细胞受体可以用于阻断所关注蛋白的功能，例如病毒、细菌或肿瘤相关蛋白。或者，可溶性T细胞受体可以与能够杀死感染的或癌细胞的部分融合，例如细胞毒性分子(例如化疗剂)、毒素、放射性核素、前药、抗体等。可溶性T细胞受体还可以与免疫调节分子融合，例如细胞因子、趋化因子等。可溶性T细胞受体还可以与免疫抑制分子融合，例如阻止T细胞杀死携带由T细胞识别的抗原的其他细胞的分子。与免疫抑制分子融合的这种可溶性T细胞受体能够用于例如阻断自身免疫。可以与可溶性T细胞受体融合的不同示例性免疫抑制分子参见Ravetch和Lanier(2000)Immune Inhibitory Receptors,Science 290:84-89，其通过引用并入本申请。

[0162] 本发明还提供了在人源TCR背景下研究免疫应答的方法，包括人源TCR重排、T细胞发育、T细胞活化、免疫耐受等。

[0163] 本申请还提供了测试疫苗候选物的方法。在一个实施方式中，本申请提供了一种确定是否疫苗会激活免疫应答(例如T细胞增殖、细胞因子释放等)并且导致效应以及记忆T细胞(例如中心和效应记忆T细胞)生成的方法。

[0164] 本申请还包括以下实施方式：

[0165] 实施方式1.一种基因修饰的非人动物，在其基因组中包含：

[0166] 未经重排的T细胞受体(TCR)α可变基因基因座，其包括与非人源TCRα恒定基因序列可操作地连接的至少一个人源Vα区段和至少一个人源Jα区段。

[0167] 实施方式2.根据实施方式1所述的动物，其中所述未经重排的TCRα可变基因基因座取代内源性非人源TCRα可变基因基因座。

[0168] 实施方式3.根据实施方式1所述的动物，其中内源性非人源Vα和Jα区段无法重排以形成经重排的Vα/Jα序列。

[0169] 实施方式4.根据实施方式1所述的动物，其中所述动物缺乏功能性内源性非人源

TCRα可变基因座。

[0170] 实施方式5.根据实施方式4所述的动物，其中所述缺乏功能性内源性非人源TCRα可变基因座包含选自以下组的缺失：(a)全部内源性Vα基因区段、(b)全部内源性Jα基因区段的缺失和(c)其组合。

[0171] 实施方式6.根据实施方式1所述的动物，其中所述人源Vα和Jα区段重排以形成经重排的人源Vα/Jα序列。

[0172] 实施方式7.根据实施方式6所述的动物，其中所述动物在T细胞表面表达包含人源TCRα可变区的T细胞受体。

[0173] 实施方式8.根据实施方式1所述的动物，其中所述动物的T细胞经历胸腺T细胞发育以产生CD4和CD8单阳性T细胞。

[0174] 实施方式9.根据实施方式1所述的动物，其中所述动物包含正常的脾脏CD3+T细胞与总脾脏细胞的比率。

[0175] 实施方式10.根据实施方式1所述的动物，其中所述动物产生针对目的抗原的中心和效应记忆T细胞群。

[0176] 实施方式11.根据实施方式1所述的动物，其中所述未经重排的TCRα可变基因基因座包含完整的人源Jα区段库和完整的人源Vα区段库。

[0177] 实施方式12.根据实施方式1所述的动物，其中所述动物保留内源性非人源TCRα可变基因基因座，并且其中所述基因座是无功能的基因座。

[0178] 实施方式13.根据实施方式1所述的动物，其中所述动物是啮齿动物。

[0179] 实施方式14.根据实施方式13所述的动物，其中所述啮齿动物是小鼠。

[0180] 实施方式15.一种基因修饰的非人动物，在其基因组中包含：

[0181] 未经重排的TCRβ可变基因基因座，其包括与非人源TCRβ恒定基因序列可操作地连接的至少一个人源Vβ区段、至少一个人源Dβ区段和至少一个人源Jβ区段。

[0182] 实施方式16.根据实施方式15所述的动物，其中所述未经重排的TCRβ可变基因基因座取代内源性非人源TCRβ可变基因基因座。

[0183] 实施方式17.根据实施方式15所述的动物，其中内源性啮齿动物Vβ、Dβ和Jβ区段无法重排以形成经重排的Vβ/Dβ/Jβ序列。

[0184] 实施方式18.根据实施方式15所述的动物，其中所述动物缺乏功能性内源性非人源TCRβ可变基因座。

[0185] 实施方式19.根据实施方式18所述的动物，其中所述功能性内源性啮齿动物TCRβ可变基因座的缺乏包含选自以下组的缺失：(a)全部内源性Vβ基因区段的缺失、(b)全部内源性Dβ基因区段的缺失、(c)全部内源性Jβ基因区段的缺失，和(d)上述缺失的组合。

[0186] 实施方式20.根据实施方式15所述的动物，其中所述人源Vβ、Dβ和Jβ区段重排以形成经重排的人源Vβ/Dβ/Jβ序列。

[0187] 实施方式21.根据实施方式20所述的动物，其中所述动物在T细胞表面表达包含人源TCRβ可变区的T细胞受体。

[0188] 实施方式22.根据实施方式15所述的动物，其中所述动物的T细胞经历胸腺T细胞发育以产生CD4和CD8单阳性T细胞。

[0189] 实施方式23.根据实施方式15所述的动物，其中所述动物包含正常的脾脏CD3+T细

胞与总脾脏细胞的比率。

[0190] 实施方式24.根据实施方式15所述的动物，其中所述动物生成针对目的抗原的中心和效应记忆T细胞群。

[0191] 实施方式25.根据实施方式15所述的动物，其中所述未经重排的TCRβ可变基因基因座包含完整的人源Jβ区段库、完整的人源Dβ区段库和完整的人源Vβ区段库。

[0192] 实施方式26.根据实施方式15所述的动物，其中所述动物保留内源性非人源TCRβ可变基因基因座，并且其中所述基因座是无功能的基因座。

[0193] 实施方式27.根据实施方式15所述的动物，其中所述动物是啮齿动物。

[0194] 实施方式28.根据实施方式27所述的动物，其中所述啮齿动物是小鼠。

[0195] 实施方式29.一种基因修饰的非人动物，在其基因组中包含：

[0196] 未经重排的T细胞受体(TCR)α可变基因基因座，其包含与非人源TCRα恒定基因序列可操作地连接的至少一个人源Vα区段和至少一个人源Jα区段；以及，

[0197] 未经重排的TCRβ可变基因基因座，其包括与非人源TCRβ恒定基因序列可操作地连接的至少一个人源Vβ区段、至少一个人源Dβ区段和至少一个人源Jβ区段。

[0198] 实施方式30.根据实施方式29所述的动物，其中所述未经重排的TCRα可变基因基因座取代内源性非人源TCRα可变基因基因座，并且其中所述未经重排的TCRβ可变基因基因座取代内源性非人源TCRβ可变基因基因座。

[0199] 实施方式31.根据实施方式29所述的动物，其中内源性非人源Vα和Jα区段无法重排以形成经重排的Vα/Jα序列，并且其中内源性非人源Vβ、Dβ和Jβ区段无法重排以形成经重排的Vβ/Dβ/Jβ序列。

[0200] 实施方式32.根据实施方式29所述的动物，其中所述动物缺乏功能性内源性非人源TCRα可变基因座并且缺乏功能性内源性非人源TCRβ可变基因座。

[0201] 实施方式33.根据实施方式32所述的动物，其中所述功能性内源性非人源TCRα可变基因座的缺乏包含选自下组的缺失：(a)全部内源性Vα基因区段的缺失、(b)全部内源性Jα基因区段的缺失，和(c)上述缺失的组合；

[0202] 并且所述功能性内源性非人源TCRβ可变基因座的缺乏包含选自下组的缺失：(a)全部内源性Vβ基因区段的缺失、(b)全部内源性Dβ基因区段的缺失、(c)全部内源性Jβ基因区段的缺失，和(d)上述缺失的组合。

[0203] 实施方式34.根据实施方式29所述的动物，其中所述人源Vα和Jα区段重排以形成经重排的人源Vα/Jα序列，并且所述人源Vβ、Dβ和Jβ区段重排形成经重排的人源Vβ/Dβ/Jβ序列。

[0204] 实施方式35.根据实施方式34所述的动物，其中所述动物在T细胞表面表达包含人源可变区和非人源动物恒定区的T细胞受体。

[0205] 实施方式36.根据实施方式29所述的动物，其中所述动物的T细胞经历胸腺T细胞发育以产生CD4和CD8单阳性T细胞。

[0206] 实施方式37.根据实施方式29所述的动物，其中所述动物包含正常的脾脏CD3+T细胞与总脾脏细胞的比率。

[0207] 实施方式38.根据实施方式29所述的动物，其中所述动物针对目的抗原生成中心和效应记忆T细胞群。

[0208] 实施方式39.根据实施方式29所述的动物，其中所述未经重排的TCRα可变基因基

因座包含61个人源Jα区段和8个人源Vα区段，并且其中所述未经重排的TCRβ可变基因基因座包含14个人源Jβ区段、2个人源Dβ区段和14个人源Vβ区段。

[0209] 实施方式40.根据实施方式29所述的动物，其中所述未经重排的TCRα可变基因基因座包含完整的人源Jα区段库和完整的人源Vα区段库，并且其中所述未经重排的TCRβ可变基因基因座包含完整的人源Jβ区段库、完整的人源Dβ区段库和完整的人源Vβ区段库。

[0210] 实施方式41.根据实施方式29所述的动物，其中所述动物保留内源性非人源TCRα和TCRβ可变基因基因座，并且其中所述基因座是无功能的基因座。

[0211] 实施方式42.根据实施方式29所述的动物，其中所述动物在人源化的TCRα基因座进一步包含人源Vδ区段的核苷酸序列。

[0212] 实施方式43.根据实施方式42所述的动物，其中所述动物在人源化的TCRα基因座进一步包含完整的人源Vδ区段库、完整的人源Dδ区段库和完整的人源Jδ区段库。

[0213] 实施方式44.根据实施方式29所述的动物，其中所述动物是啮齿动物。

[0214] 实施方式45.根据实施方式44所述的动物，其中所述啮齿动物是小鼠。

[0215] 实施方式46.一种制备基因修饰的非人动物的方法，所述动物在T细胞表面表达包含人源可变区和非人源恒定区的T细胞受体，所述方法包括：

[0216] 在第一非人动物中用包含至少一个人源Vα区段和至少一个人源Jα区段的未经重排的人源化的TCRα可变基因基因座取代内源性非人源TCRα可变基因基因座，以生成人源化的TCRα可变基因基因座，其中所述人源化的TCRα可变基因基因座可操作地与内源性非人源TCRα恒定区连接；

[0217] 在第二非人动物中用包含至少一个人源Vβ区段、至少一个人源Dβ区段和至少一个人源Jβ区段的未经重排的人源化的TCRβ可变基因基因座取代内源性非人源TCRβ可变基因基因座，以生成人源化的TCRβ可变基因基因座，其中所述人源化的TCRβ可变基因基因座可操作地与内源性非人源TCRβ恒定区连接；和

[0218] 将所述第一和第二动物交配以获得表达包含人源可变区和非人源恒定区的T细胞受体的非人动物。

[0219] 实施方式47.根据实施方式46所述的方法，其中内源性非人源Vα和Jα区段无法重排以形成经重排的Vα/Jα序列，并且其中内源性非人源Vβ、Dβ和Jβ区段无法重排以形成经重排的Vβ/Dβ/Jβ序列。

[0220] 实施方式48.根据实施方式46所述的方法，其中所述基因修饰的动物缺乏功能性内源性非人源TCRα可变基因座并且缺乏功能性内源性非人源TCRβ可变基因座。

[0221] 实施方式49.根据实施方式48所述的方法，其中所述功能性内源性非人源TCRα可变基因座的缺乏包含选自以下组的缺失：(a)全部内源性Vα基因区段的缺失、(b)全部内源性Jα基因区段的缺失，和(c)上述缺失的组合；

[0222] 并且所述功能性内源性非人源TCRβ可变基因座的缺乏包含选以自下组的缺失：(a)全部内源性Vβ基因区段的缺失、(b)全部内源性Dβ基因区段的缺失、(c)全部内源性Jβ基因区段的缺失，和(d)上述缺失的组合。

[0223] 实施方式50.根据实施方式46所述的方法，其中所述人源Vα和Jα区段重排以形成经重排的人源Vα/Jα序列，并且所述人源Vβ、Dβ和Jβ区段重排以形成经重排的人源Vβ/Dβ/Jβ序列。

[0224] 实施方式51.根据实施方式46所述的方法，其中所述啮齿动物的T细胞经历胸腺T

细胞发育以产生CD4和CD8单阳性T细胞。

[0225] 实施方式52.根据实施方式46所述的方法，其中所述动物包含正常的脾脏CD3+T细胞与总脾脏细胞的比率。

[0226] 实施方式53.根据实施方式46所述的方法，其中所述动物生成针对目的抗原的中心和效应记忆T细胞群。

[0227] 实施方式54.根据实施方式46所述的方法，其中所述未经重排的人源化的TCRα可变基因基因座包含61个人源Jα区段和8个人源Vα区段，并且其中所述未经重排的人源化的TCRβ可变基因基因座包含14个人源Jβ区段、2个人源Dβ区段和14个人源Vβ区段。

[0228] 实施方式55.根据实施方式46所述的方法，其中所述未经重排的人源化的TCRα可变基因基因座包含完整的人源Jα区段库和完整的人源Vα区段库，并且其中所述未经重排的人源化的TCRβ可变基因基因座包含完整的人源Jβ区段库、完整的人源Dβ区段库和完整的人源Vβ区段库。

[0229] 实施方式56.根据实施方式46所述的方法，其中所述非人动物是啮齿动物。

[0230] 实施方式57.根据实施方式56所述的方法，其中所述啮齿动物是小鼠。

[0231] 实施方式58.一种基因修饰的小鼠，在其基因组中包含：

[0232] 未经重排的T细胞受体(TCR)α可变基因基因座，其包含与小鼠TCRα恒定基因序列可操作地连接的完整的人源Jα区段库和完整的人源Vα区段库，以及

[0233] 未经重排的TCRβ可变基因基因座，其包含与小鼠TCRβ恒定基因序列可操作地连接的完整的人源Jβ区段库、完整的人源Dβ区段库和完整的人源Vβ区段库。

[0234] 实施方式59.根据实施方式58所述的小鼠，其中所述未经重排的TCRα可变基因基因座取代内源性小鼠TCRα可变基因基因座，并且其中所述未经重排的TCRβ可变基因基因座取代内源性小鼠TCRβ可变基因基因座。

[0235] 实施方式60.根据实施方式58所述的小鼠，其中所述内源性小鼠Vα和Jα区段无法重排以形成经重排的Vα/Jα序列，并且其中所述内源性小鼠Vβ、Dβ和Jβ区段无法重排以形成经重排的Vβ/Dβ/Jβ序列。

[0236] 实施方式61.根据实施方式58所述的小鼠，其中所述人源Vα和Jα区段重排以形成经重排的人源Vα/Jα序列，并且所述人源Vβ、Dβ和Jβ区段重排以形成经重排的人源Vβ/Dβ/Jβ序列。

[0237] 实施方式62.根据实施方式61所述的小鼠，其中所述小鼠在T细胞表面表达包含人源可变区和小鼠恒定区的T细胞受体。

[0238] 实施方式63.根据实施方式58所述的小鼠，其中所述小鼠的T细胞经历胸腺T细胞发育以产生CD4和CD8单阳性T细胞。

[0239] 实施方式64.根据实施方式58所述的小鼠，其中所述小鼠包含正常的脾脏CD3+T细胞与总脾脏细胞的比率。

[0240] 实施方式65.根据实施方式58所述的小鼠，其中所述小鼠生成针对目的抗原的中心和效应记忆T细胞群。

[0241] 实施方式66.根据实施方式58所述的小鼠，其中所述小鼠在人源化的TCRα基因座进一步包含完整的人源Vδ区段库、完整的人源Dδ区段库和完整的人源Jδ区段库。

[0242] 实施方式67.根据实施方式58所述的小鼠，其中所述小鼠保留内源性小鼠TCRα和TCRβ可变基因基因座，并且其中所述基因座是无功能的基因座。

[0243] 实施方式68.一种产生针对目的抗原的人源T细胞受体的方法,其包括:

[0244] 使用目的抗原对实施方式1所述的非人动物进行免疫;

[0245] 使所述动物产生免疫应答;

[0246] 从所述动物中分离对目的抗原产生反应的T细胞;

[0247] 确定所述T细胞表达的人源TCR可变区的核酸序列;

[0248] 将所述人源TCR可变区克隆至包含人源TCR恒定区的核酸序列的核苷酸构建体,其中所述人源TCR可变区可操作地与人源TCR恒定区连接;以及

[0249] 在细胞中表达人源T细胞受体。

实施例

[0250] 将通过下述的非限制性实施例对本发明进行进一步的说明。列出这些实施例以辅助理解本发明,但并非旨在并且不应将其解释为以任何方式限制其范围。所述实施例不包括对本领域的普通技术人员公知的常规方法(分子克隆技术等)的描述。除非另有明示,否则份为重量份,分子量是平均分子量,温度以摄氏度表示和压力为处于或接近大气压。

[0251] 实施例1:具有人源化的TCR可变基因基因座的小鼠的生成

[0252] 使用VELOCIGENE®基因工程技术(参见例如美国专利号6,586,251和Valenzuela,D.M.等,(2003)High-throughput engineering of the mouse genome coupled with high-resolution expression analysis.Nat.Biotech.21(6):652-659)制备包含内源性TCR(α或β)可变基因座缺失和内源性V和J或者V、D和J区段取代的小鼠,其中来源于使用细菌同源重组得到的BAC文库的人源序列用于制备较大的靶向载体(LTVEC),所述载体包括人源TCR可变基因座的基因组片段,所述基因组片段处于靶向臂之间以将LTVEC靶向至小鼠ES细胞中的内源性小鼠TCR可变基因座。根据Valenzuela等的文章将LTVEC线性化并电转染进入小鼠ES细胞系。选择潮霉素或新霉素抗性的ES细胞,并且针对小鼠等位基因的缺失和人源等位基因的获得进行筛选。

[0253] 将靶向ES细胞克隆通过VELOCIMOUSE®法(Poueymirou,W.T.等,(2007).F0generation mice fully derived from gene-targeted embryonic stem cells allowing immediate phenotypic analyses.Nat.Biotech.25:91-99.)引入8-细胞阶段(或更早期)的小鼠胚胎中。使用改良的等位基因检测(Valenzuela等)通过筛选内源性TCR可变等位基因的缺失和人源等位基因的获得对携带人源化的TCR基因座的VELOCIMICE®(完全来源于供体ES细胞的F0小鼠)进行鉴定。对F0胎仔进行基因分型并育成纯合子。如本申请所述制备针对人源化的TCRα和/或TCRβ可变基因座(例如包括人源TCRα和/或TCRβ可变区段亚类)是纯合子的小鼠并对其进行表型分型。

[0254] 所有小鼠均在Regeneron Pharmaceuticals无特定病原体的实验室饲养和繁育。所有的动物实验均已获得IACUC和Regeneron Pharmaceuticals的批准。

[0255] 实施例2:TCRα可变基因座的逐步人源化

[0256] 图2和3中概述了使用逐步人源化策略用对应于人源TCRα的54个V和61个J区段的1百万碱基DNA取代对应于小鼠TCRα基因座110个V和60个J小鼠区段的1.5百万碱基DNA。用于TCRα基因座逐步人源化策略的不同靶向载体的交界处核酸序列汇总于表2,并且包括在序列表中。

[0257] 表2:不同TCRα基因座靶向载体的交界处核酸序列

[0258]

MAID NO.	SEQ ID NO	描述
1626	1	TCRα可变基因座上游小鼠序列的 3’端和 *lox*P-Ub-Hyg-*lox*P 表达盒的 5’端之间的交界处核酸序列。
	2	*lox*P-Ub-Hyg-*lox*P 表达盒的 3’端和人源 TCRVα40-TCRVα41-TCRJα1 插入包括 AsiSI 位点的 5’端之间的交界处核酸序列。
	3	人源 TCRVα40-TCRVα41-TCRJα1 插入的 3’端和人源 TCRα可变基因座下游小鼠序列包括 NotI 位点的 5’端之间的交界处核酸序列。
1767	4	TCRα可变基因座上游小鼠序列的 3’端和 *lox*P-Ub-Neo-*lox*P 表达盒的 5’端之间的交界处核酸序列。
	5	*lox*P-Ub-Neo-*lox*P 表达盒的 3’端和人源 TCRVα35-TCRVα39 插入包括 AsiSI 位点的 5’端之间的交界处核酸序列。
1979	6	TCRα可变基因座上游小鼠序列的 3’端和 *frt*-Pgk-Hyg-*frt* 表达盒的 5’端之间的交界处核酸序列。
	7	*frt*-Pgk-Hyg-*frt* 表达盒的 3’端和人源 TCRVα22-TCRVα34 插入包括 AsiSI 位点的 5’端之间的交界处核酸序列。
1769	8	TCRα可变基因座上游小鼠序列的 3’端和 *lox*P-Ub-Neo-*lox*P 表达盒的 5’端之间的交界处核酸序列。
	9	*lox*P-Ub-Neo-*lox*P 表达盒的 3’端和人源 TCRVα13-2-TCRVα21 插入包括 AsiSI 位点的 5’端之间的交界处核酸序列。
1770	10	TCRα可变基因座上游小鼠序列的 3’端和 *lox*P-Ub-Hyg-*lox*P 表达盒的 5’端之间的交界处核酸序列。
	11	*lox*P-Ub-Hyg-*lox*P 表达盒的 3’端和人源 TCRVα6-TCRVα8-5 插入

[0259]

MAID NO.	SEQ ID NO	描述
		包括 AsiSI 位点的 5’端之间的交界处核酸序列。
1771	12	TCRα可变基因座上游小鼠序列的 3’端和 *lox*P-Ub-Neo-*lox*P 表达盒的 5’端之间的交界处核酸序列。
	13	*lox*P-Ub-Neo-*lox*P 表达盒的 3’端和人源 TCRVα1-1-TCRVα5 插入包括 AsiSI 位点的 5’端之间的交界处核酸序列。

[0260] 根据IMGT数据库对人源TCRα可变区区段进行编号。各交界处至少有100bp(每个末端约50bp)包括在序列表中。

[0261] 特别地,如图4A所示,通过同源重组对来自小鼠BAC克隆RP23-6A14(Invitrogen)的DNA进行修饰并且将其作为用跟在loxP位点后的Ub-潮霉素表达盒取代内源性小鼠TCRα基因座TCRAJ1-TCRAJ28区的靶向载体(MAID 1539)。通过同源重组对来自小鼠BAC克隆RP23-117i19(Invitrogen)的DNA进行修饰并将其作为用跟在loxP位点后的PGK-新霉素表达盒取代内源性小鼠TCRα和δ基因座TCRAV1周围(包括其)～15kb区域的靶向载体(MAID 1535)。通过染色体核型分析和本领域公知的筛选方法(例如TAQMAN™)对携带双靶向染色体(即用两个靶向载体靶向的单一的内源性小鼠TCRα基因座)的ES细胞进行确证。使用CRE重组酶处理经修饰的ES细胞,以介导两个loxP位点之间的区域(即所述区域由来自TCRAV1至TCRAJ1的内源性小鼠TCRα基因座组成)的缺失并且仅保留单一loxP位点、新霉素表达盒以及小鼠恒定区和增强子区。这一策略使得缺失小鼠TCRα/δ基因座(MAID 1540)的生成。

[0262] 针对TCRα的第一个人源靶向载体具有来自CTD2216p1和CTD2285m07BAC克隆(Invitrogen)的191,660bp的人源DNA,其含有前两个连续的人源TCRαV基因区段(TRAV40&41)和61个TCRαJ(50个功能性的)基因区段。通过同源重组对该BAC进行修饰以使其含有处于用于连接3'小鼠同源臂的TCRαJ1基因区段下游403bp的Not1位点和用于连接5'小鼠同源臂的5'AsiSI位点。使用两个不同的同源臂与该人源片段连接:3'同源臂含有来自RP23-6A14BAC克隆的内源性小鼠TCRα序列和5'同源臂含有来自小鼠BAC克隆RP23-117i19的小鼠TCRα的5'内源性TCRα序列。将该小鼠-人源嵌合BAC作为制备在小鼠TCRα基因座的人源TCRα基因区段和上游loxp-ub-潮霉素-loxp表达盒初始插入的靶向载体(MAID 1626)(图4B)。MAID 1626靶向载体的交界处核酸序列(SEQ ID NO:1-3)如表2所示。

[0263] 随后,利用相同的小鼠5'臂制备一系列人源靶向载体,所述小鼠5'臂含有来自小鼠BAC克隆RP23-117i19小鼠TCRα的内源性5'TCRα序列以及可替代的loxP-新霉素-loxP和loxP-潮霉素-loxP(或针对MAID 1979为frt-潮霉素-frt)选择性表达盒。

[0264] 为产生含有共计8个人源TCRαV(7个功能性的)和61个人源TCRαJ(50个功能性的)基因区段的人源TCRα小型基因座,通过同源重组对来自人源BAC克隆RP11-349p11(Invitrogen)的DNA进行修饰并将其作为靶向载体(MAID 1767)(图4C)。其所加入的104,846bp人源DNA含有接下来6个(5个功能性的)连续的人源TCRαV基因区段(TRAV35至TRAV39)和5'loxP-ub-新霉素-loxP表达盒。将所得到的含有5'loxp-ub-新霉素-loxP表达盒和共计8个人源TCRαV(7个功能性的)和61个人源TCRαJ基因区段的TCRα基因座可操作地与小鼠TCRα恒定基因和增强子连接。MAID 1767靶向载体的交界处核酸序列(SEQ ID NO:4和5)如表2所示。

[0265] 为生成含有共计23个人源TCRαV(17个功能性的)和61个人源TCRαJ基因区段的人源TCRα小型基因座,通过细菌同源重组对来自含有从5'至3':唯一的I-CeuI位点,小鼠TCRA基因座5'端的用于同源重组至ES细胞的20kb小鼠TCRA臂,以及反向的loxP-Ub-Hyg-loxP表达盒的小鼠BAC克隆的DNA进行修饰以使其从5'至3'含有:唯一的I-CeuI位点、小鼠TCRA基因座5'端的20kb小鼠TCRA臂、frt-pgk-Hyg-frt表达盒以及唯一的AsiSI位点。通过同源重组对来自人源BAC克隆RP11-622o20(Invitrogen)携带人TCRαV22-V34的DNA进行修饰以使其在唯一的I-CeuI和AsiSI位点之间含有Spec表达盒。随后,通过标准限制性酶切/连接技术用在经修饰的小鼠BAC克隆I-Ceul和AsiSI位点之间的序列取代经修饰的人源BAC克隆中

的Spec表达盒。所得到的靶向载体(MAID 1979;图4D)引入了136,557bp的人源DNA,其中含有接下来15个(10个功能性的)连续的人源TCRαJ基因区段(TRAV22至TRAV34)和5'frt-pgk-Hyg-frt表达盒。将所得到的含有5'frt-pgk-Hyg-frt表达盒和共计23个人源TCRαV(17个功能性的)和61个人源TCRαV基因区段的TCRα基因座可操作地与小鼠TCRα恒定基因和增强子连接。MAID 1779靶向载体的交界处核酸序列(SEQ ID NO:6和7)如表2所示。

[0266] 为产生含有共计35个人源TCRαV(28个功能性的)和61个人源TCRαJ基因区段的人源TCRα小型基因座,通过同源重组对来自人源BAC克隆CTD2501-k5(Invitrogen)的DNA进行修饰并将其作为靶向载体(MAID 1769)(图4E)。其所加入的124,118bp人源DNA含有接下来12个(11个功能性的)连续的人源TCRαV基因区段(TRAV13-2至TRAV21)和5'loxP-ub-新霉素-loxP表达盒。将所得到的含有5'loxp-ub-新霉素-loxP表达盒和共计35个人源TCRαV(28个功能性的)和61个人源TCRαJ基因区段的TCRα基因座可操作地与小鼠TCRα恒定基因和增强子连接。MAID 1769靶向载体的交界处核酸序列(SEQ ID NO:8和9)如表2所示。

[0267] 为产生含有共计48个人源TCRαV(39个功能性的)和61个人源TCRαJ基因区段的人源TCRα小型基因座,通过同源重组对来自人源BAC克隆RP11-92F11(Invitrogen)的DNA进行修饰并将其作为靶向载体(MAID 1770)(图4F)。其所加入的145,505bp人源DNA含有接下来13个(11个功能性的)连续的人源TCRαJ基因区段(TRAV6至TRAV8.5)和5'loxP-ub-潮霉素-loxP表达盒。将所得到的含有5'loxp-ub-潮霉素-loxP表达盒和共计48个人源TCRαV(39个功能性的)和61个人源TCRαJ基因区段的TCRα基因座可操作地与小鼠TCRα恒定基因和增强子连接。MAID 1770靶向载体的交界处核酸序列(SEQ ID NO:10和11)如表2所示。

[0268] 为产生含有共计54个人源TCRαV(45个功能性的)和61个人源TCRαJ基因区段的人源TCRα小型基因座,通过同源重组对来自人源BAC克隆RP11-780M2(Invitrogen)的DNA进行修饰并将其作为靶向载体(MAID 1777)(图4G)。其所加入的148,496bp人源DNA含有接下来6个(6个功能性的)连续的人源TCRαV基因区段(TRAV1-1至TRAV5)和5'loxP-ub-新霉素-loxP表达盒。将所得到的含有5'loxp-ub-新霉素-loxP表达盒和共计54个人源TCRαV(45个功能性的)和61个人源TCRαJ基因区段的TCRα基因座可操作地与小鼠TCRα恒定基因和增强子连接。MAID 1771靶向载体的交界处核酸序列(SEQ ID NO:12和13)如表2所示。

[0269] 在任意上述步骤中,通过Cre或Flp重组酶将选择性表达盒缺失除去。此外,可以如图5所示引入人源TCRδ基因座。

[0270] 实施例3:TCRβ可变基因座的逐步人源化

[0271] 图6和7中概述了使用逐步人源化策略用对应于人源TCRβ的67个V、2个D和14个J区段的0.6百万碱基DNA取代对应于小鼠TCRβ基因座33个V、2个D和14个J小鼠区段的0.6百万碱基DNA。用于TCRβ基因座逐步人源化策略的不同靶向载体的交界处核酸序列汇总于表3,并且包括在序列表中。

[0272] 表3:不同TCRβ基因座靶向载体的交界处核酸序列

[0273]

MAID NO.	SEQ ID NO	描述
1625	14	TCRβ可变基因座（接近上游小鼠胰蛋白酶原基因）上游小鼠序列的3'端和*frt*-Ub-Neo-*frt*表达盒的5'端之间的交界处核酸序列。
	15	*frt*-Ub-Neo-*frt*表达盒的3'端和人源TCRVβ18-TCRVβ29-1插入的5'端之间的交界处核酸序列。
1715	16	人源TCRVβ18-TCRVβ29-1插入的3'端和小鼠TCRVβ区段（接近下游小鼠胰蛋白酶原基因）下游小鼠序列的5'端之间的交界处核酸序列。
	17	下游小鼠胰蛋白酶原基因的3'端和人源TCRDβ1-TCRJβ1-1-TCRJβ1-6插入包括IceuI位点的5'端之间的交界处核酸序列。
	18	人源TCRDβ1-TCRJβ1-1-TCRJβ1-6插入的3'端和*lox*P-Ub-Hyg-*lox*P表达盒的5'端之间的交界处核酸序列。
	19	*lox*P-Ub-Hyg-*lox*P表达盒的3'端和接近小鼠Cβ1基因的小鼠序列的5'端之间的交界处核酸序列。
	20	接近小鼠Cβ1基因的小鼠序列的3'端和人源TCRDβ2-TCRJβ2-1-TCRJβ2-7插入包括NotI位点的5'端之间的交界处核酸序列。
	21	人源TCRDβ2-TCRJβ2-1-TCRJβ2-7插入的3'端和TCRβ可变基因座（接近Cβ2小鼠序列）下游小鼠序列的5'端之间的交界处核酸序列。
1791	22	TCRβ可变基因座（接近上游小鼠胰蛋白酶原序列）的3'端和*frt*-Ub-Hyg-frt表达盒的5'端之间的交界处核酸序列。
	23	*frt*-Ub-Hyg-frt表达盒的3'端和人源TCRVβ6-5-TCRVβ17插入的5'端之间的交界处核酸序列。
1792	24	TCRβ可变基因座（接近上游小鼠胰蛋白酶原序列）的3'端和*frt*-Ub-Neo-frt表达盒的5'端之间的交界处核酸序列。
	25	*frt*-Ub-Neo-frt表达盒的3'端和人源TCRVβ1-TCRVβ12-2插入的5'端之间的交界处核酸序列。

[0274]

[0275]

MAID NO.	SEQ ID NO	描述
6192	26	接近小鼠 Cβ2 基因的小鼠序列的 3'端和人源 TCRBV30 外显子 2 序列的 5'端之间的交界处核酸序列。
	27	人源 TCRBV30 外显子 1 序列的 5'端和 TCRβ基因座下游小鼠序列的 5'端之间的交界处核酸序列。

[0276] 根据IMGT数据库对人源TCRβ可变区区段进行编号。各交界处至少有100bp(每个末端约50bp)包括在序列表中。

[0277] 特别地,通过同源重组对来自小鼠BAC克隆RP23-153p19(Invitrogen)的DNA进行修饰并且将其作为用跟在loxP位点后的PGK-neo表达盒取代内源性小鼠TCRβ基因座的3'胰蛋白酶原基因簇上游紧邻的17kb区域(包括TCRBV30)的靶向载体(MAID 1544)(图8A)。通过同源重组对来自小鼠BAC克隆RP23-461h15(Invitrogen)的DNA进行修饰并将其作为用跟在loxP位点后的Ub-潮霉素表达盒取代内源性小鼠TCRβ基因座的5'胰蛋白酶原基因簇下游8355bp区域(包括TCRBV2和TCRBV3)的靶向载体(MAID 1542)。通过染色体核型分析和本领域公知的筛选方法(例如TAQMAN™)对携带双靶向染色体(即用两个靶向载体靶向的单一的内源性小鼠TCRβ基因座)的ES细胞进行确证。使用CRE重组酶处理经修饰的ES细胞,以介导5'和3'loxP位点之间的区域(由来自TCRBV2至TCRBV30的内源性小鼠TCRβ基因座组成)的缺失并且仅保留单一loxP位点、潮霉素表达盒以及小鼠TCRBD、TCRBJ、恒定和增强子区序列。在胰蛋白酶原基因簇5'端上游保留一个小鼠TCRβ,并且在小鼠Eβ下游保留一个小鼠TCRBβ,如图8A所示。

[0278] 针对TCRβ的第一人源靶向载体具有来自CTD2559j2 BAC克隆(Invitrogen)的125,781bp人源DNA,其含有第一个14个连续的人源TCRβV基因区段(TRBV18-TRBV29-1)。通过同源重组对该BAC进行修饰以使其含有用于连接5'和3'小鼠同源臂的5'AsiSI位点和3'AscI位点。使用两个不同的同源臂与该人源片段连接:一个同源臂含有包围来自RP23-153p19BAC克隆的小鼠胰蛋白酶原基因下游的内源性TCRβ序列,另一个含有包围来自小鼠BAC克隆RP23-461h15的小鼠胰蛋白酶原基因上游的内源性TCRβ序列。将该小鼠-人源嵌合BAC作为制备在小鼠TCRβ基因座的人源TCRβ基因区段和上游frt-ub-新霉素-frt表达盒初始插入的靶向载体(MAID 1625),并且所得到的人源TCRβ小型基因座含有14个人源(8个功能性的)TCRβV(图8B)。MAID 1625靶向载体的交界处核酸序列(SEQ ID NO:14-16)如表3所示。

[0279] 为了用人源TCRβD和J区段取代小鼠TCRβD和J区段,通过同源重组对来自小鼠BAC克隆RP23-302p18(Invitrogen)和人源BAC克隆RP11-701D14(Invitrogen)的DNA进行修饰并将其作为靶向载体(MAID 1715)引入含有上文所述的TCRβV小型基因座(即MAID 1625)的ES细胞。该修饰用含有人源TCRBD1-J1、loxP Ub-潮霉素-loxP表达盒、小鼠恒定区1、人源TCRBD2-J2的～25425bp的序列在内源性小鼠TCRβ基因座取代～18540bp的区域(从3'胰蛋白酶原基因的polyA下游100bp至D2簇中J区段下游100bp,包括小鼠TCRBD1-J1、小鼠恒定区1和小鼠TCRBD2-J2)(图8C(i))。通过染色体核型分析和本领域公知的筛选方法(例如

TAQMAN™)对携带双靶向染色体(即用两个靶向载体靶向的单一的内源性小鼠TCRβ基因座)的ES细胞进行确证。使用CRE重组酶处理经修饰的ES细胞,以介导潮霉素表达盒缺失从而在D1J簇的人源J区段下游仅保留单一loxP位点(图8C(ii))。MAID 1715靶向载体的交界处核酸序列(SEQ ID NO:17-21)如表3所示。

[0280] 随后,利用相同的小鼠5'臂制备一系列人源靶向载体,所述小鼠5'臂含有来自小鼠BAC克隆RP23-461h15的包围小鼠胰蛋白酶原基因上游的内源性TCRβ序列以及可替代的选择性表达盒。.

[0281] 为产生含有共计40个人源TCRβV(30个功能性的)和人源TCRβD和J基因区段的人源TCRβ小型基因座,使用标准细菌同源重组、限制性酶切/连接以及其他克隆技术通过同源重组对来自人BAC克隆RP11-134h14和RP11-785k24(Invitrogen)的DNA进行修饰并组合至靶向载体(MAID 1791)。MAID 1791靶向载体的引入增加了198,172bp人源DNA,其含有接下来26个(22个功能性的)连续的人源TCRβV基因区段(TRBV6-5至TRBV17)和5'frt-ub-潮霉素-frt表达盒。将所得到的含有5'frt-ub-潮霉素-frt表达盒和共计40个人源TCRβV(30个功能性的)和人源TCRβD和J基因区段的TCRβ基因座可操作地与小鼠TCRβ恒定基因和增强子连接(图8D)。MAID 1791靶向载体的交界处核酸序列(SEQ ID NO:22和23)如表3所示。

[0282] 为产生含有共计66个人源TCRβV(47个功能性的)和人源TCRβD和J基因区段的人源TCRβ小型基因座,通过同源重组对人BAC克隆RP11-902B7(Invitrogen)的DNA进行修饰并将其作为靶向载体(MAID 1792)。其所加入的159,742bp人源DNA含有接下来26个(17个功能性的)连续的人源TCRβV基因区段(TRBV1至TRBV12-2)和5'frt-ub-新霉素-frt表达盒。将所得到的含有5'frt-ub-新霉素-frt表达盒和共计66个人源TCRβV(47个功能性的)和人源TCRβD和J基因区段的TCRβ基因座可操作地与小鼠TCRβ恒定基因和增强子连接(图8E)。MAID 1792靶向载体的交界处核酸序列(SEQ ID NO:24和25)如表3所示。

[0283] 在任意上述步骤中,通过Cre或Flp重组酶将选择性表达盒缺失除去。例如,如图7所示,MAID 1716对应于潮霉素表达盒缺失的MAID 1715。

[0284] 最后,产生了含有共计67个人源TCRβV(48个功能性的)和人源TCRβD和J区段的人源TCRβ小型基因座。小鼠TCRBV31位于TCRBC2的3'端~9.4kb(第二TCRB恒定区序列)并且其与其他TCRBV区段方向相反。等效的人源V区段是TCRBV30,其位于人源TCRB基因座中相似位置。

[0285] 为了将TCRBV31人源化,通过细菌同源重组对含有小鼠TCRBV31的小鼠BAC克隆进行修饰以制备LTVEC MAID 6192(图8F)。使用同源的人源TCRBV30序列取代整个编码区,从外显子1的起始密码子开始、内含子、3'UTR和TCRBV31的重组信号序列(RSS)。5'UTR作为小鼠序列保留。将自缺失表达盒(lox2372-泛素启动子-Hyg-PGKpolyA-鱼精蛋白启动子-Cre-SV40polyA-lox2372)插入内含子(外显子1 3'72bp,外显子2 5'1,289bp)用于选择。为了简单起见,图7和图8描述了hTCRBV30 3'的选择性表达盒,而将其设计成位于hTCRBV30基因外显子1和外显子2之间的内含子中。在减数分裂后的精子细胞中鱼精蛋白启动子驱动Cre特异性地转录表达,这样在F1代的小鼠中所述表达盒是"自缺失"。

[0286] MAID 6192靶向载体的交界处核酸序列(SEQ ID NO:26和27)如表3所示。将MAID 6192DNA电转染至MAID1792ES细胞。针对潮霉素抗性对ES细胞克隆进行选择并且针对小鼠TCRB31等位基因的缺失和人源TCRB30等位基因的获得进行筛选。

[0287] 使用类似的改造策略可选择地缺失剩余的5'小鼠TCRβV区段。

[0288] 实施例4:TCRα/TCRβ小鼠的生成

[0289] 在TCRα和TCRβ基因座逐步人源化的各步骤中,可以将针对人源化的TCRα可变基因座的纯合子小鼠与针对人源化的TCRβ可变基因座的纯合子小鼠交配以形成包含人源化的TCRα和TCRβ可变基因座的子代。针对人源化的TCRα和人源化的TCRβ基因座将子代交配以获得纯合子。

[0290] 在一个实施方式中,将包含8个人源Vα和61个人源Jα的针对人源化的TCRα可变基因座的纯合子小鼠(MAID 1767;"1767 HO")与包含14个人源Vβ、2个人源Dβ和14个人源Jβ的针对人源化的TCRβ可变基因座的纯合子小鼠(MAID 1716;"1716 HO")交配。针对两个人源化的基因座将子代交配以获得纯合子。

[0291] 实施例5:针对人源化的TCRα和/或TCRβ基因座的纯合子小鼠中脾脏T细胞的产生

[0292] 将来自野生型(WT)小鼠;缺失小鼠TCRα基因座的小鼠("MAID1540",见图3);针对人源TCRα基因座的纯合子小鼠("MAID 1767",见图3);除了两个剩余的小鼠V区段外缺失TCRβV区段的小鼠("MAID1545",见图7);针对包含两个剩余的小鼠V区段的人源TCRβ基因座的纯合子小鼠且("MAID 1716",见图7)以及针对TCRβ基因座还包含两个剩余的小鼠V区段的人源TCRα和TCRβ基因座的纯合子小鼠("MAID 1767 1716")的脾脏使用胶原酶D(Roche Bioscience)进行灌流并使用ACK裂解缓冲液裂解红细胞,随后在RPMI培养基中洗涤。

[0293] 利用流式细胞术对单一WT、MAID 1540、1767、1545、1716和1716 1767代表动物的脾细胞进行评估。简言之,使用标准方法制备细胞悬液。将$1x10^6$个细胞与抗-小鼠CD16/CD32(2.4G2,BD)在冰上孵育10分钟,使用适宜的抗体混合物在冰上染色30分钟。染色后,洗涤细胞并随后在2%甲醛中固定。在LSRII/CantoII/LSRFortessa流式细胞仪上采集数据并使用FlowJo进行分析。

[0294] 使用抗-小鼠FITC-CD3(17A2,BD)对脾细胞染色。如图9所示,具有人源TCR区段的小鼠能够产生显著数量的CD3+T细胞,而TCRα小鼠基因座缺失的小鼠不会出现这种情况。TCRβ基因座缺失的小鼠也产生CD3+T细胞,这可能是由于利用了剩余的3'小鼠V区段(见下文)。

[0295] 实施例6:针对人源化的TCRα和/或TCRβ基因座的纯合子小鼠中胸腺T细胞的发育

[0296] 为确定针对人源化的TCRα和/或TCRβ基因座的纯合子小鼠是否在胸腺中显示出正常的T细胞发育,取WT、1767 HO、1716 HO和1716 HO 1767 HO年龄匹配动物(7-10周龄)各四只的脾细胞用于流式细胞术以评估不同发育阶段T细胞的产生情况,以及评估各DN、DP、CD4SP和CD8SP T细胞的频率和绝对数量。

[0297] 根据表1中汇总的CD4、CD8、CD44和CD25细胞表面标记物的存在情况确定细胞类型。胸腺中细胞类型的采用与细胞表面标记物表达情况的关系如下:双阴性(DN)细胞(CD4-CD8-)、双阳性(DP)细胞(CD4+CD8+)、CD4单阳性细胞(CD4+CD8-)、CD8单阳性细胞(CD4-CD8+)、双阴性1/DN1细胞(CD4-CD8-,CD25-CD44+)、双阴性2/DN2细胞(CD4-CD8-,CD25+CD44+)、双阴性3/DN3细胞(CD4-CD8-,CD25+CD44-)、双阴性4/DN4细胞(CD4-CD8-,CD25-CD44-)。

[0298] 利用流式细胞术评估胸腺细胞。简言之,使用标准方法制备细胞悬液。如实施例5所述进行流式细胞术。所使用的抗体为:抗-小鼠PE-CD44(IM7,BioLegend)、PeCy7-CD25(PC61,BioLegend)、APC-H7-CD8a(53-6.7,BD)和APC-CD4(GK1.5,eBioscience)。

[0299] 如图10和图11所示，针对人源化的TCRα、TCRβ以及TCRα和TCRβ两者的纯合子小鼠能够产生DN1、DN2、DN3、DN4、DP、CD4SP和CD8SP T细胞，表明人源化的基因座产生的T细胞能够在胸腺中经历T细胞发育。

[0300] 实施例7：针对人源化的TCRα和/或TCRβ基因座的纯合子小鼠中脾脏T细胞的分化

[0301] 为确定针对人源化的TCRα和/或TCRβ基因座的纯合子小鼠是否在外周(例如脾脏)显示出正常的T细胞分化，取WT、1767 HO、1716 HO和1716 HO 1767 HO年龄匹配动物(7-10周龄)各四只用于流式细胞术以评估在脾脏中不同T细胞类型的产生情况(CD3+、CD4+、CD8+、T初始、Tcm和Teff/em)，以及评估脾脏中各T细胞类型的绝对数量。

[0302] 根据CD19(B细胞标记物)、CD3(T细胞标记物)、CD4、CD8、CD44和CD62L(L-选择素)细胞表面标记物的存在情况确定细胞类型。细胞类型的采用与脾脏中细胞表面标记物表达情况的关系如下：T细胞(CD3+)、CD4T细胞(CD3+CD4+CD8-)、CD8T细胞(CD3+CD4-CD8+)、CD4效应/效应记忆T细胞(CD3+CD4+CD8-CD62L-CD44+)、CD4中心记忆T细胞(CD3+CD4+CD8-CD62L+CD44+)、CD4初始T细胞(CD3+CD4+CD8-CD62L+CD44-)、CD8效应/效应记忆T细胞(CD3+CD4-CD8+CD62L-CD44+)、CD8中心记忆T细胞(CD3+CD4-CD8+CD62L+CD44+)、CD8初始T细胞(CD3+CD4-CD8+CD62L+CD44-)。

[0303] 利用流式细胞术评估脾细胞。简言之，使用标准方法制备细胞悬液。如实施例5所述进行流式细胞术。所使用的抗体为：抗-小鼠FITC-CD3(17A2,BD)、PE-CD44(IM7,BioLegend)、PerCP-Cy5.5-CD62L(Mel-14,BioLegend)、APC-H7-CD8a(53-6.7,BD)、APC-CD4(GK1.5,eBioscience)和V450-CD19(1D3,BD)。

[0304] 如图12-14所示，在针对人源化的TCRα、TCRβ以及TCRα和TCRβ两者的纯合子小鼠的脾脏中T细胞经历T细胞分化，并且存在CD4+和CD8+T细胞。此外，在所检测小鼠的脾脏中检测到了记忆T细胞。

[0305] 实施例8：在人源化的TCR小鼠中人源V区段的利用情况

[0306] 在针对人源化的TCRβ基因座的纯合子小鼠(1716 HO)和针对人源化的TCRβ和TCRα基因座的纯合子小鼠(1716 HO 1767 HO)中分别使用流式细胞术和TAQMAN™实时PCR在蛋白和RNA水平评估人源TCRβV区段的表达情况。

[0307] 对于流式细胞术而言，根据实施例5所述制备脾脏T细胞并进行分析。对于流式细胞术而言，使用TCRβ库试剂盒(IOTEST®Beta Mark,Beckman Coulter)。所述试剂盒含有对多种人源TCRBV例如hTRBV-18、-19、-20、-25、-27、-28和-29具有特异性的抗-人抗体。

[0308] 结果汇总于图15。图15A(CD8T细胞重叠)和图15B(CD4T细胞重叠)中的表显示了在利用多种人源TCRβV区段的1716 HO和1716 HO 1767 HO小鼠中的脾脏T细胞。使用野生型小鼠作为阴性对照。

[0309] 对于实时PCR而言，使用MAGMAX™-96微阵列总RNA分离试剂盒(Ambion by Life Technologies)根据生产厂商的说明书从脾脏和胸腺中纯化总RNA。使用MAGMAX™TURBO™DNase缓冲液和上文所列MAGMAX试剂盒(Ambion by Life Technologies)中的TURBO DNase除去基因组DNA。使用SUPERSCRIPT®VILO™Master Mix(Invitrogen by Life Technologies)将mRNA(多至2.5ug)逆转录为cDNA。将cDNA稀释为2-5ng/μL，并使用ABI 7900HT序列检测系统(Applied Biosystems)利用TAQMAN®Gene Expression Master Mix(Applied Biosystems by Life Technologies)扩增10-25ng cDNA，根据生产

厂商的说明书使用表4中所示的引物和Taqman MGB探针(Applied Biosystems)或BHQ1/BHQ-Plus探针(Biosearch Technologies)。将各基因的相对表达情况归一化至鼠源TCRβ恒定1(TRBC1)对照。

[0310] 表4:利用实时PCR(TAQMAN™)在人源化的TCR小鼠中检测TCRβV区段和恒定区RNA表达所使用的引物和探针

[0311]

TRBV	正义引物(5'-3')		反义引物(5'-3')		探针(5'-3')	
	序列	SED ID NO	序列	SED ID NO	序列	SED ID NO
hTRBV18	CCGGCGTCATGCAGAA	28	GGGCTGCATCTCAGTCTTGC	29	FAM-CACCTGGTCAGGAGGAGG-MGB	30
hTRBV19	GGAATCACTCAGTCCCCAAAG	31	ATTCTGTTCACAACTCAGGGTCA	32	FAM-TCAGAAAGGAAGGACAGAAT-MGB	33
hTRBV20	CGAGCAAGGCGTCGAGAA	34	GGACAAGGTCAGGCTTGCA	35	FAM-ACAAGTTTCTCATCAACC- MGB	36
hTRBV24	TGTTACCCAGACCCCAAGGA	37	TCTGAGAACATTCCAGCATAATCCT	38	FAM-TAGGATCACAAAGACAGGAA -MGB	39
hTRBV25	TCCCCTGACCCTGGAGTCT	40	TGCTGGCACAGAGGTACTGAGA	41	FAM-CAGGCCCTCACATAC- MGB	42
hTRBV27	AAGCCCAAGTGACCCAGAA	43	ATTCTGAGAACAAGTCACTGTTAACTTC	44	FAM-CTCATCACAGTGACTGGAA- MGB	45
hTRBV28	GTGAAAGTAACCCAGAGCTCGAG	46	ATCCTGGACACATTCCAGAAAAAC	47	FAM-ATATCTAGTCAA	48

[0312]

TRBV	正义引物(5'-3')		反义引物(5'-3')		探针(5'-3')	
	序列	SED ID NO	序列	SED ID NO	序列	SED ID NO
					AAGGACGGGA-MGB	
hTRBV29	TGTCATTGACAAGTTTCCCATCAG	49	TGCTGTCTTCAGGGCTCATG	50	FAM-TCAACTCTGACTGTGAGCA- MGB	51
mTRBC1	AGCCGCCTGAGGGTCTCT	52	GCCACTTGTCCTCCTCTGAAAG	53	FAM-TACCTTCTGGCACAATCCTCGCA -BHQ	54

[0313] 如图16A-B所示,针对人源化的TCRβ基因座的纯合子小鼠(1716 HO)和针对人源化

的TCRβ和TCRα基因座的纯合子小鼠(1716 HO 1767 HO)在胸腺和脾脏中均显示出不同人源TCRβ区段RNA的表达。小鼠还显示出小鼠TRBV-1和TRBV-31区段RNA的表达(数据未列出),但是通过流式细胞术未检测到小鼠TRBV-1蛋白(数据未列出)。

[0314] 如图8F所示,小鼠TRBV-31区段被人源TRBV-30区段取代,并且小鼠由本申请所述的MAID 6192ES细胞生成。如本申请所述通过流式细胞术和/或实时PCR检测所得到的纯合动物脾脏和胸腺中包括TRBV-30的人源Vβ区段的利用情况。也可以将mTRBV-1区段缺失。

[0315] 实施例9:在针对23个人源TCR Vα区段的纯合子小鼠中T细胞的发育

[0316] 在此前的实施例中表征了纯合的人源化的TCRα小鼠,所述小鼠含有8个人源Vα区段和61个人源Jα区段(1767 HO,见图3)。针对其生成脾脏CD3+T细胞的能力和在脾脏中显示的T细胞的发育情况对纯合人源化的TCRα小鼠进行检测,所述小鼠包含23个人源Vα区段和61个人源Jα区段(1979HO,见图3)。

[0317] 如前述实施例所述使用适宜的抗体通过流式细胞术获得实验性数据。如图17所示,针对23个人源Vα区段和61个人源Jα区段的纯合子小鼠产生了显著数量的脾脏CD3+T细胞,并且外周CD3+T细胞的百分率与野生型动物相当(图19)。

[0318] 而且,在1979HO小鼠中的胸腺细胞能够经历T细胞发育并且含有DN1、DN2、DN3、DN4、DP、CD4SP和CD8SP阶段的T细胞(图18)。

[0319] 实施例10:在针对完整的人源TCRα和TCRβ可变区区段库的纯合子小鼠中T细胞的发育和分化

[0320] 针对其产生经历正常T细胞发育的胸腺细胞、在外周产生经历正常T细胞分化的T细胞以及利用完整的其人源Vα和Vβ区段库的能力对针对完整的人源TCRα可变区区段库的纯合子小鼠(即54个人源Vα和61个人源Jα)和完整的人源TCRβ可变区区段库的纯合子小鼠(67个人源Vβ、2个人源Dβ和14个人源Jβ)“1771HO 6192HO”进行检测(见图3和图7)。

[0321] 如上文中的实施例5和6所述使用抗-小鼠CD4、CD8、CD25和CD44抗体使用流式细胞术确定胸腺中DN1、DN2、DN3、DN4、DP、CD4SP和CD8SP T细胞的存在情况。还使用流式细胞术确定外周CD3+T细胞的数量,以及评估外周T细胞的分化情况(例如在外周中效应和记忆T细胞的存在情况)。如上文中的实施例5和7所述使用抗-小鼠CD3、CD19、CD4、CD8、CD44和CD61L抗体进行实验。

[0322] 最后,使用流式细胞术和/或实时PCR确定在1771HO 6192HO小鼠中的T细胞是否利用了完整的TCRB和TCRA V区段库。对于使用流式细胞术进行的蛋白表达检测而言,使用含有抗-人hTCRBV-特异性抗体的TCRβ库试剂盒(IOTEST®Beta Mark,Beckman Coulter)(参见实施例8)。对于使用实时PCR进行的RNA表达检测而言,根据生产厂商的说明和根据实施例8所述使用人源TCR-V引物和Taqman探针扩增脾脏或胸腺cDNA。

[0323] 等同物

[0324] 本领域技术人员将识别,或者能够经过使用不超过常规的实验确定本申请所述的发明的特定实施方式的多种等同物。这种等同物旨在包含在下述权利要求中。

[0325] 本申请通篇引用的非专利文件、专利申请和专利的全部内容通过引用整体并入本申请。

[0001]

<110> 瑞泽恩制药公司

<120> T 细胞受体基因修饰小鼠

<130> 1290A-WO

<140> 待分配

<141> 2017-10-09

<150> 61/552,582

<151> 2011-10-28

<150> 61/621,198

<151> 2012-04-06

<150> 61/700,908

<151> 2012-09-14

<160> 54

<170> FastSEQ Windows 4.0 版

<210> 1

<211> 100

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 1

atggagtagt cagaacacac tcttcagaag ggactcctga tttcaaaggg ggtaccgggc 60

cccccctcga ggtcgacata acttcgtata gcatacatta 100

<210> 2

<211> 108

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 2

ggccatgcat ataacttcgt atagcataca ttatacgaag ttataccggt gcgatcgcgc 60

gcttccctct ctaaccact aattcaaaaa ggattgtaag taatgttt 108

<210> 3

<211> 145

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 3

agacagaccc ctaaacacct ccaaattaaa agcggcaaag agataaggtt ggagctccac 60

cgcggtggcg gccgccaccg cggtggagct cgaggtttcc ggtacttaac aacagagcac 120

agatttagtg gtgagggact ctctc 145

<210> 4

<211> 100

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 4

[0002] atggagtagt cagaacacac tcttcagaag ggactcctga tttcaaaggg ggtaccgggc 60

ccccctcga ggtcgacata acttcgtata gcatacatta 100

<210> 5

<211> 109

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 5

ggccatgcat ataacttcgt atagcataca ttatacgaag ttataccggt gcgatcgctc 60

aagcatgcaa gggtaacata tgttatgaga ttatatttc tttatctca 109

<210> 6

<211> 100

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 6

atggagtagt cagaacacac tcttcagaag ggactcctga tttcaaaggg gggtaccggg 60

ccccccctcg agaagttcct attccgaagt tcctattctc 100

<210> 7

<211> 108

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 7

gttcctattc cgaagttcct attctctaga aagtatagga acttcctagg gcgatcgctc 60

ctctccaggc tcgaattagt attacagttg aggcacgttg tcctcccg 108

<210> 8

<211> 100

<212> DNA

<213> 人工序列

[0003] <220>

<223> 合成的

<400> 8

atggagtagt cagaacacac tcttcagaag ggactcctga tttcaaaggg ggtaccgggc 60

ccccctcga ggtcgacata acttcgtata gcatacatta 100

<210> 9

<211> 108

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 9

ggccatgcat ataacttcgt atagcataca ttatacgaag ttataccggt gcgatcgccg 60

cctccatttc cttcatagga aacatgaagt gaatggggct gtgtgtgt 108

<210> 10

<211> 100

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 10

atggagtagt cagaacacac tcttcagaag ggactcctga tttcaaaggg ggtaccgggc 60

cccccctcga ggtcgacata acttcgtata gcatacatta 100

<210> 11

<211> 108

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 11

ggccatgcat ataacttcgt atagcataca ttatacgaag ttataccggt gcgatcgctg 60

ggagcacgtt ccattattat aacaactttc tgaacacaag agggcagt 108

<210> 12

[0004] <211> 100

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 12

atggagtagt cagaacacac tcttcagaag ggactcctga tttcaaaggg ggtaccgggc 60

cccccctcga ggtcgacata acttcgtata gcatacatta 100

<210> 13

<211> 108

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 13

ggccatgcat ataacttcgt atagcataca ttatacgaag ttataccggt gcgatcgctt 60

taaggtgagg aggcaggcaa tacccccctct ccaccgcatt ctcaatcc 108

<210> 14

<211> 100

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 14

ggggggggtgg ggtggaggag gagggtacag catctcctct ccttcctctc tggtaccgaa 60

gttcctattc cgaagttcct attctctaga aagtatagga 100

<210> 15

<211> 108

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 15

[0005] gaagttccta ttctctagaa agtataggaa cttcctaggg tttcaccggt gcgatcgcgt 60

gaatatacta aaaaccactt aattatatat ttgaaagggt ggatgtta 108

<210> 16

<211> 108

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 16

ctctctccta cccagctcct ctcacacgag cctgaaggcc ctgccaaggt ggcgcgcctt 60

tcaaattgtt gttgagttca aagtgggcaa cagaaaaggg ggtgtgag 108

<210> 17

<211> 130

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 17

aataaatagt aaatttctgt agaatcataa tgaggtctag acccccgggc tcgataacta 60

taacggtcct aaggtagcga aatggcgcgt aatcaagccc agctcttcat gctgcatttt 120

tatcttcttt 130

<210> 18

<211> 100

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 18

ttgactcggg ggtgcctggg tttgactgca atgatcagtt gctgggaagg accggtataa 60

cttcgtataa tgtatgctat acgaagttat atgcatggcc 100

<210> 19

<211> 100

<212> DNA

[0006] <213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 19

ccggcgcgcc ataacttcgt ataatgtatg ctatacgaag ttatgtcgac ataaggtaag 60

acagagtcgt cccttcccat ctggaaccct ctacctttct 100

<210> 20

<211> 107

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 20

gttgatgaat cataaaagaa gagatattca agaaaaggat ggccacactg cggccgcaga 60

ggtattcaag gaaaatgcag actcttcacg taagagggat gaggggc 107

<210> 21

<211> 100

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 21

tccccggagt cggagggtgg accggagctg gaggagctgc cgcggtggcg gccgatgcca 60

tttcattacc tctttctccg cacccgacat agataaagct 100

<210> 22

<211> 100

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 22

gggggggtgg ggtggaggag gagggtacag catctcctct ccttcctctc tggtaccgaa 60

gttcctattc cgaagttcct attctctaga aagtatagga 100

[0007] <210> 23

<211> 108

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 23

gaagttccta ttctctagaa agtataggaa cttcctaggg tttcaccggt gcgatcgcga 60

agcaattaac tgcccctggt ccagttgcct cctctgataa tgcattgt 108

<210> 24

<211> 100

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 24

gggggggtgg ggtggaggag gagggtacag catctcctct ccttcctctc tggtaccgaa 60

gttcctattc cgaagttcct attctctaga aagtatagga 100

<210> 25

<211> 108

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 25

gaagttccta ttctctagaa agtataggaa cttcctaggg tttcaccggt gcgatcgcgt 60

tatctagtag acttaattaa ggatcgatcc ggcgcgccaa tagtcatg 108

<210> 26

<211> 100

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

[0008] <400> 26

gttttccaga cttcaacttg actatcagcc agaaattcag tggcaaaccc ccacccagtc 60

cctaagtgaa ggcccctggg gagtatggtt agggctcagg 100

<210> 27

<211> 100

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 27

cacccaccaa agaaagtgcc caggagaagg gcaaggagag agcagagcat agttcaagat 60

ggtctttgtc taggcttgtc tactctgcac ttgtacttcc 100

<210> 28

<211> 16

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 28

ccggcgtcat gcagaa 16

<210> 29

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 29

gggctgcatc tcagtcttgc 20

<210> 30

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

[0009] <223> 合成的

<400> 30

cacctggtca ggaggagg 18

<210> 31

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 31

ggaatcactc agtccccaaa g 21

<210> 32

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 32

attctgttca caactcaggg tca 23

<210> 33

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 33

tcagaaagga aggacagaat 20

<210> 34

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

[0010] <400> 34

cgagcaaggc gtcgagaa 18

<210> 35

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 35

ggacaaggtc aggcttgca 19

<210> 36

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 36

acaagtttct catcaacc 18

<210> 37

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 37

tgttacccag accccaagga 20

<210> 38

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 38

[0011] tctgagaaca ttccagcata atcct 25

<210> 39

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 39

taggatcaca aagacaggaa 20

<210> 40

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 40

tcccctgacc ctggagtct 19

<210> 41

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 41

tgctggcaca gaggtactga ga 22

<210> 42

<211> 15

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 42

caggccctca catac 15

[0012] <210> 43

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 43

aagcccaagt gacccagaa 19

<210> 44

<211> 28

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 44

attctgagaa caagtcactg ttaacttc 28

<210> 45

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 45

ctcatcacag tgactggaa 19

<210> 46

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 46

gtgaaagtaa cccagagctc gag 23

<210> 47

[0013] <211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 47

atcctggaca cattccagaa aaac 24

<210> 48

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 48

atatctagtc aaaaggacgg ga 22

<210> 49

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 49

tgtcattgac aagtttccca tcag 24

<210> 50

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 50

tgctgtcttc agggctcatg 20

<210> 51

<211> 19

[0014] <212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 51

tcaactctga ctgtgagca 19

<210> 52

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 52

agccgcctga gggtctct 18

<210> 53

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 53

gccacttgtc ctcctctgaa ag 22

<210> 54

[0015] <211> 23

<212> DNA

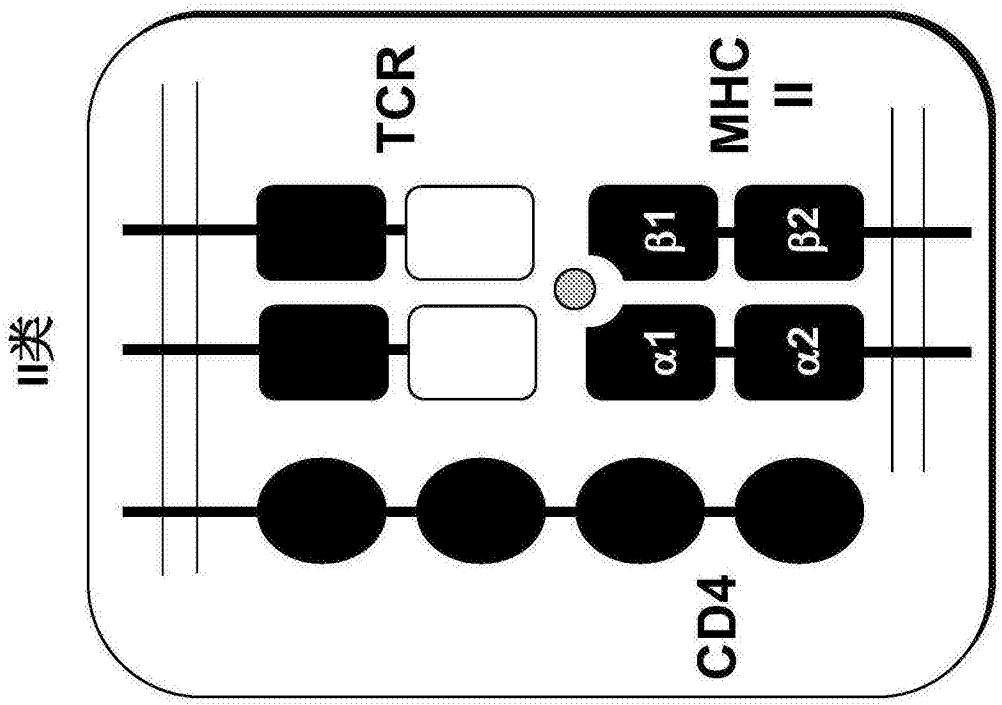
<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 54

taccttctgg cacaatcctc gca 23



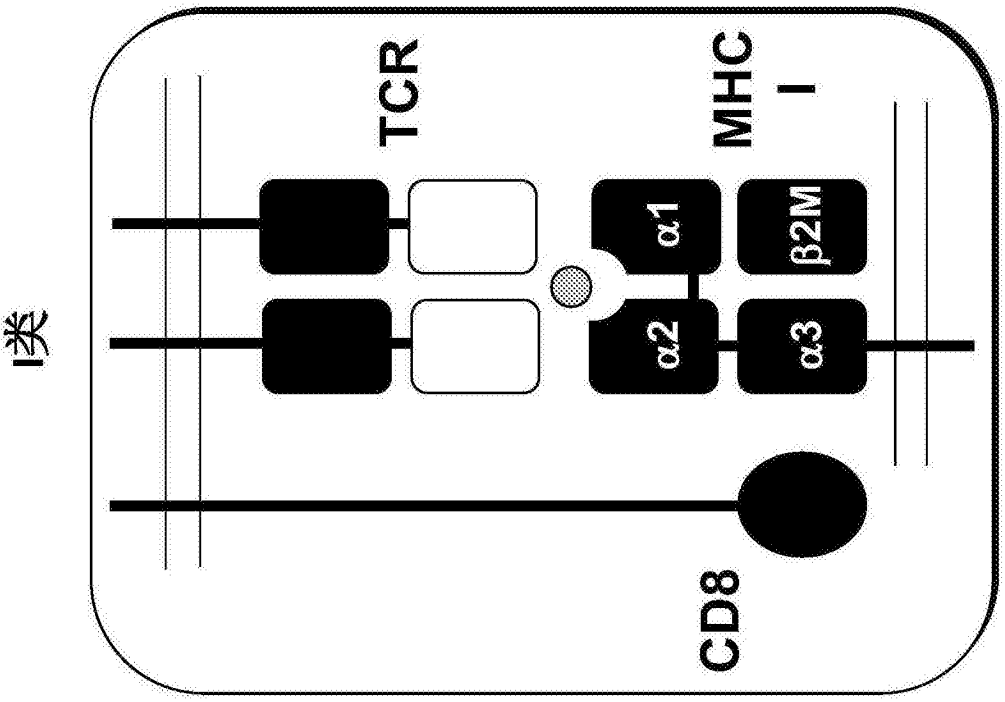


图1

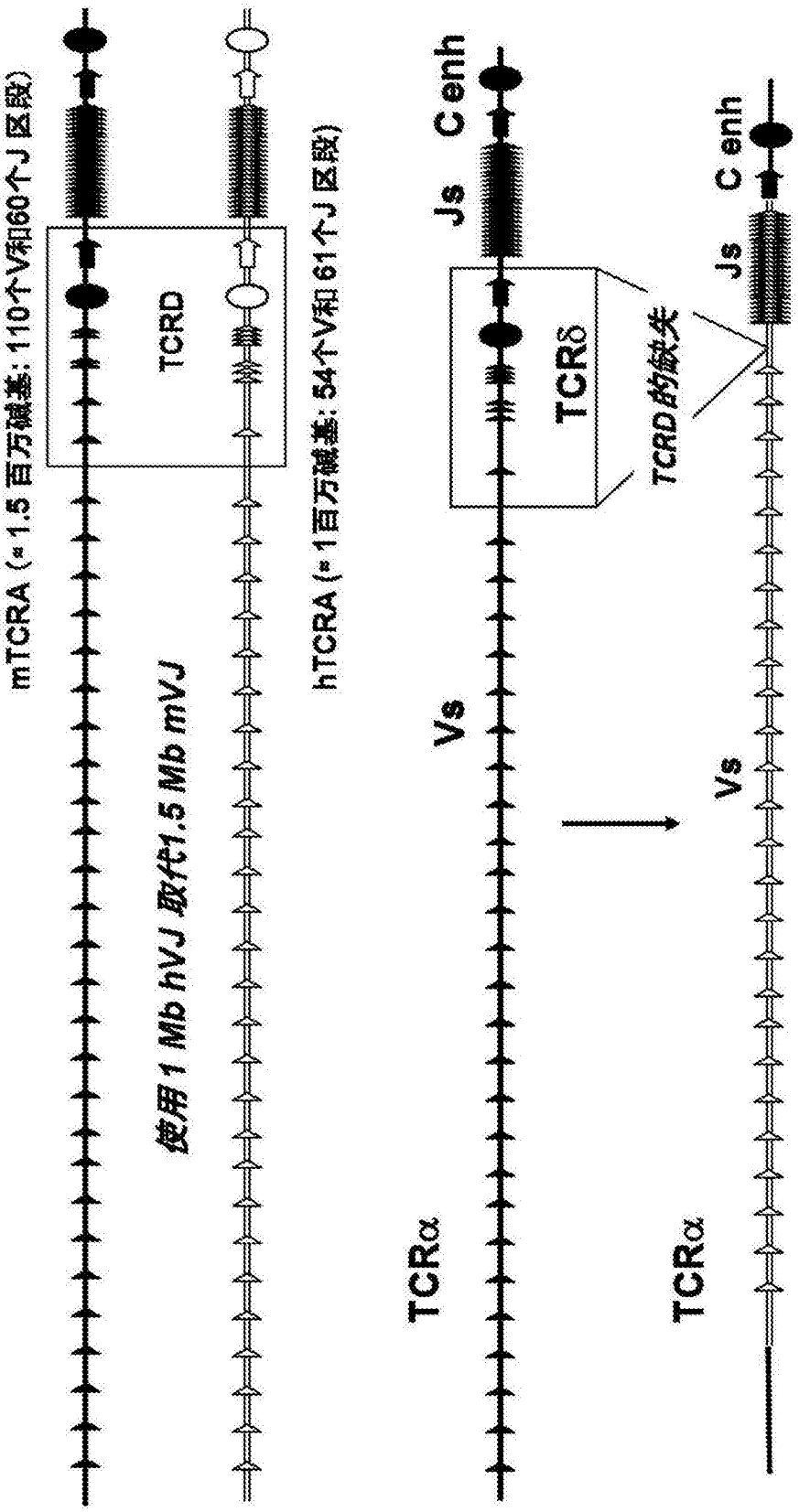

mTCRA (≈1.5 百万碱基; 110个V和60个J 区段)
TCRD
使用1 Mb hVJ 取代1.5 Mb mVJ
hTCRA (≈1百万碱基; 54个V和 61个J 区段)
Js
Cenh
TCRδ
TCRD的缺失
Vs
TCRα
Js
Cenh
Vs
TCRα

图2

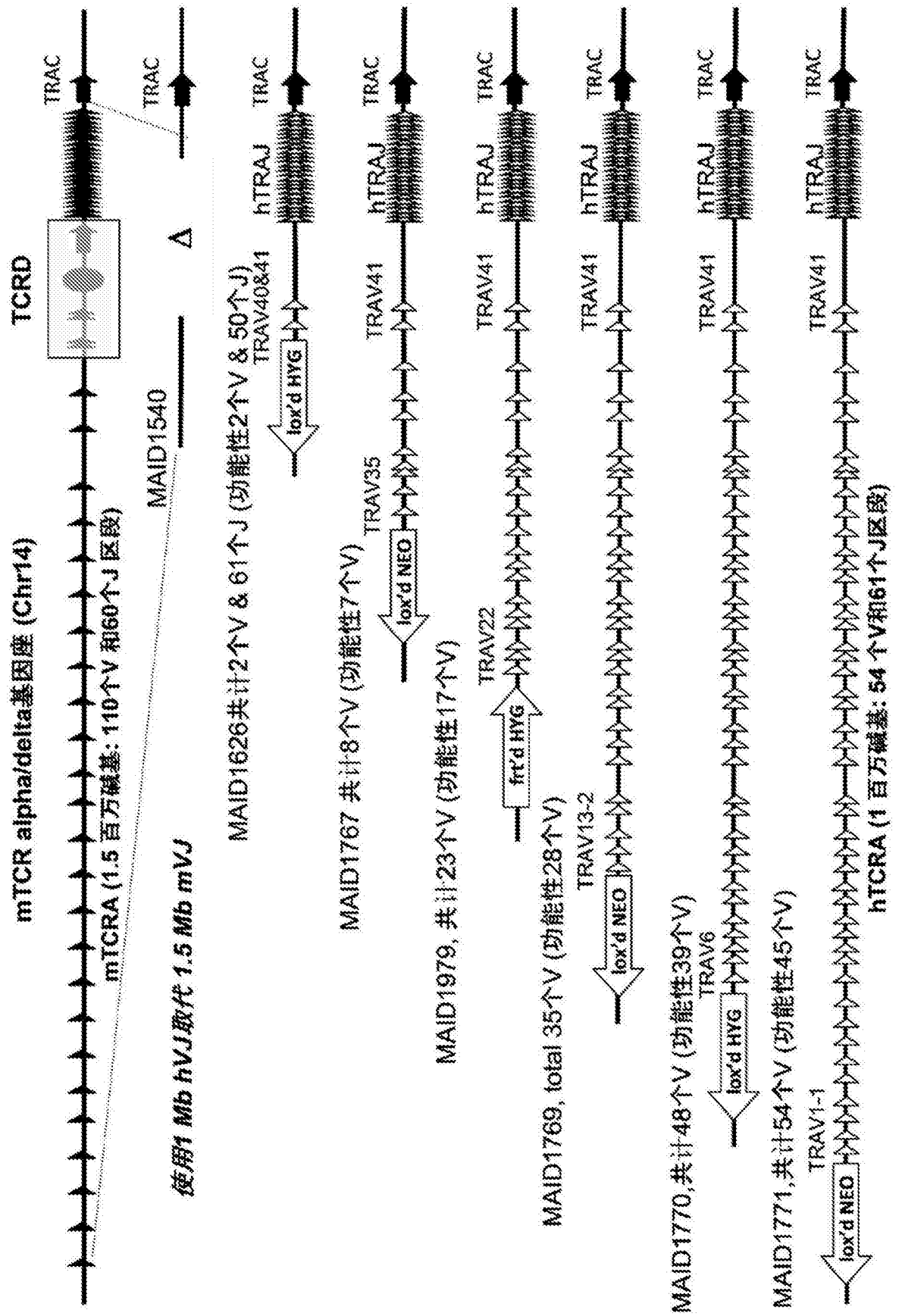

mTCR alpha/delta基因座 (Chr14)
TCRD
TRAC
mTCRA (1.5 百万碱基: 110个V 和60个J 区段)
使用1 Mb hVJ取代 1.5 Mb mVJ
MAID1540
Δ
TRAC
MAID1626共计2个V & 61个J (功能性2个V & 50个J)
hTRAJ
TRAV40&41
lox'd HYG
MAID1767 共计8个V (功能性7个V)
TRAV35
lox'd NEO
MAID1979, 共计23个V (功能性17个V)
TRAV41
TRAV22
frt'd HYG
MAID1769, total 35个V (功能性28个V)
TRAV13-2
MAID1770,共计48个V (功能性39个V)
TRAV6
MAID1771,共计54个V (功能性45个V)
TRAV1-1
hTCRA (1 百万碱基: 54 个V和61个J区段)

图3

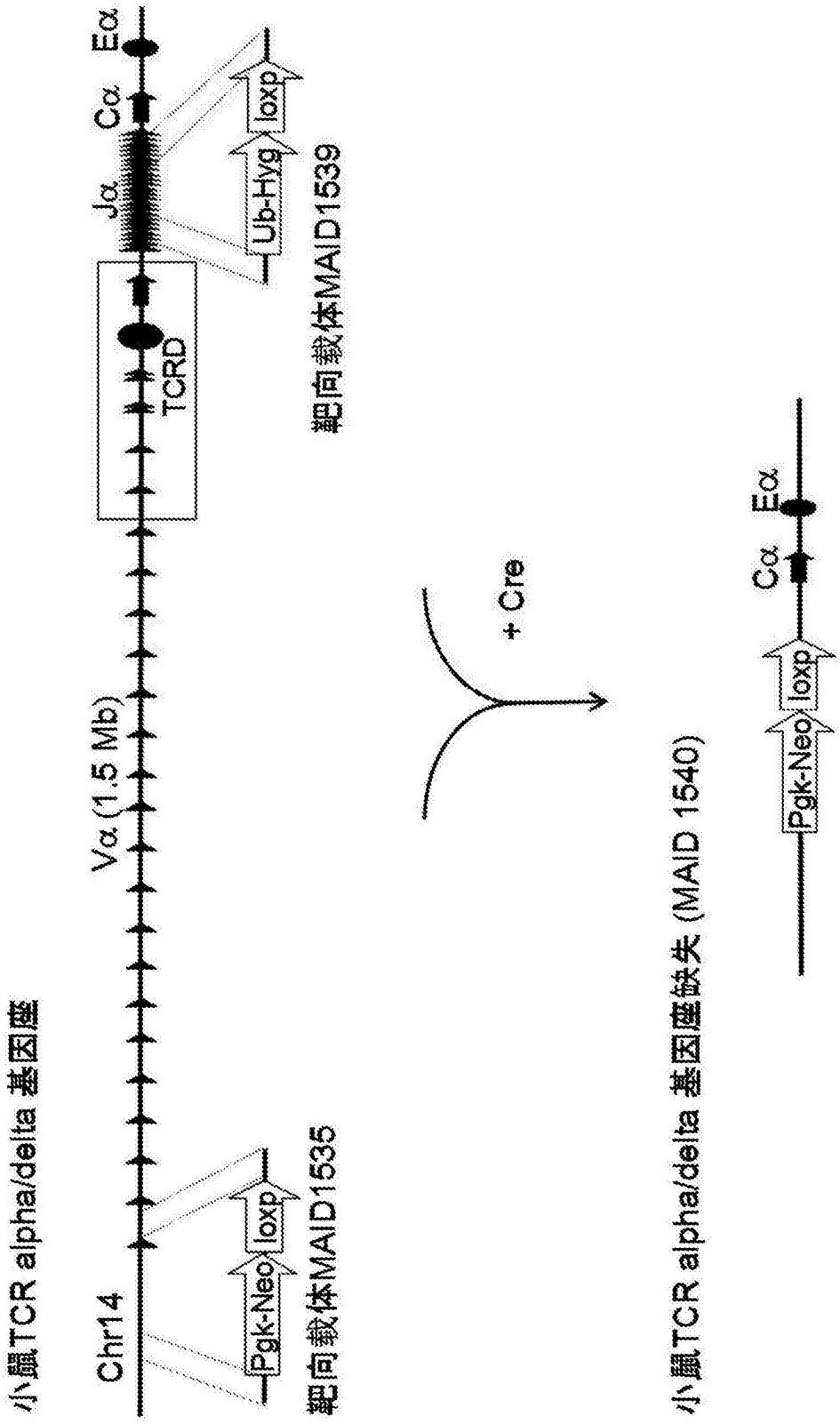

小鼠TCR alpha/delta 基因座
Chr14
Vα (1.5 Mb)
Jα
Cα
Eα
TCRD
Pgk-Neo
loxp
Ub-Hyg
loxp
靶向载体MAID1535
靶向载体MAID1539
+ Cre
小鼠TCR alpha/delta 基因座缺失 (MAID 1540)
Cα
Eα
Pgk-Neo
loxp

图4A

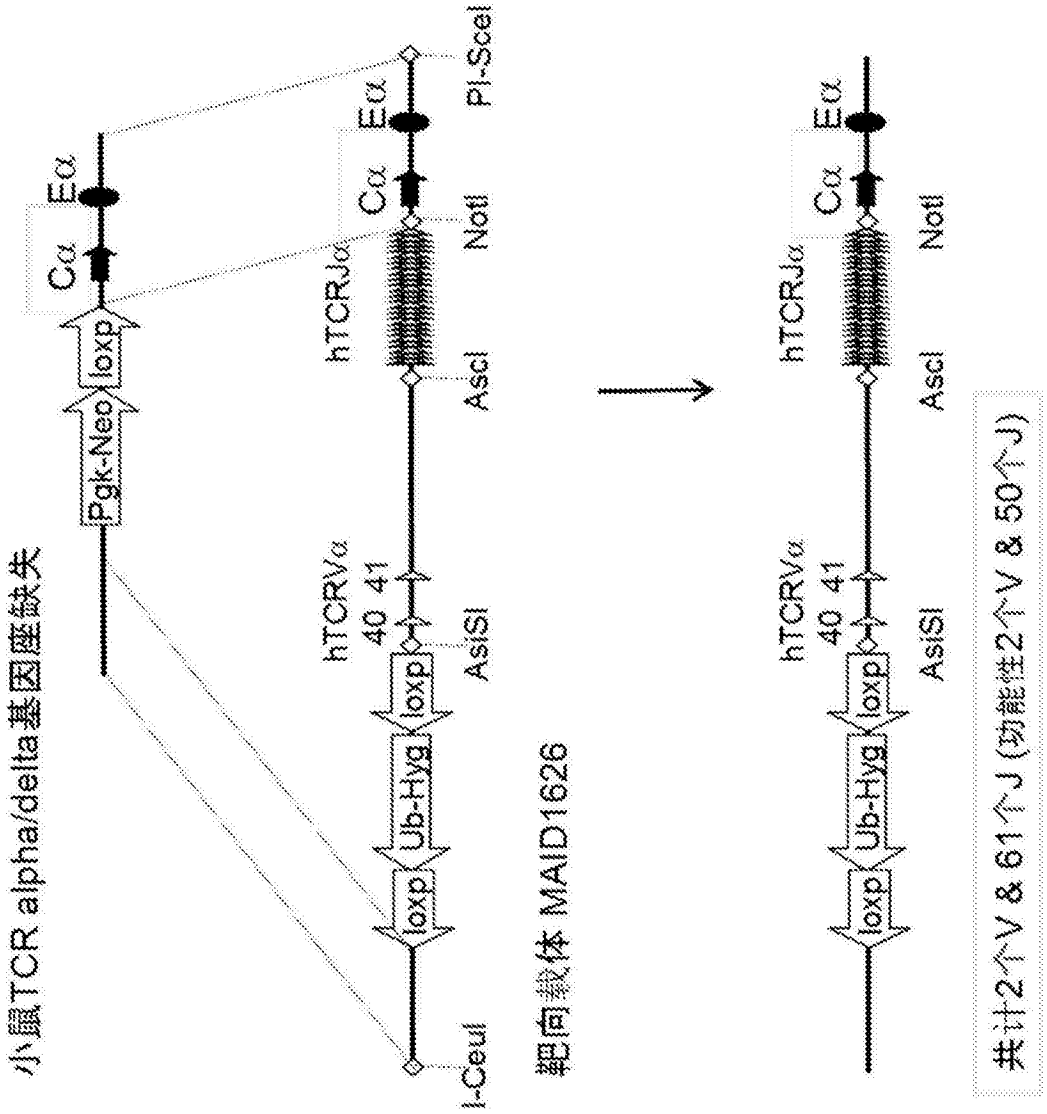

小鼠TCR alpha/delta基因座缺失
Eα
Cα
loxp
Pgk-Neo
loxp
Ub-Hyg
loxp
I-CeuI
hTCRVα
40 41
AsiSI
hTCRJα
AscI
NotI
Cα
Eα
PI-SceI
靶向载体 MAID1626
Eα
Cα
NotI
hTCRJα
AscI
hTCRVα
40 41
AsiSI
loxp
Ub-Hyg
loxp
共计2个V & 61个J (功能性2个V & 50个J)

图4B

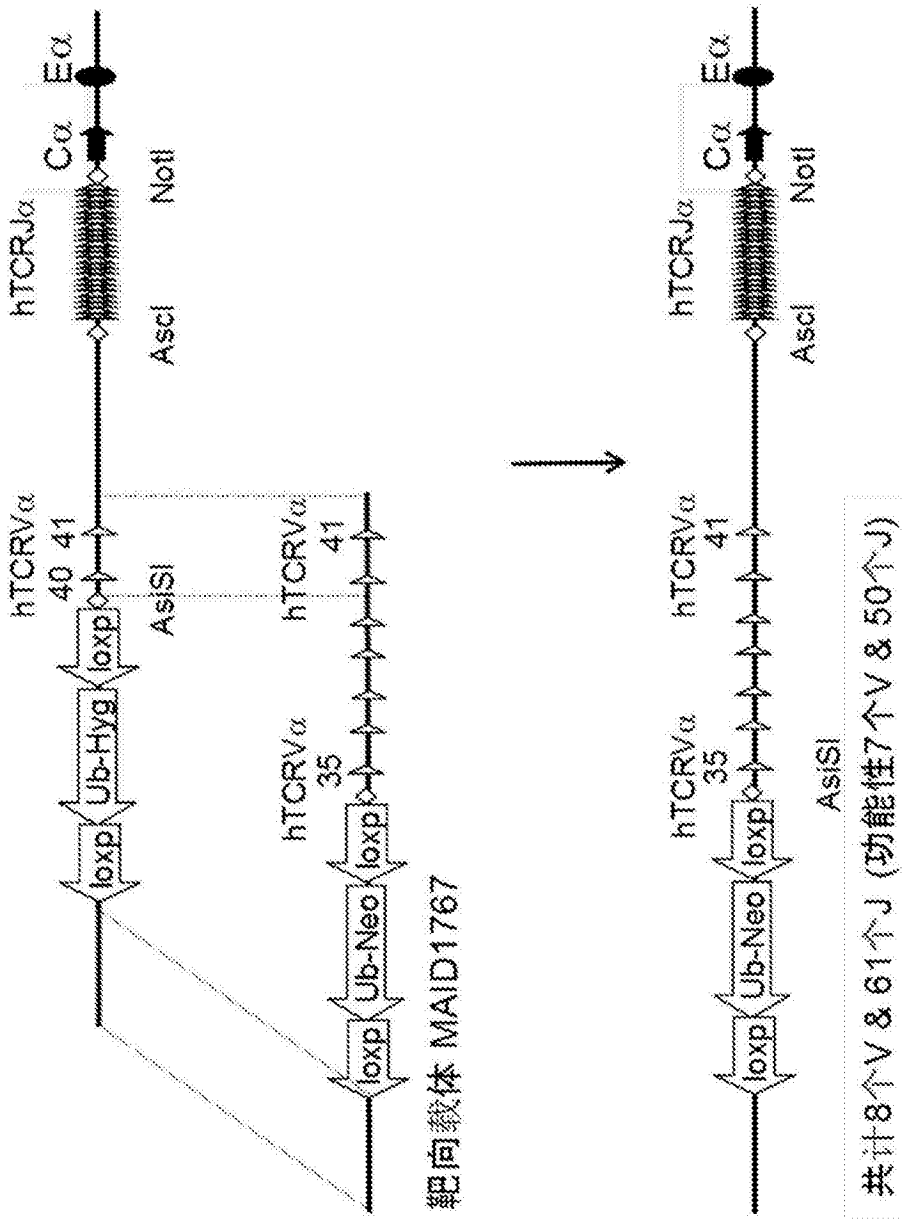

Eα
Cα
NotI
hTCRJα
AscI
hTCRVα
40 41
AsiSI
loxp
Ub-Hyg
loxp
hTCRVα
41
hTCRVα
35
loxp
Ub-Neo
loxp
靶向载体 MAID1767
共计8个V & 61个J (功能性7个V & 50个J)

图4C

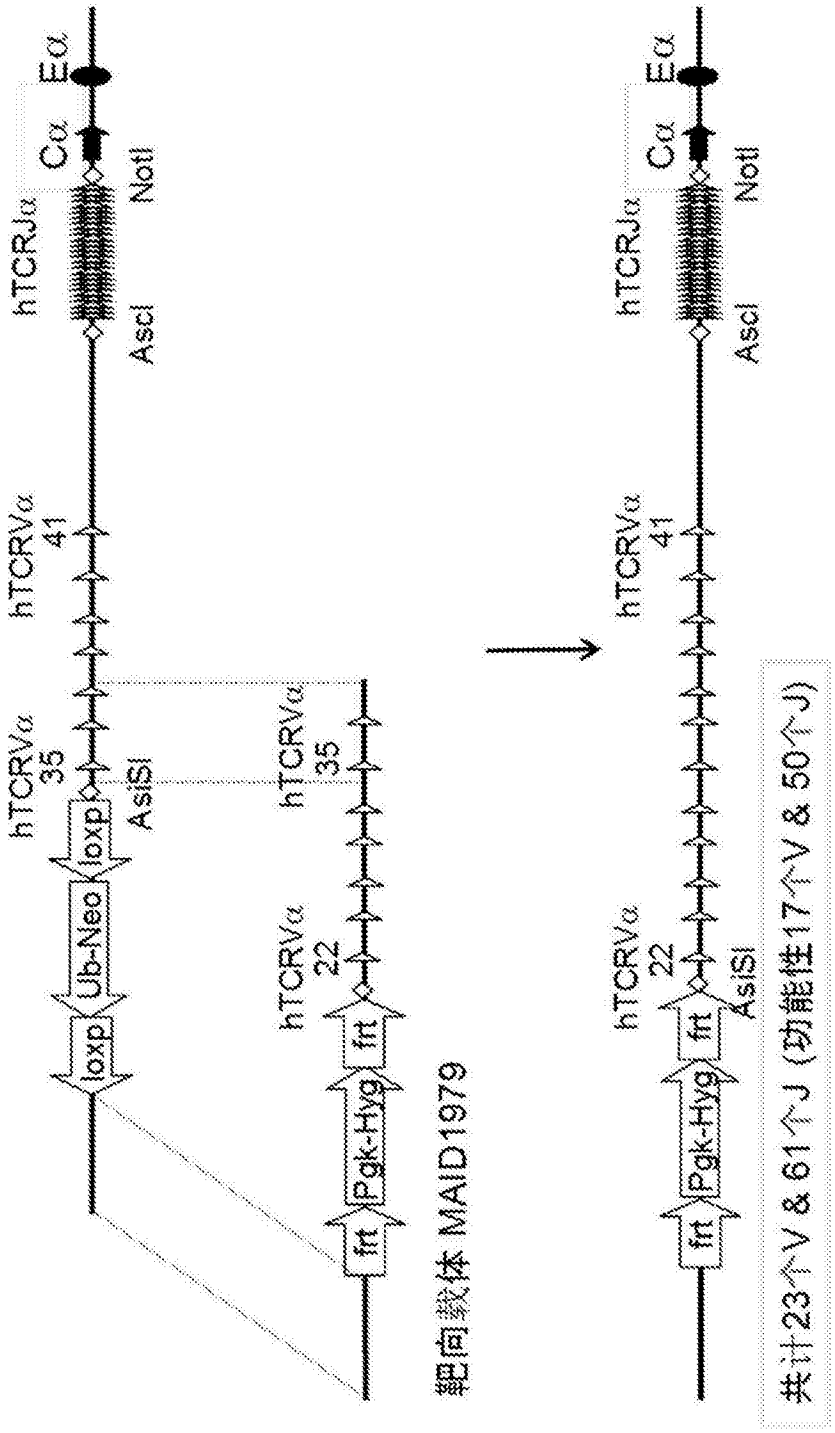

Eα
Cα
NotI
hTCRJα
AscI
hTCRVα
41
hTCRVα
35
AsiSI
loxp
Ub-Neo
loxp
hTCRVα
35
hTCRVα
22
frt
Pgk-Hyg
frt
靶向载体 MAID1979
Eα
Cα
NotI
hTCRJα
AscI
hTCRVα
41
hTCRVα
22
AsiSI
frt
Pgk-Hyg
frt
共计23个V & 61个J (功能性17个V & 50个J)

图4D

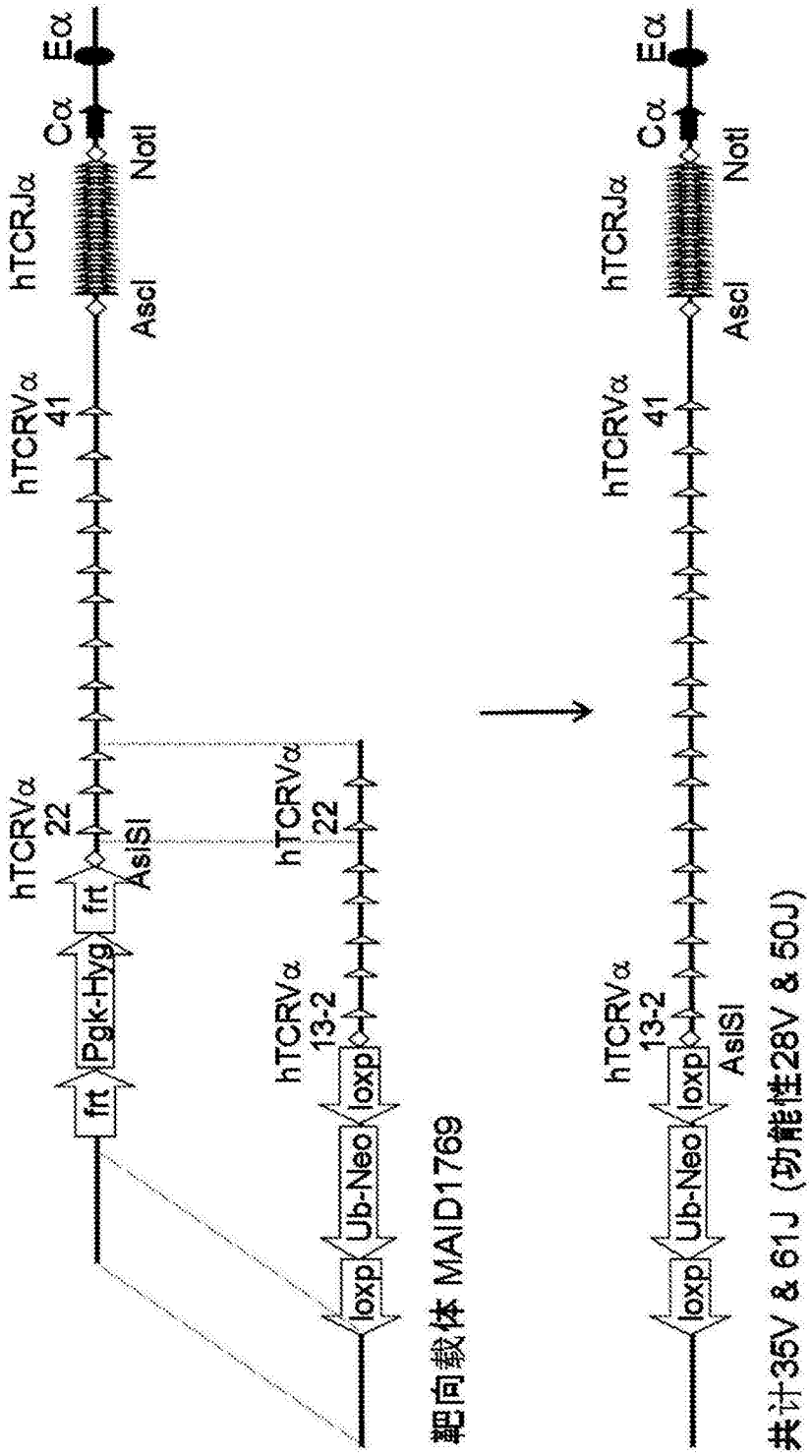

Eα
Cα
NotI
hTCRJα
AscI
hTCRVα
41
hTCRVα
22
AsiSI
frt
Pgk-Hyg
frt
hTCRVα
13-2
loxp
Ub-Neo
loxp
hTCRVα
22
靶向载体 MAID1769
Eα
Cα
NotI
hTCRJα
AscI
hTCRVα
41
hTCRVα
13-2
loxp
Ub-Neo
loxp
AsiSI
共计35V & 61J (功能性28V & 50J)

图4E

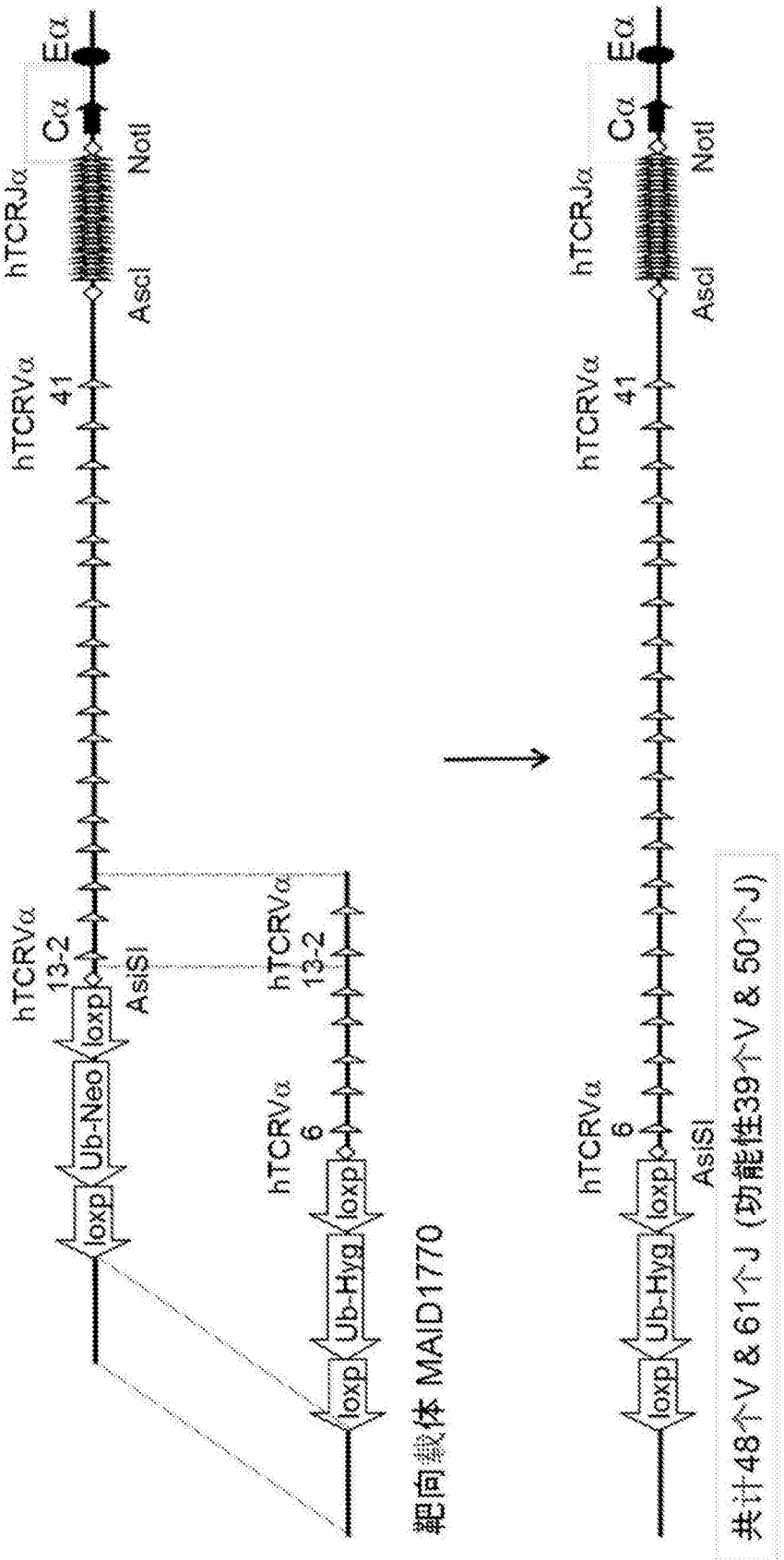

hTCRVα
41
hTCRJα
Cα
Eα
AscI
NotI
hTCRVα
13-2
loxp
Ub-Neo
loxp
AsiSI
hTCRVα
6
loxp
Ub-Hyg
loxp
靶向载体 MAID1770
共计48个V & 61个J (功能性39个V & 50个J)

图4F

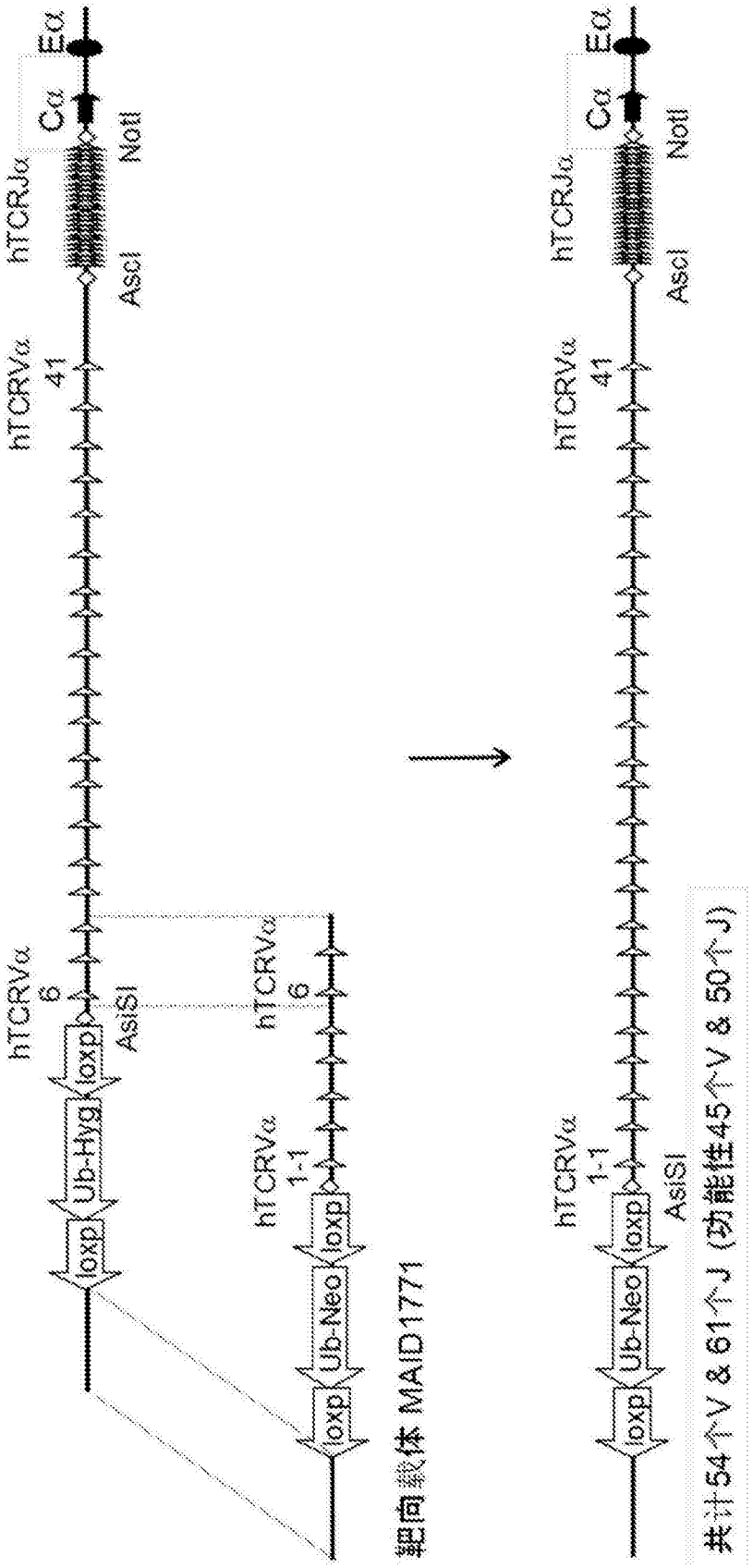

Eα
Cα
NotI
hTCRJα
AscI
hTCRVα
41
hTCRVα
6
AsiSI
loxp
Ub-Hyg
loxp
hTCRVα
6
hTCRVα
1-1
loxp
Ub-Neo
loxp
靶向载体 MAID1771
Eα
Cα
NotI
hTCRJα
AscI
hTCRVα
41
hTCRVα
1-1
AsiSI
loxp
Ub-Neo
loxp
共计54个V & 61个J (功能性45个V & 50个J)

图4G

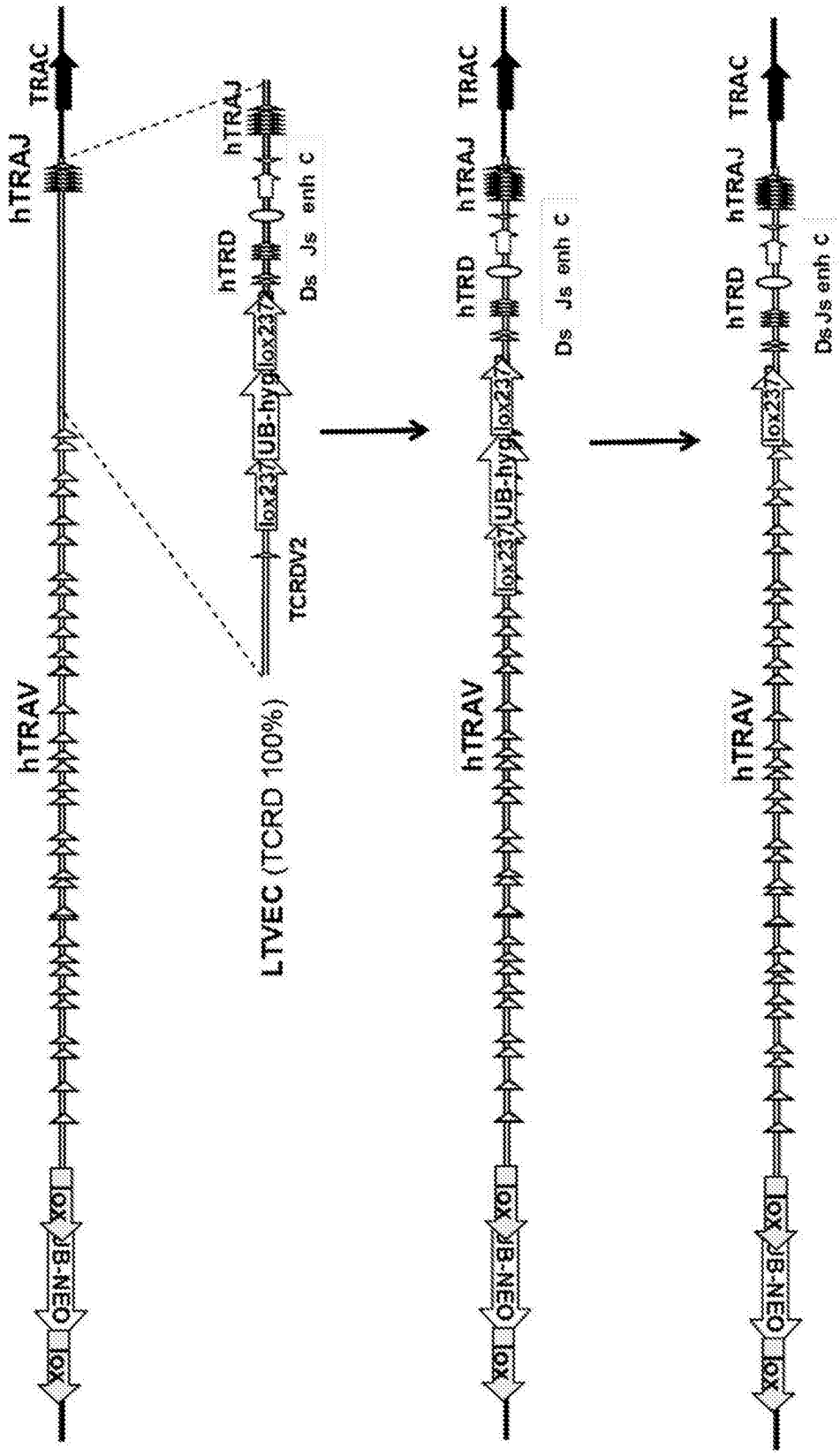

hTRAJ
TRAC
hTRAV
lox
2A-NEO
lox
hTRAJ
hTRD
Ds Js enh c
lox2372
UB-hygl
lox2372
TCRDV2
LTVEC (TCRD 100%)
hTRAJ
TRAC
hTRD
Ds Js enh c
lox2372
UB-hygl
lox2372
hTRAV
lox
2A-NEO
lox
hTRAJ
TRAC
hTRD
Ds Js enh c
lox2372
lox
2A-NEO
lox
hTRAV

图5

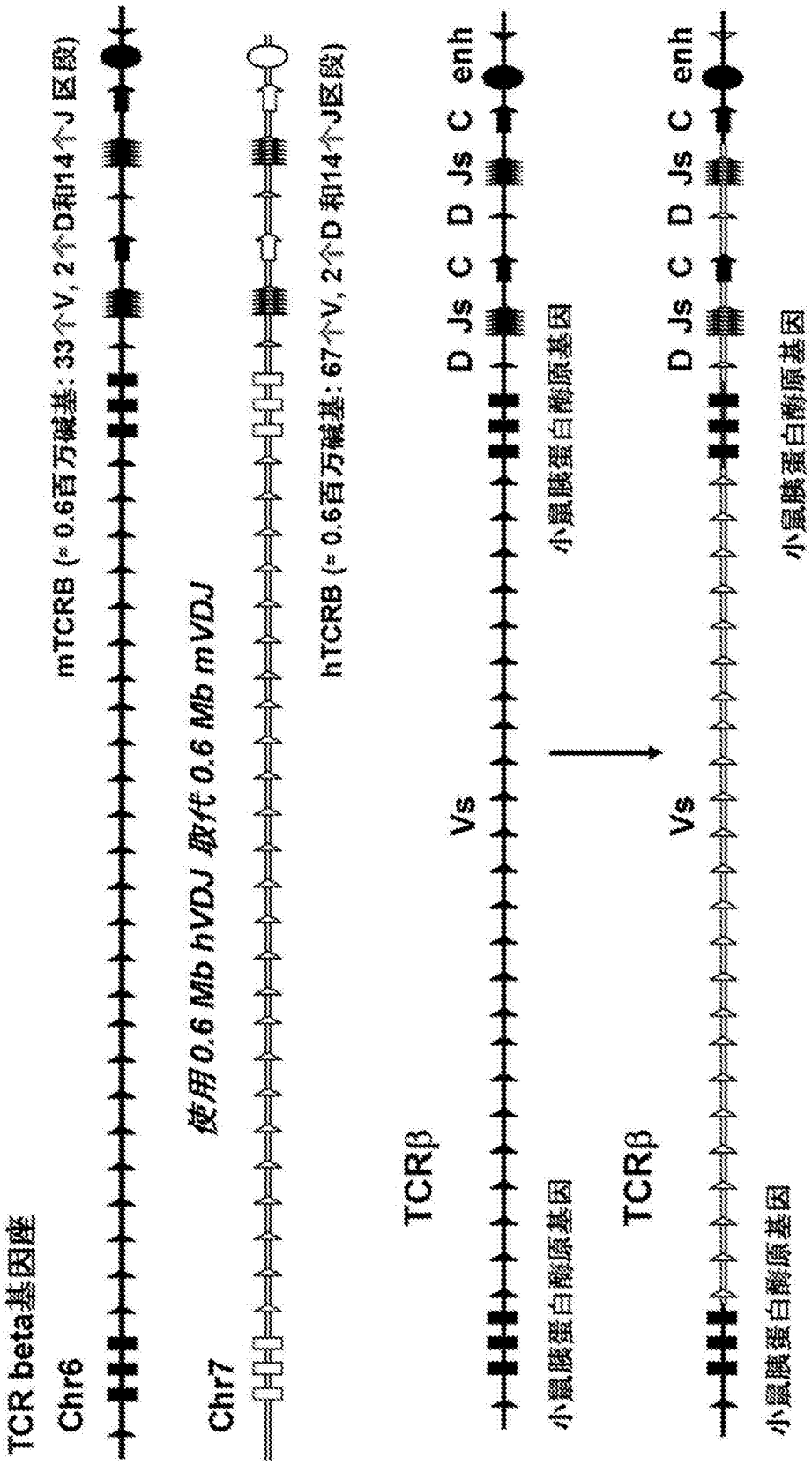

TCR beta基因座
Chr6
mTCRB (≈ 0.6百万碱基: 33个V, 2个D和14个J 区段)
使用 0.6 Mb hVDJ 取代 0.6 Mb mVDJ
Chr7
hTCRB (≈ 0.6百万碱基: 67个V, 2个D 和14个J区段)
TCRβ
Vs
D Js C D Js C enh
小鼠胰蛋白酶原基因
TCRβ
Vs
D Js C D Js C enh
小鼠胰蛋白酶原基因

图6

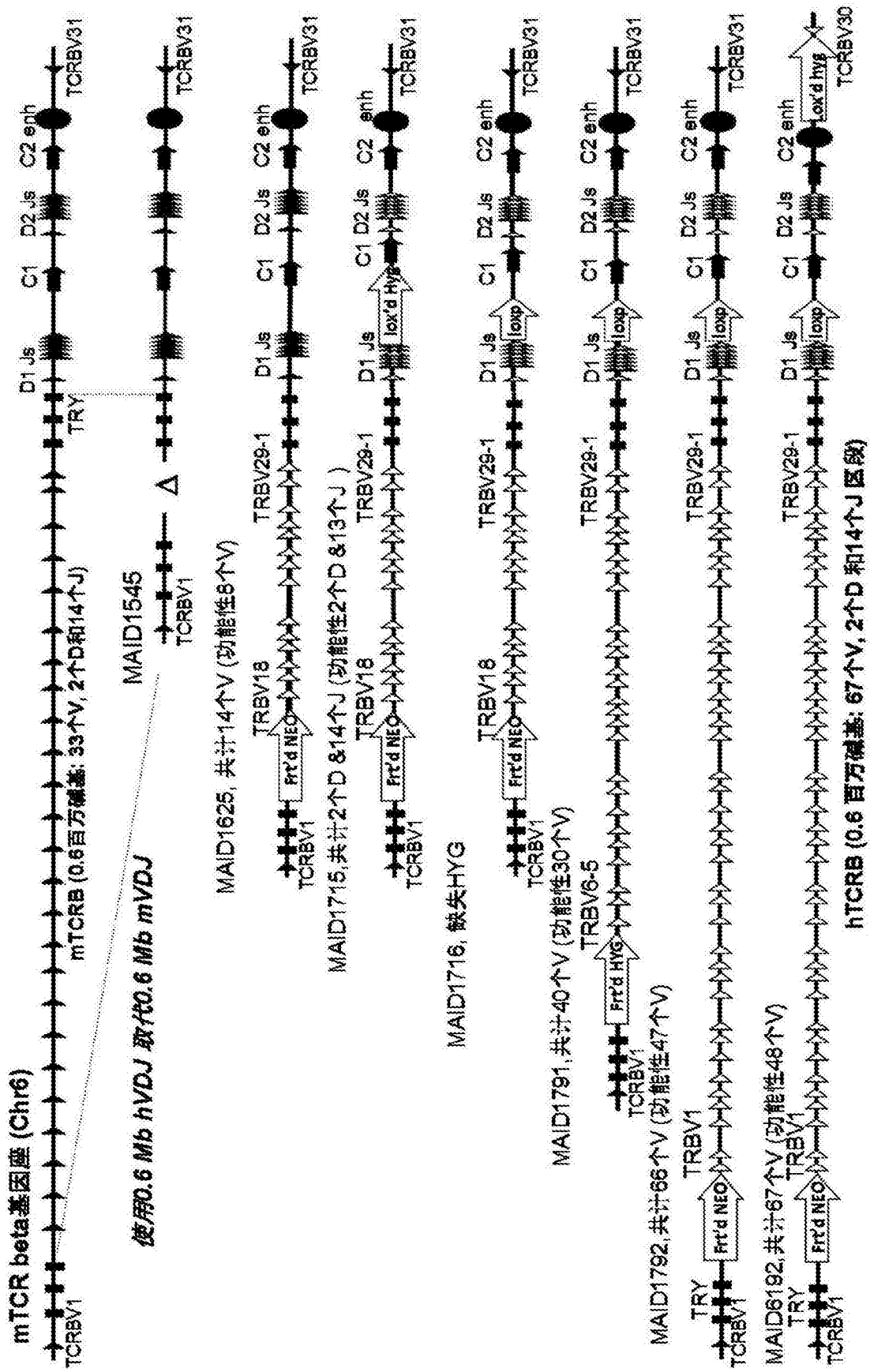

mTCR beta基因座 (Chr6)
TCRBV1
TRY
D1 Js
C1
D2 Js
C2 enh
TCRBV31
mTCRB (0.6百万碱基: 33个V, 2个D和14个J)
使用0.6 Mb hVDJ 取代0.6 Mb mVDJ
MAID1545
Δ
MAID1625, 共计14个V (功能性8个V)
TRBV18
TRBV29-1
Frt'd NEO
MAID1715,共计2个D &14个J (功能性2个D &13个J)
MAID1716, 缺失HYG
loxP
MAID1791,共计40个V (功能性30个V)
TRBV6-5
Frt'd HYG
MAID1792,共计66个V (功能性47个V)
TRBV1
MAID6192,共计67个V (功能性48个V)
lox'd hyg
TCRBV30
hTCRB (0.6 百万碱基: 67个V, 2个D 和14个J 区段)

图7

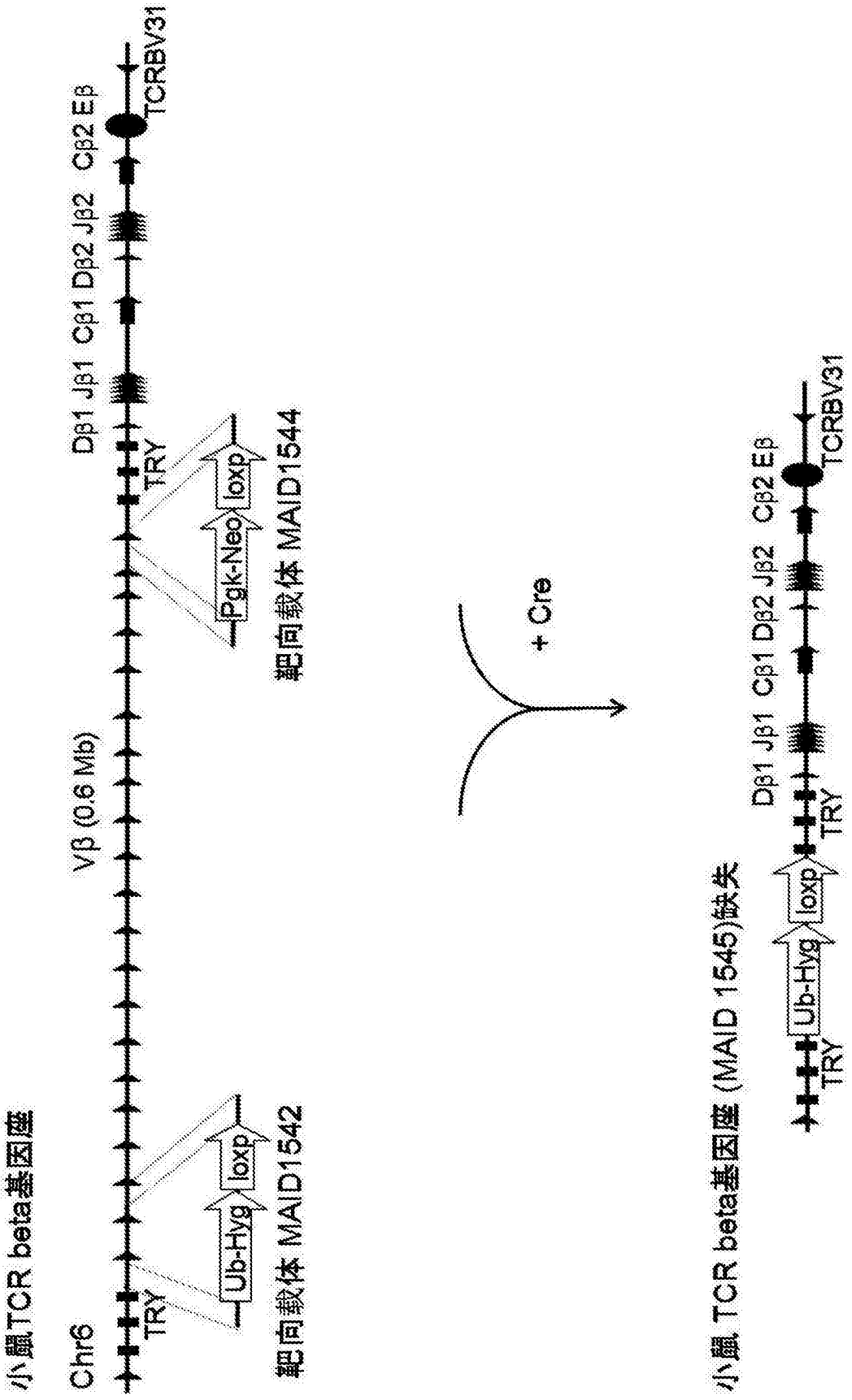

小鼠TCR beta基因座
Chr6
Vβ (0.6 Mb)
Dβ1 Jβ1 Cβ1 Dβ2 Jβ2 Cβ2 Eβ
TCRBV31
TRY
Ub-Hyg
loxp
靶向载体 MAID1542
Pgk-Neo
loxp
靶向载体 MAID1544
+ Cre
小鼠 TCR beta基因座 (MAID 1545)缺失
Dβ1 Jβ1 Cβ1 Dβ2 Jβ2 Cβ2 Eβ
TCRBV31
TRY
Ub-Hyg
loxp
TRY

图8A

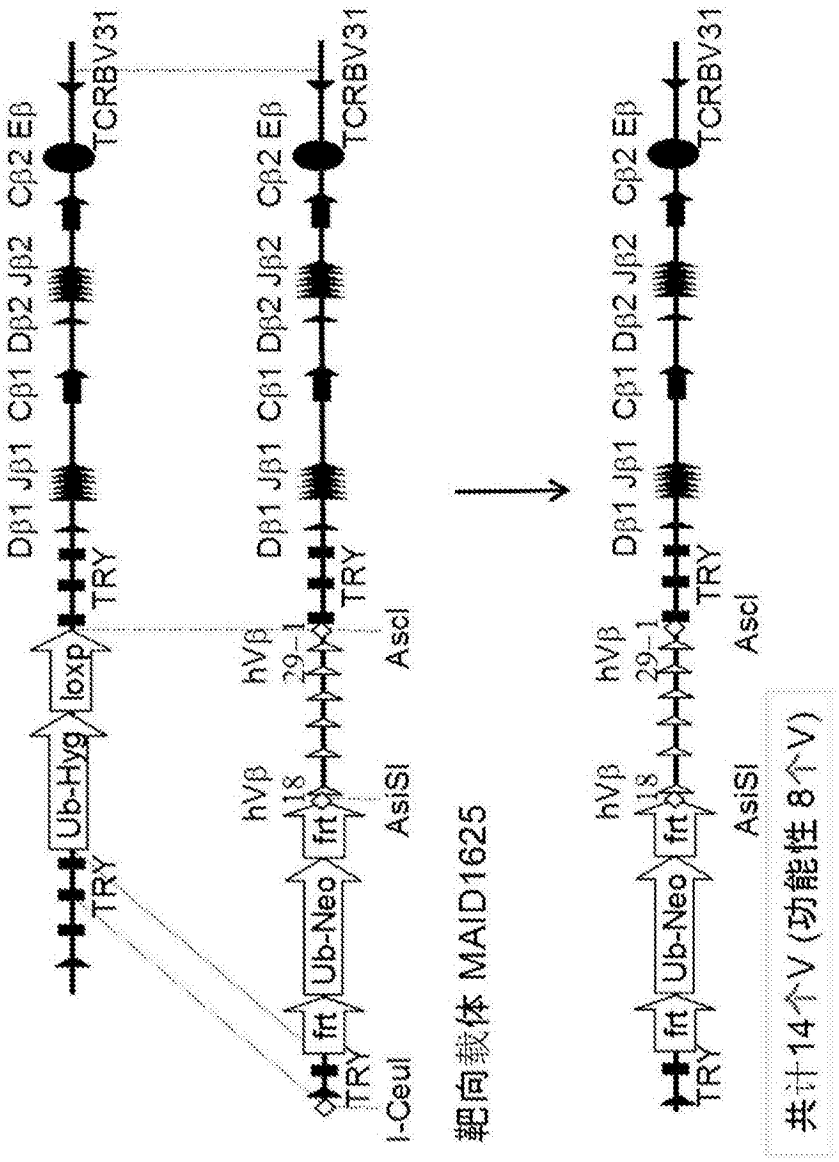

TCRBV31
Cβ2 Eβ
Dβ2 Jβ2
Cβ1
Dβ1 Jβ1
TRY
loxP
Ub-Hyg
hVβ 29-1
AscI
hVβ 18
frt
Ub-Neo
AsiSI
I-CeuI
靶向载体 MAID1625
共计14个V (功能性 8个V)

图8B

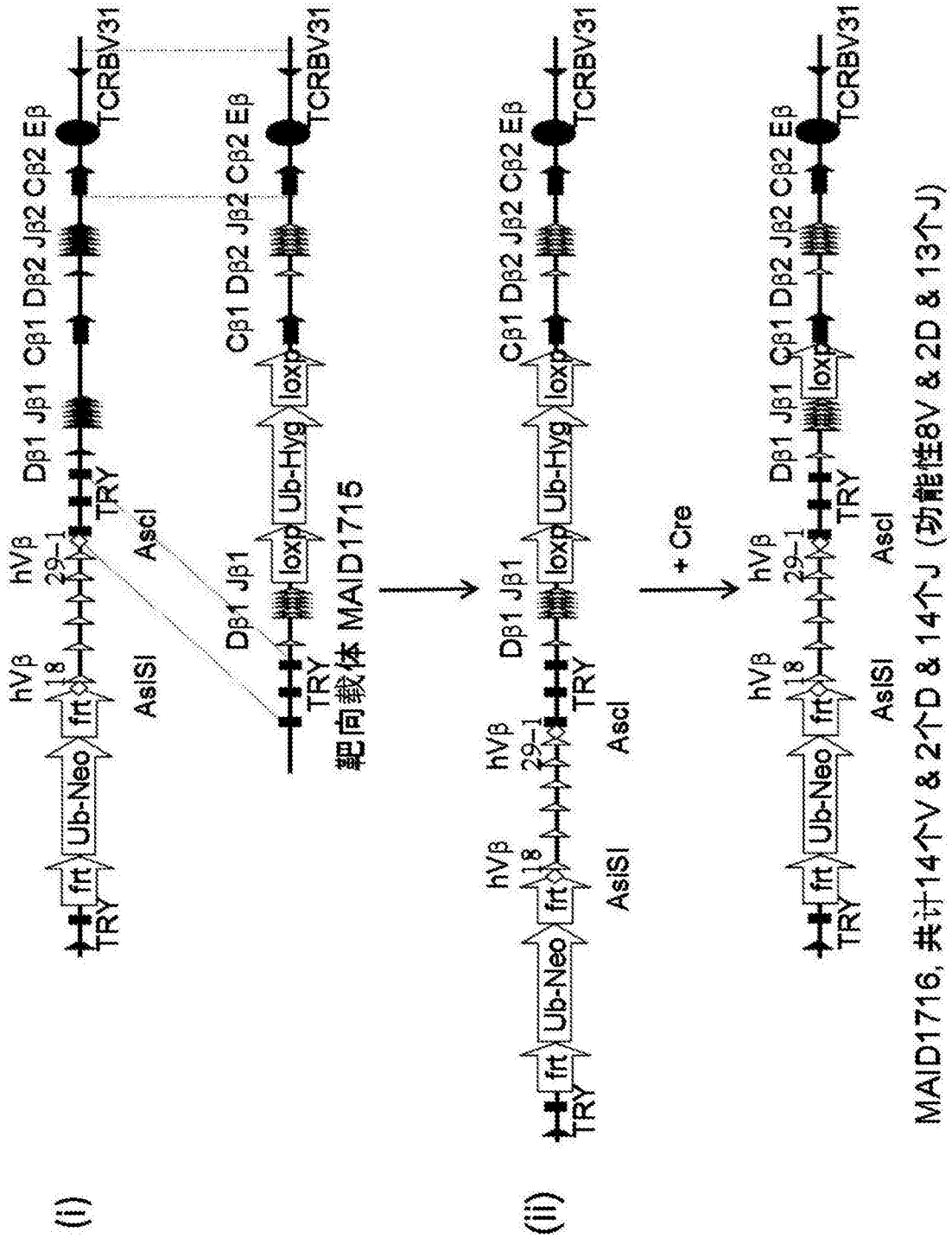

(i)
hVβ
18
frt
Ub-Neo
frt
TRY
hVβ
29–1
TRY
Dβ1 Jβ1 Cβ1 Dβ2 Jβ2 Cβ2 Eβ
TCRBV31
AscI
AsiSI
Dβ1 Jβ1
loxp
Ub-Hyg
loxp
Cβ1 Dβ2 Jβ2 Cβ2 Eβ
TCRBV31
TRY
靶向载体 MAID1715
(ii)
+ Cre
MAID1716, 共计14个V & 2个D & 14个J (功能性8V & 2D & 13个J)

图8C

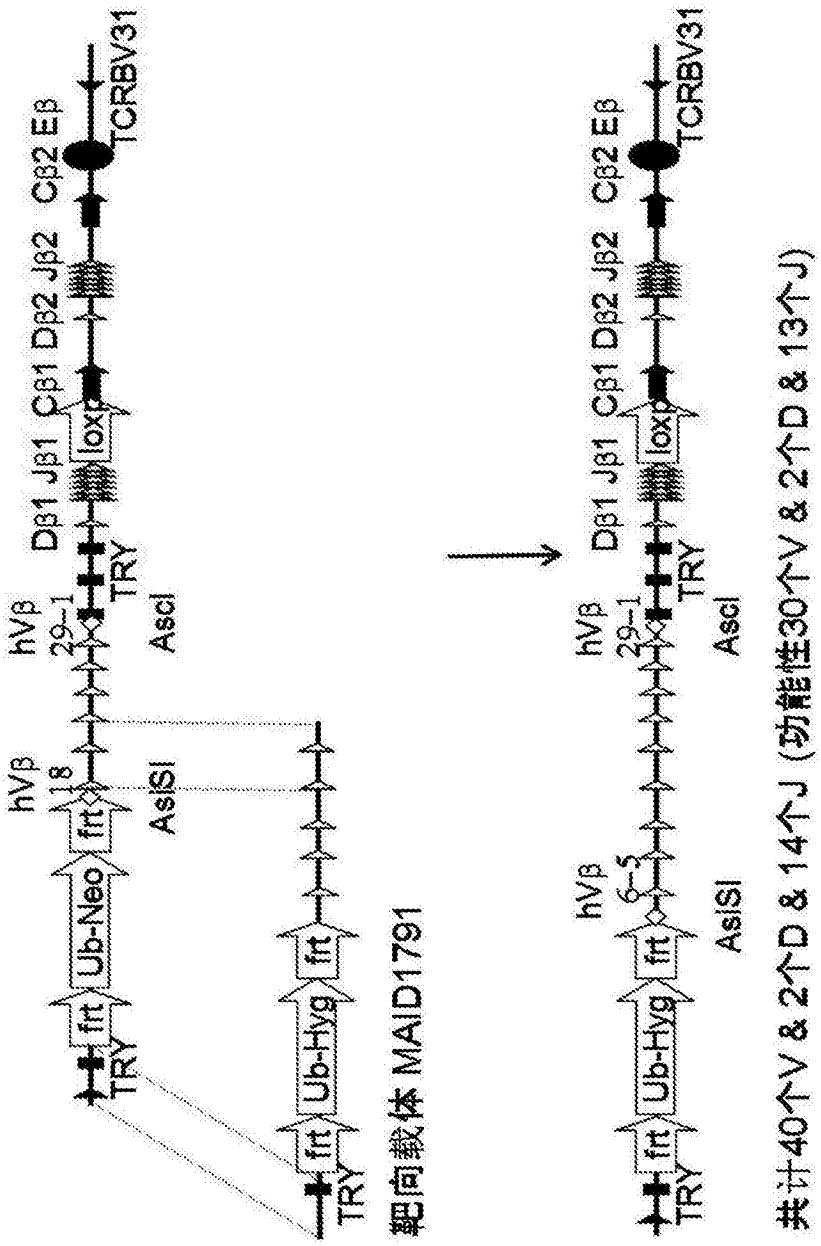

TCRBV31
Cβ2 Eβ
Jβ2
Dβ2
Cβ1
loxp
Jβ1
Dβ1
TRY
AscI
hVβ
29-1
AsiSI
hVβ
18
frt
Ub-Neo
frt
TRY
frt
Ub-Hyg
frt
TRY
靶向载体 MAID1791
TCRBV31
Cβ2 Eβ
Jβ2
Dβ2
Cβ1
loxp
Jβ1
Dβ1
TRY
AscI
hVβ
29-1
AsiSI
hVβ
6-5
frt
Ub-Hyg
frt
TRY
共计40个V & 2个D & 14个J (功能性30个V & 2个D & 13个J)

图8D

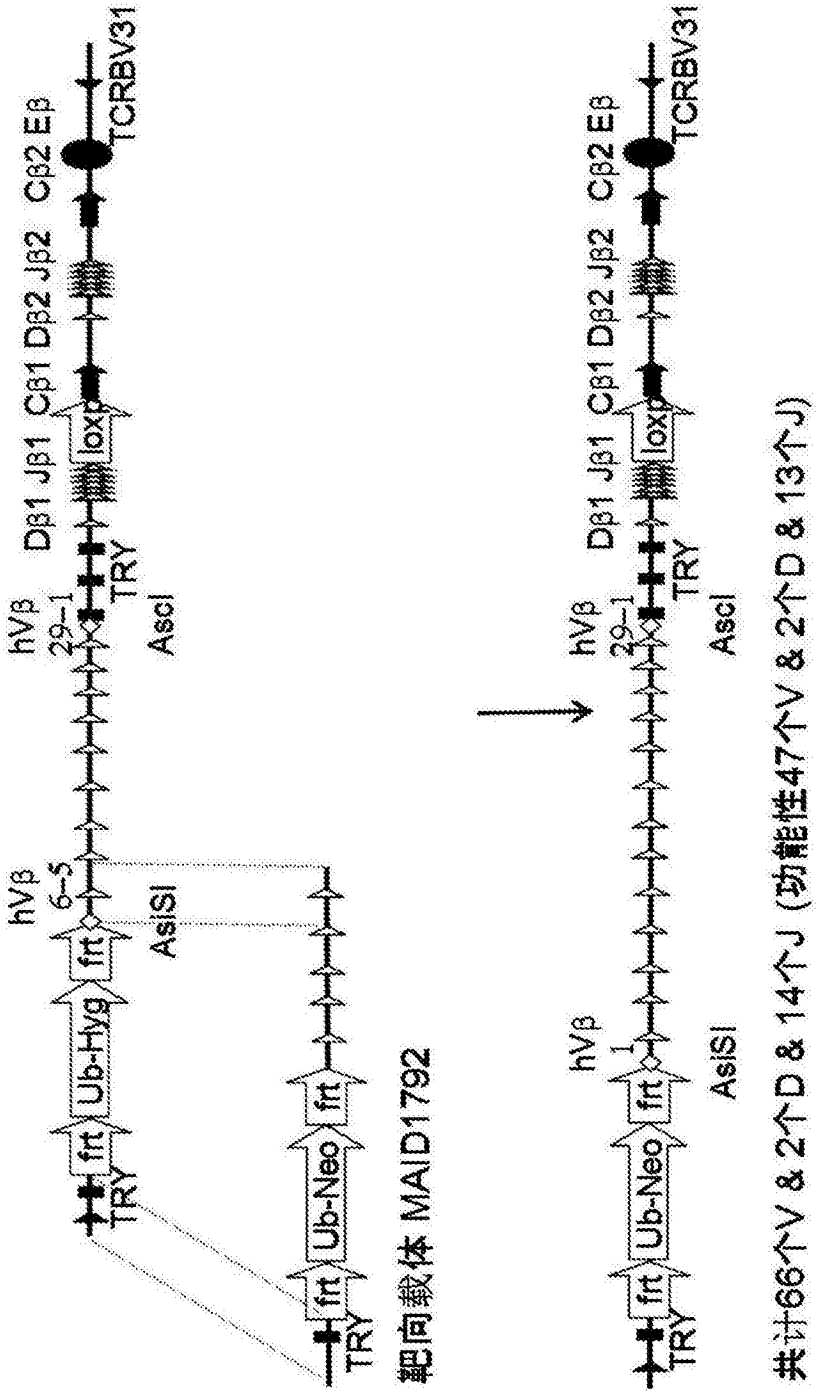

TCRBV31
Cβ2 Eβ
Jβ2
Dβ2
Cβ1
loxp
Jβ1
Dβ1
TRY
AscI
hVβ 29-1
hVβ 6-5
AsiSI
frt
Ub-Hyg
Ub-Neo
靶向载体 MAID1792
hVβ 1
共计66个V & 2个D & 14个J (功能性47个V & 2个D & 13个J)

图8E

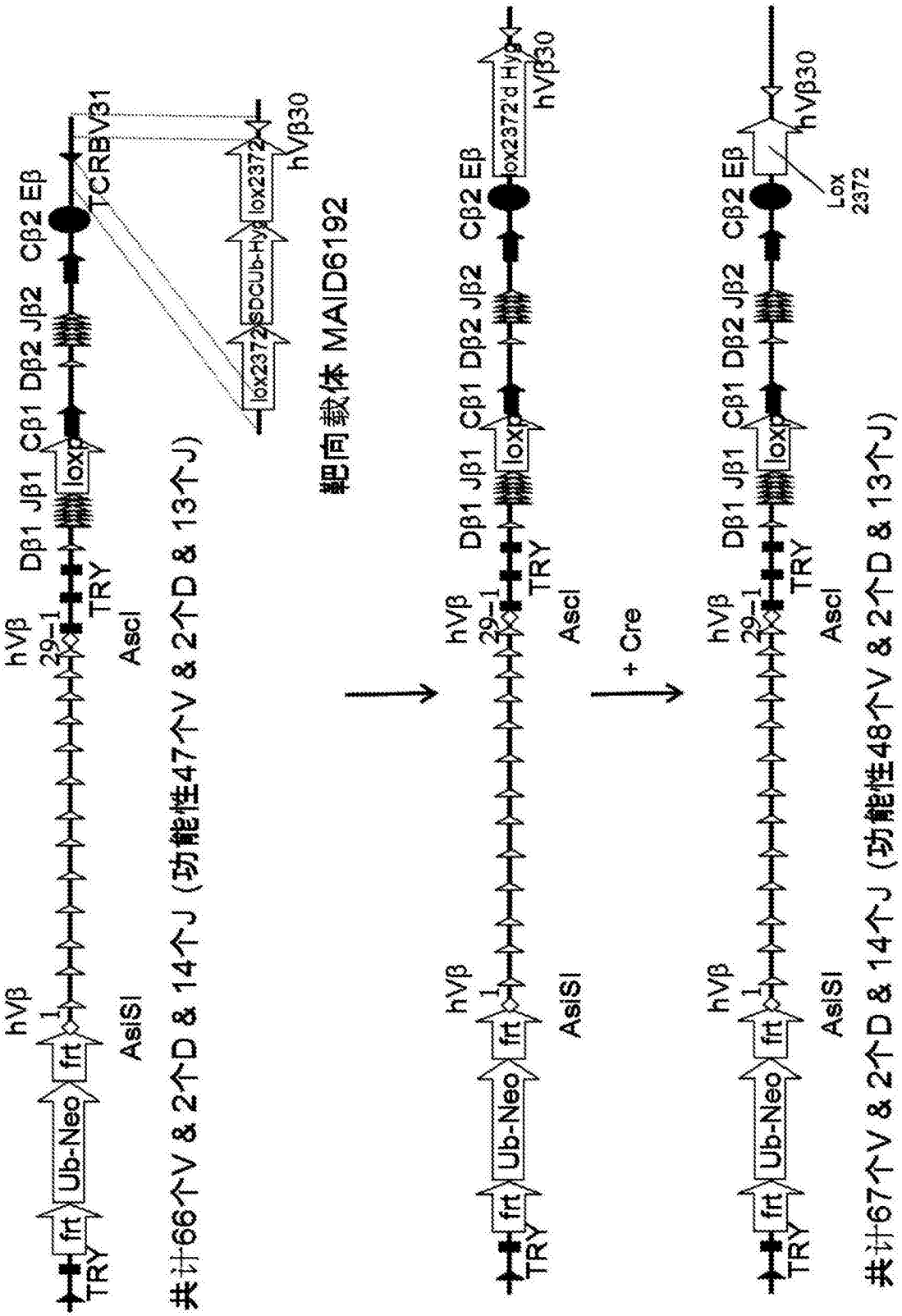

hVβ
29-1
TRY
Dβ1 Jβ1 Cβ1 Dβ2 Jβ2 Cβ2 Eβ
loxp
TCRBV31
AscI
AsiSI
frt
Ub-Neo
共计66个V & 2个D & 14个J（功能性47个V & 2个D & 13个J）
lox2372
SDCJb-Hyg
hVβ30
靶向载体 MAID6192
+ Cre
lox2372'd Hyg
Lox 2372
共计67个V & 2个D & 14个J（功能性48个V & 2个D & 13个J）

图8F

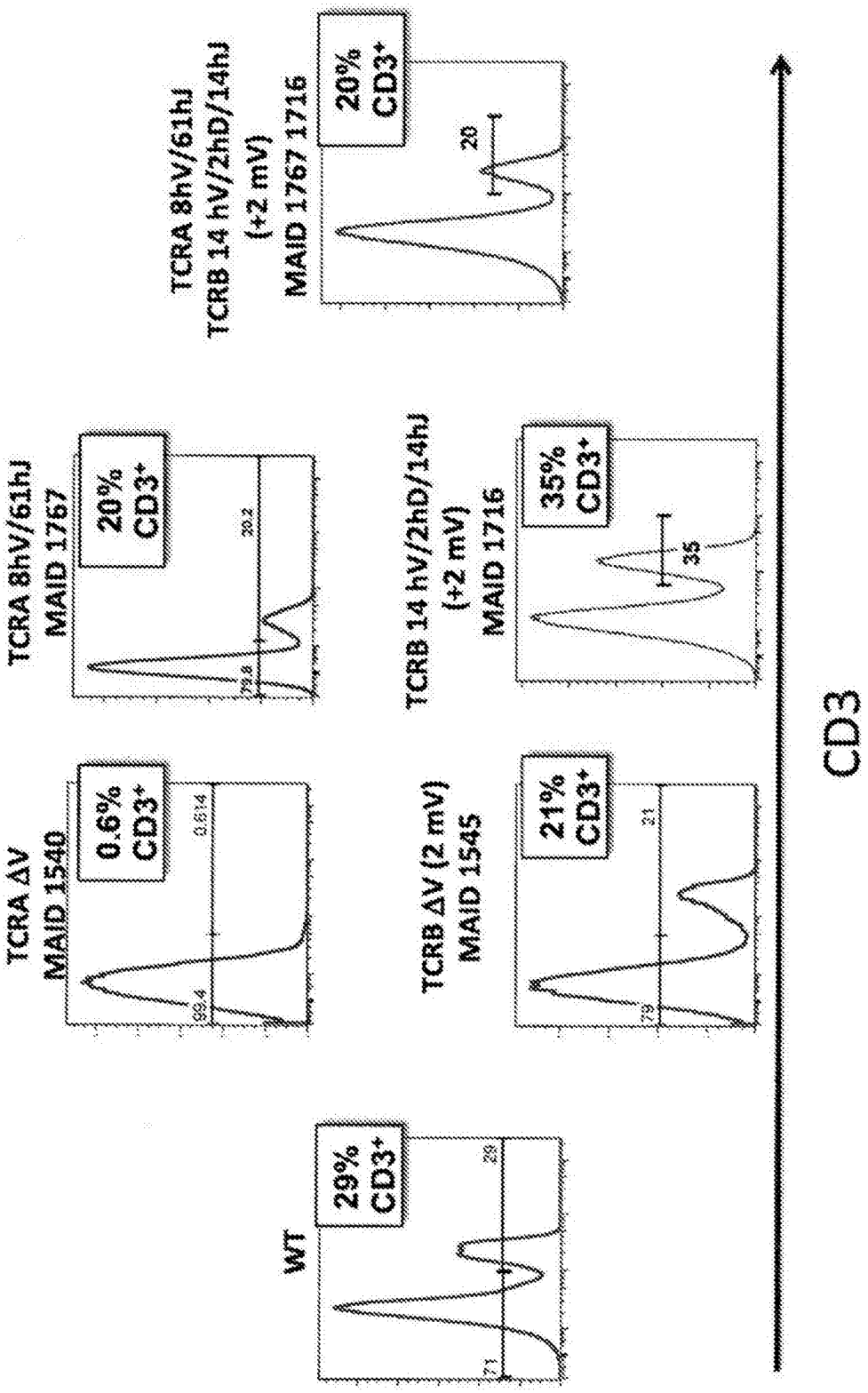

TCRA 8hV/61hJ
TCRB 14 hV/2hD/14hJ
(+2 mV)
MAID 1767 1716
20% CD3+
20
TCRA 8hV/61hJ
MAID 1767
20% CD3+
20.2
79.8
TCRB 14 hV/2hD/14hJ
(+2 mV)
MAID 1716
35% CD3+
35
TCRA ΔV
MAID 1540
0.6% CD3+
0.6714
99.4
TCRB ΔV (2 mV)
MAID 1545
21% CD3+
21
79
WT
29% CD3+
29
71
CD3

图9

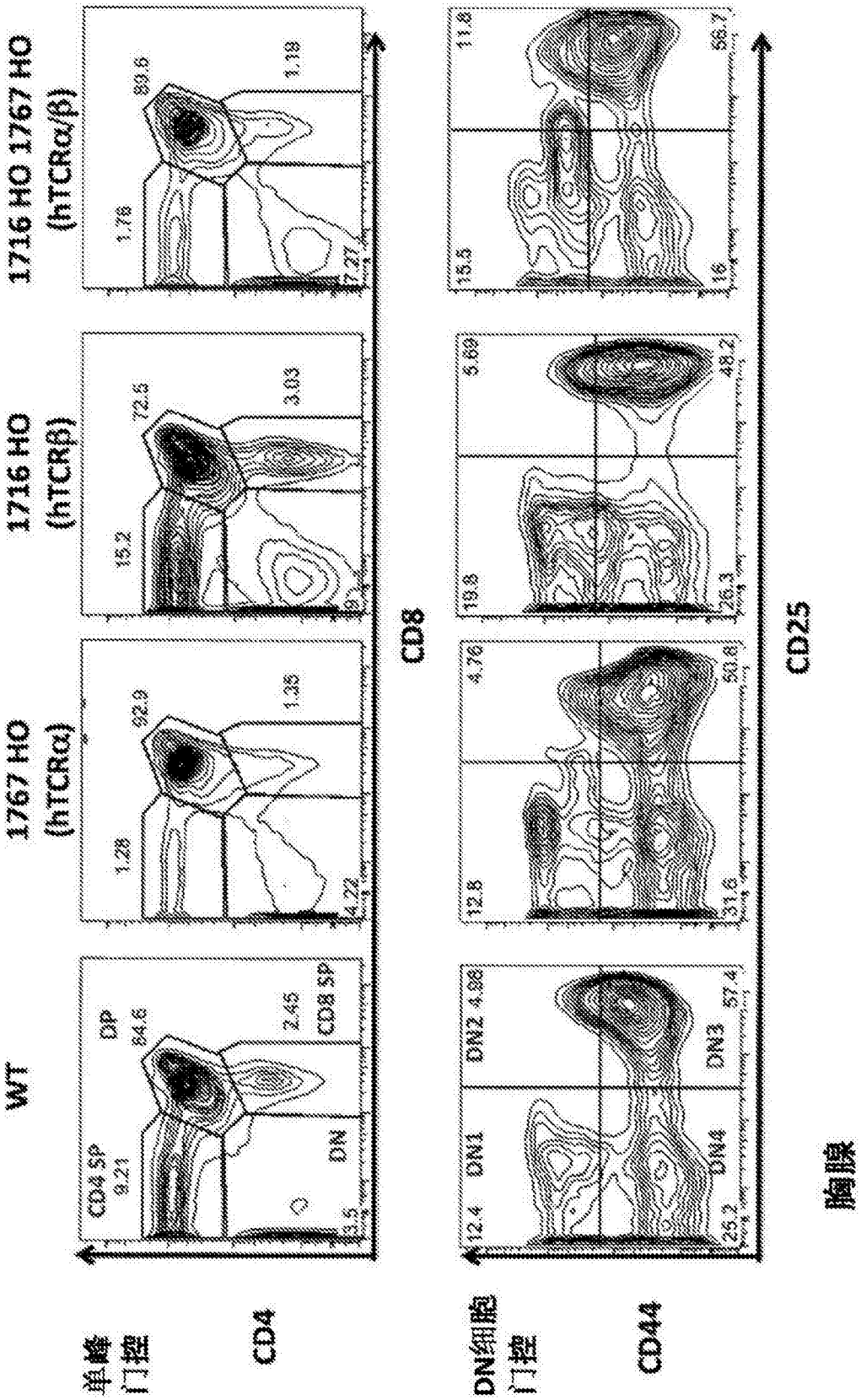

WT
1767 HO (hTCRα)
1716 HO (hTCRβ)
1716 HO 1767 HO (hTCRα/β)
单峰门控
CD4
CD8
CD4 SP 9.21
DP 84.6
CD8 SP 2.45
DN 3.5
1.28
92.9
1.35
4.22
15.2
72.5
3.03
3.4
1.78
89.6
1.18
7.27
DN细胞门控
CD44
CD25
胸腺
DN1 12.4
DN2 4.88
DN3 57.4
DN4 25.2
12.8
4.76
50.8
31.6
19.8
5.69
48.2
26.3
15.5
11.8
56.7
16

图10

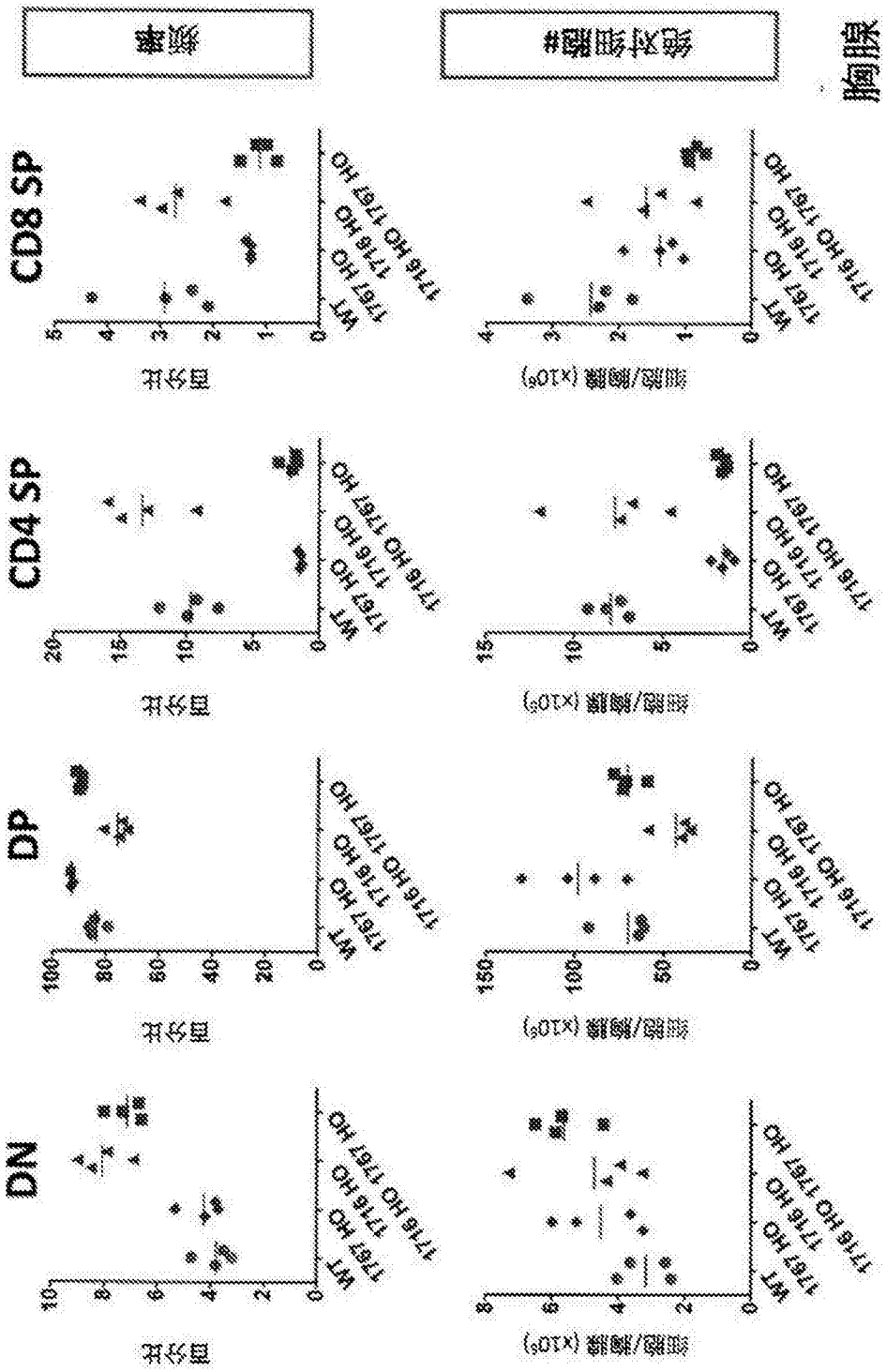

胸腺
绝对细胞#
频率
CD8 SP
CD4 SP
DP
DN
细胞/胸腺 (x10⁶)
百分比
WT
176 HO
176 HO 176 HO
176 HO 176 HO

图11

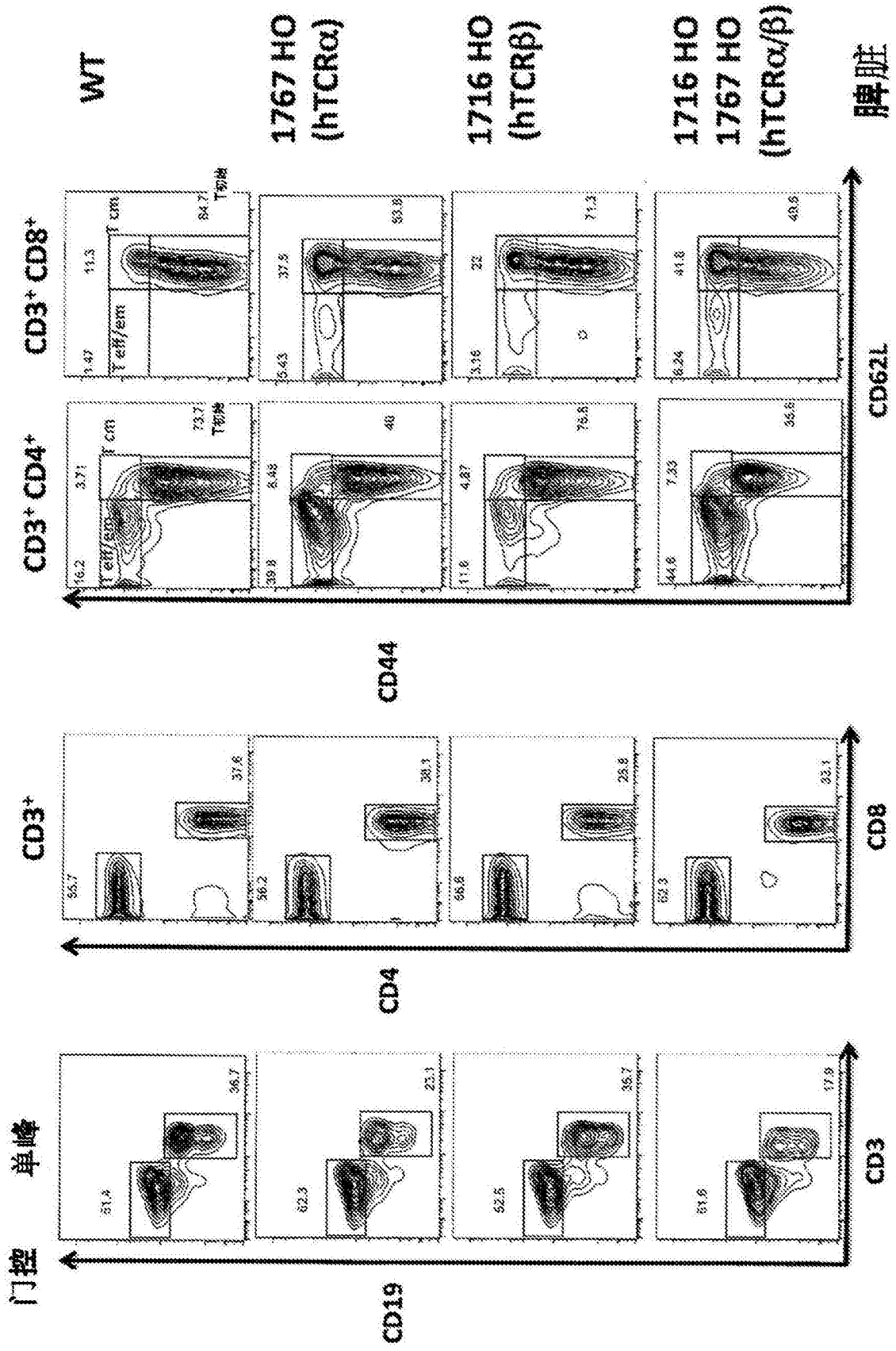

WT
1767 HO (hTCRα)
1716 HO (hTCRβ)
1716 HO 1767 HO (hTCRα/β)
脾脏
CD3+ CD8+
CD3+ CD4+
CD62L
CD44
CD3+
CD8
CD4
门控
单峰
CD19
CD3

图12

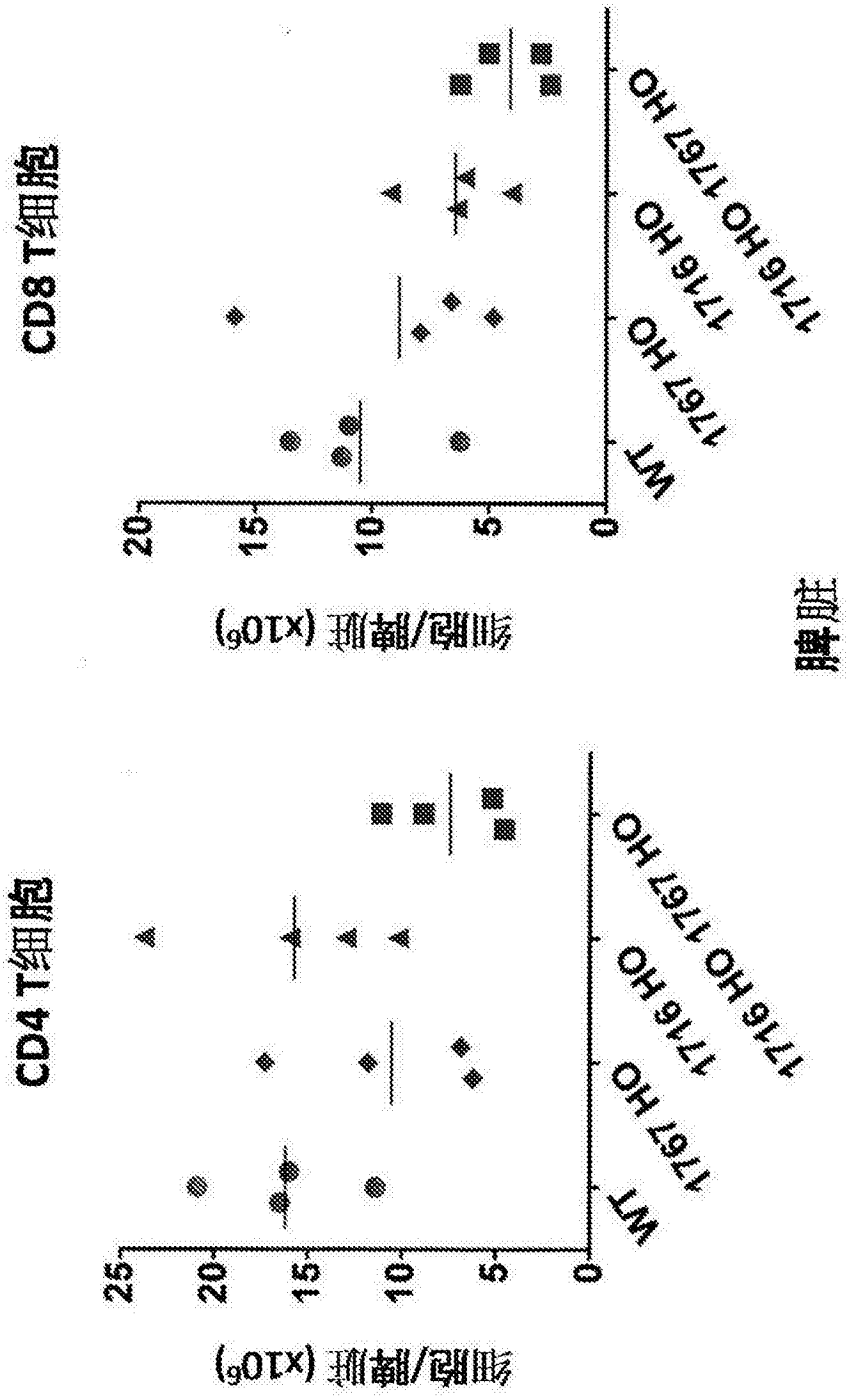

CD8 T细胞
细胞/脾脏 (x10⁶)
0
5
10
15
20
WT
176 HO
176 HO 176 HO
176 HO 176 HO
脾脏
CD4 T细胞
细胞/脾脏 (x10⁶)
0
5
10
15
20
25
WT
176 HO
176 HO 176 HO
176 HO 176 HO

图13

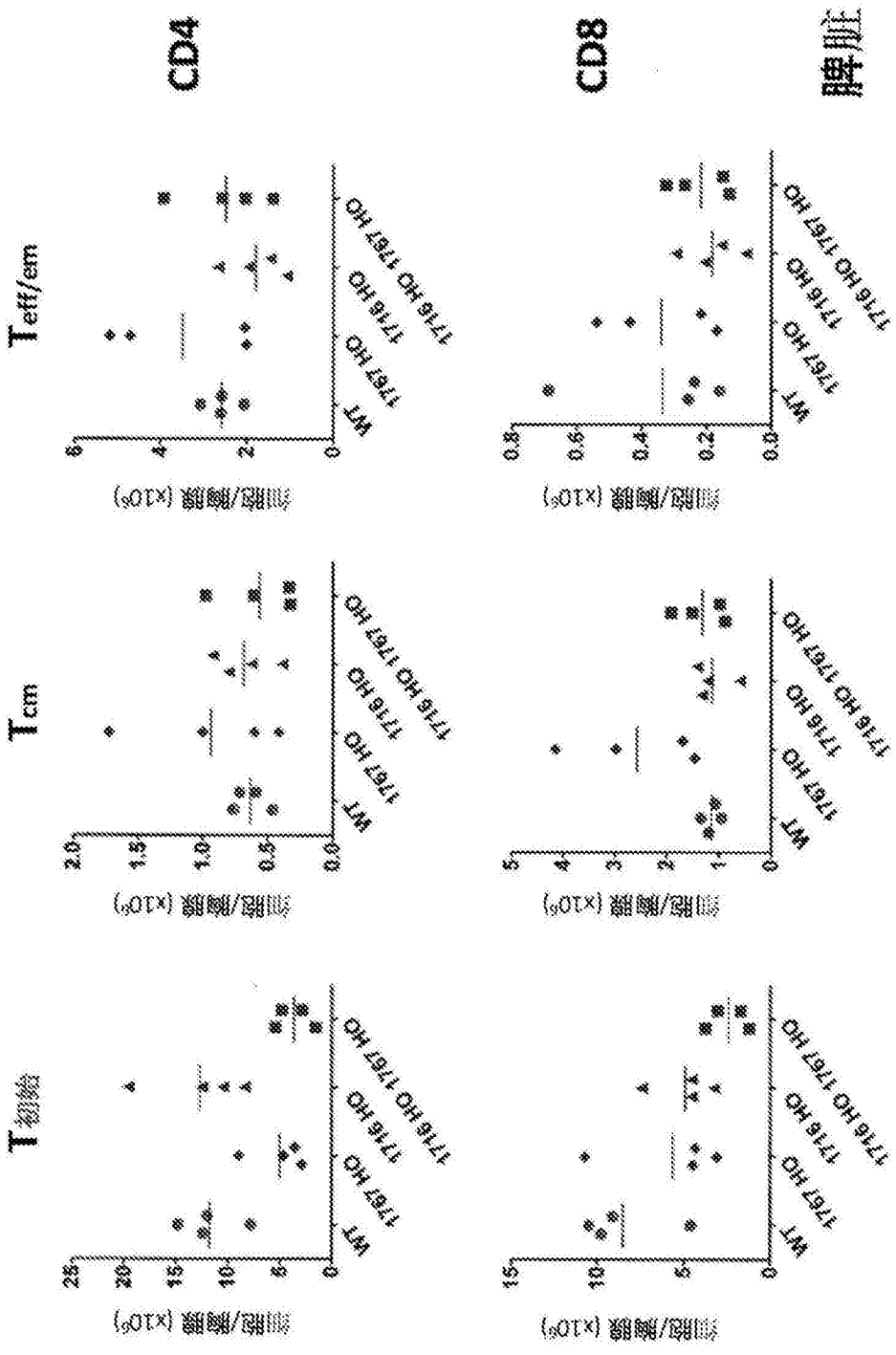

CD4
CD8
脾脏
Teff/em
Tcm
T初始
细胞/胸腺 (x10⁶)
WT
1767 HO
1716 HO
1716 HO 1767 HO

图14

图 15A 表达 hTRBV的 CD8 T 细胞的百分率

	TRBV-18	TRBV-19	TRBV-20	TRBV-25	TRBV-27	TRBV-28	TRBV-29
WT	0.03 ± 0.01	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.00	0.02 ± 0.02	0.01 ± 0.01
1716 HO	0.06 ± 0.03	0.01 ± 0.01	2.68 ± 0.51	1.20 ± 0.09	13.53 ± 0.71	10.07 ± 1.63	0.00 ± 0.00
1716 HO 1767 HO	0.07 ± 0.05	0.01 ± 0.01	1.89 ± 0.35	1.12 ± 0.11	6.71 ± 0.57	7.00 ± 0.65	0.00 ± 0.00

图 15B 表达hTRBV的CD4 T 细胞的百分率

	TRBV-18	TRBV-19	TRBV-20	TRBV-25	TRBV-27	TRBV-28	TRBV-29
WT	0.03 ± 0.02	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.03 ± 0.02	0.01 ± 0.0	0.02 ± 0.02	0.00 ± 0.01
1716 HO	0.05 ± 0.02	0.01 ± 0.00	2.35 ± 0.46	0.52 ± 0.04	2.88 ± 0.19	3.82 ± 0.66	0.00 ± 0.00
1716 HO 1767 HO	0.05 ± 0.03	0.01 ± 0.0	2.08 ± 0.15	0.23 ± 0.06	1.57 ± 0.18	2.59 ± 0.24	0.00 ± 0.00

图15

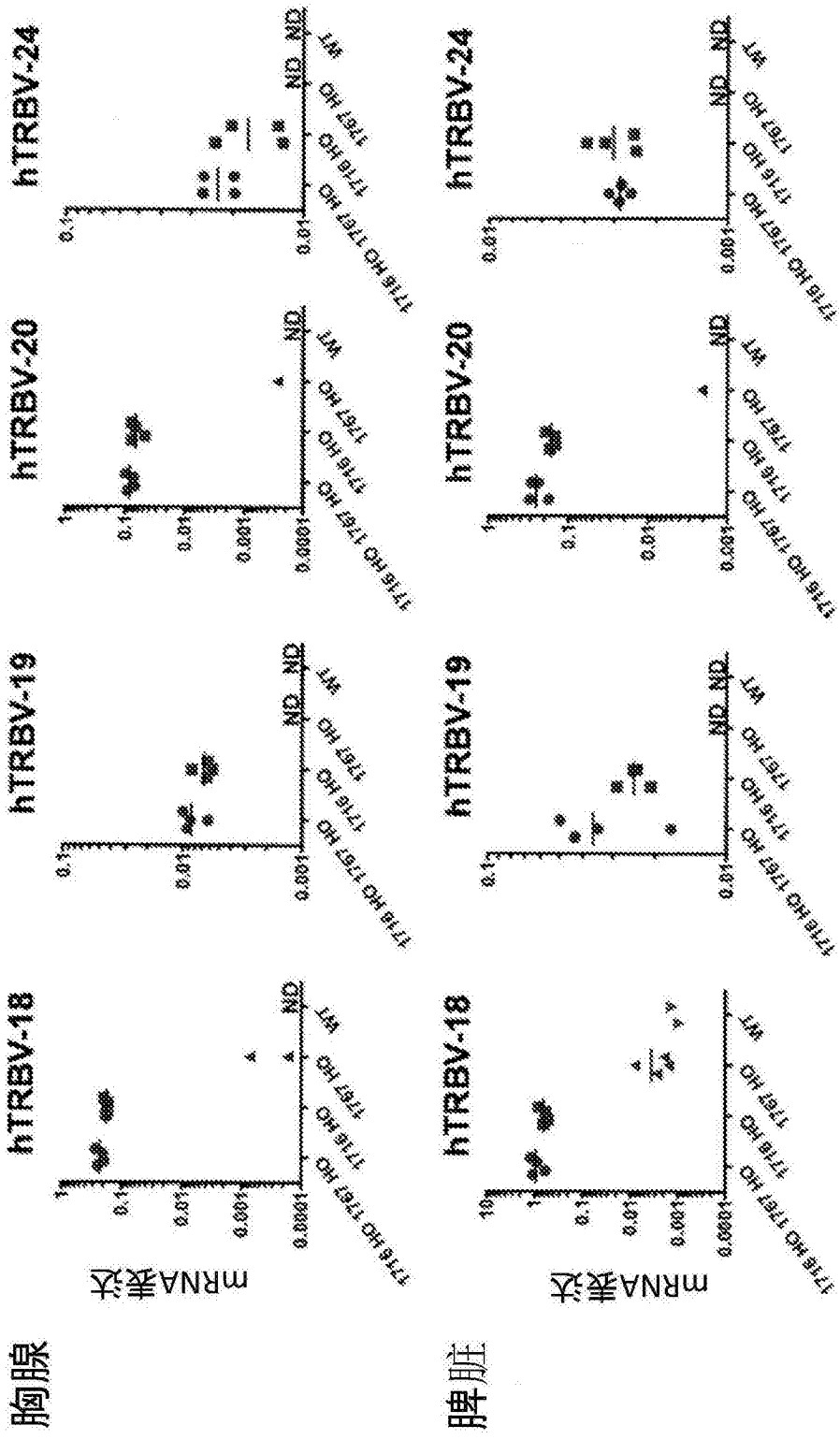

胸腺
脾脏
mRNA表达
hTRBV-18
hTRBV-19
hTRBV-20
hTRBV-24
WT
17T67 HO
17T6 HO
17T6 HO 17T67 HO
ND
完整的脾脏和胸腺。将mRNA归一化至mTCRb恒定1(n=4 只小鼠每组)。
ND=未检出(Ct≥35)

图16A

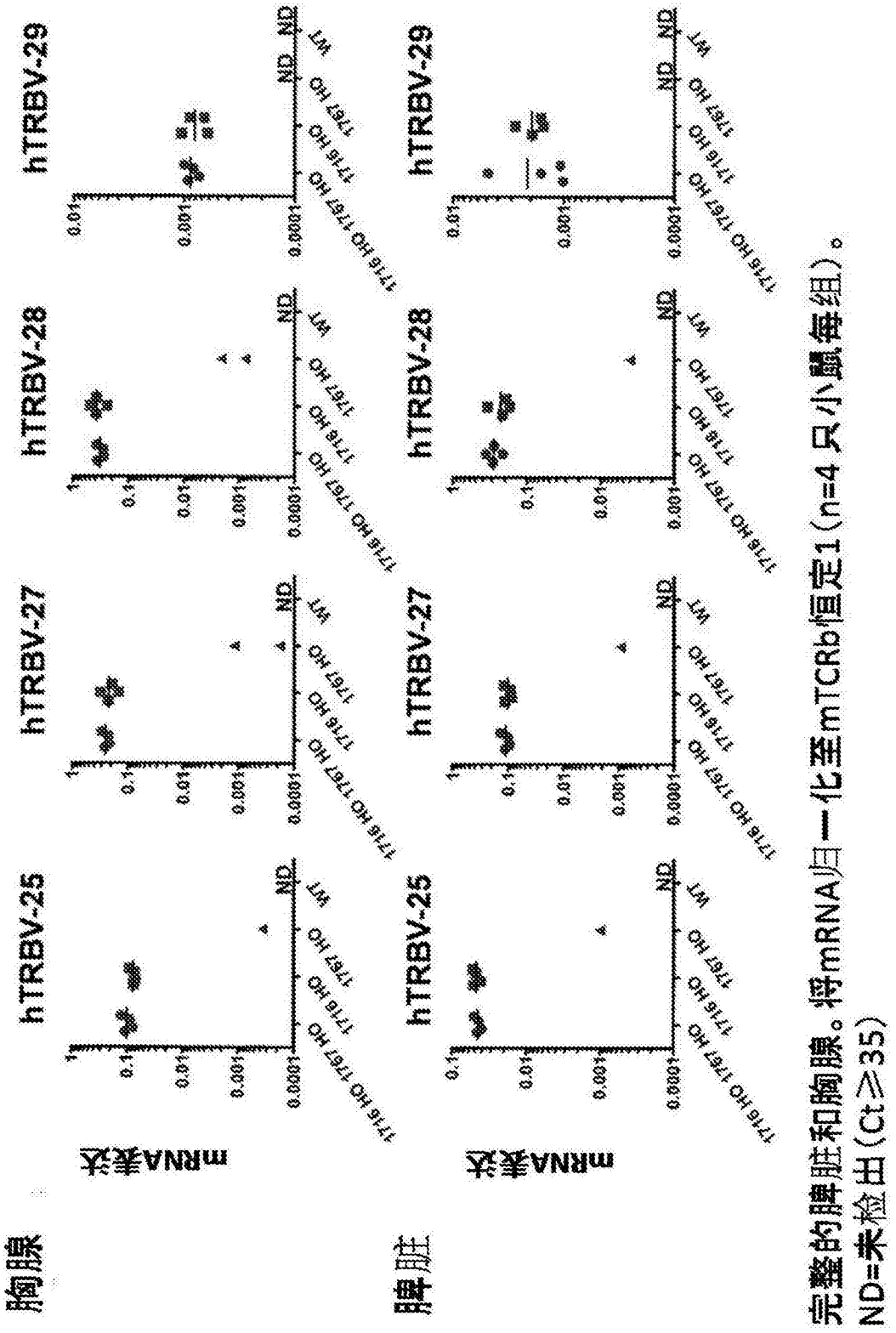

胸腺
脾脏
mRNA表达
hTRBV-25
hTRBV-27
hTRBV-28
hTRBV-29
WT
1716 HO
1767 HO
1716 HO 1767 HO
ND
完整的脾脏和胸腺。将mRNA归一化至mTCRb恒定1(n=4 只小鼠每组)。
ND=未检出(Ct≥35)

图16B

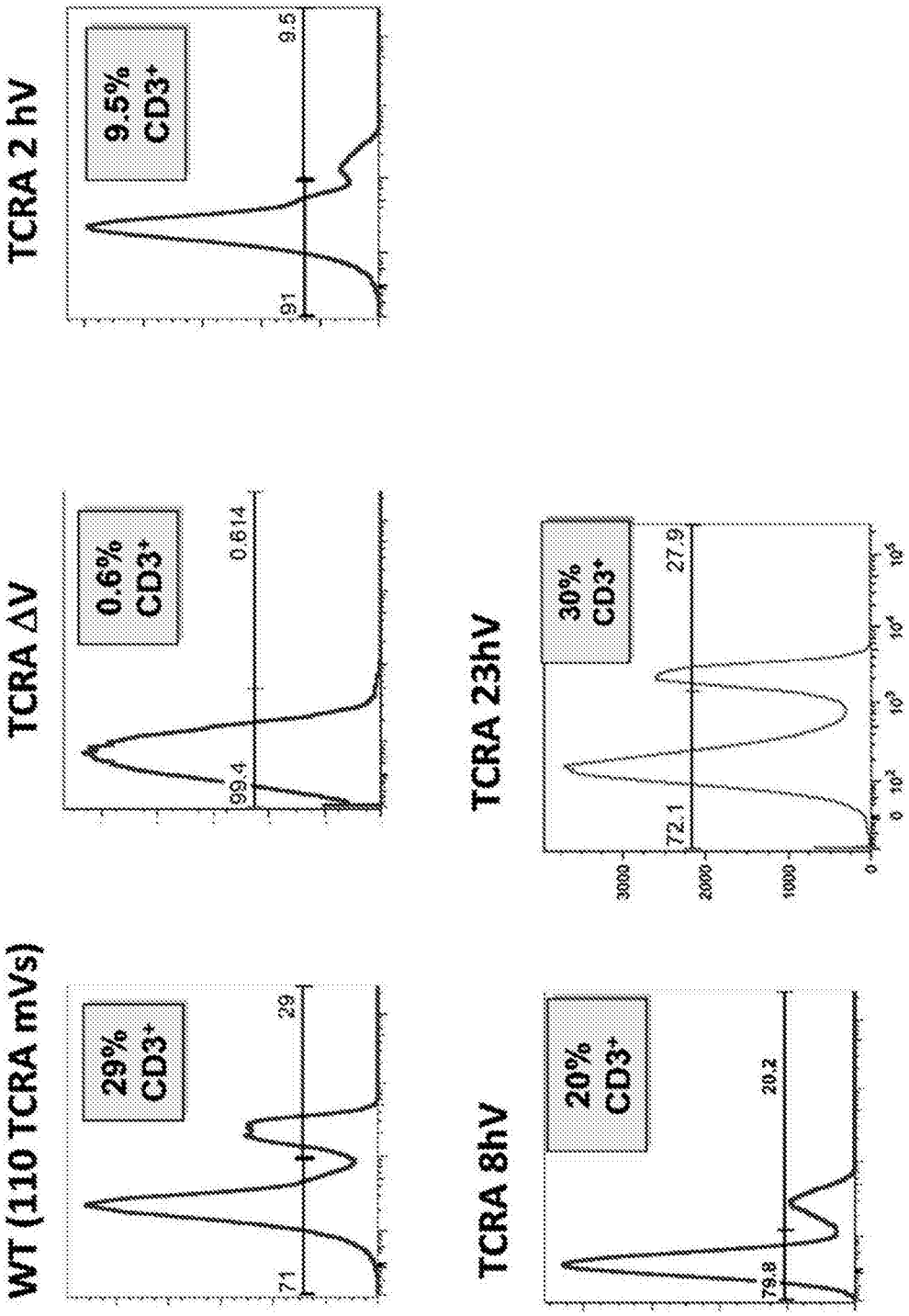

TCRA 2 hV
9.5% CD3+
9.5
9.1
TCRA ΔV
0.6% CD3+
0.614
99.4
TCRA 23hV
30% CD3+
27.9
72.1
WT (110 TCRA mVs)
29% CD3+
29
7.1
TCRA 8hV
20% CD3+
20.2
79.8

图17

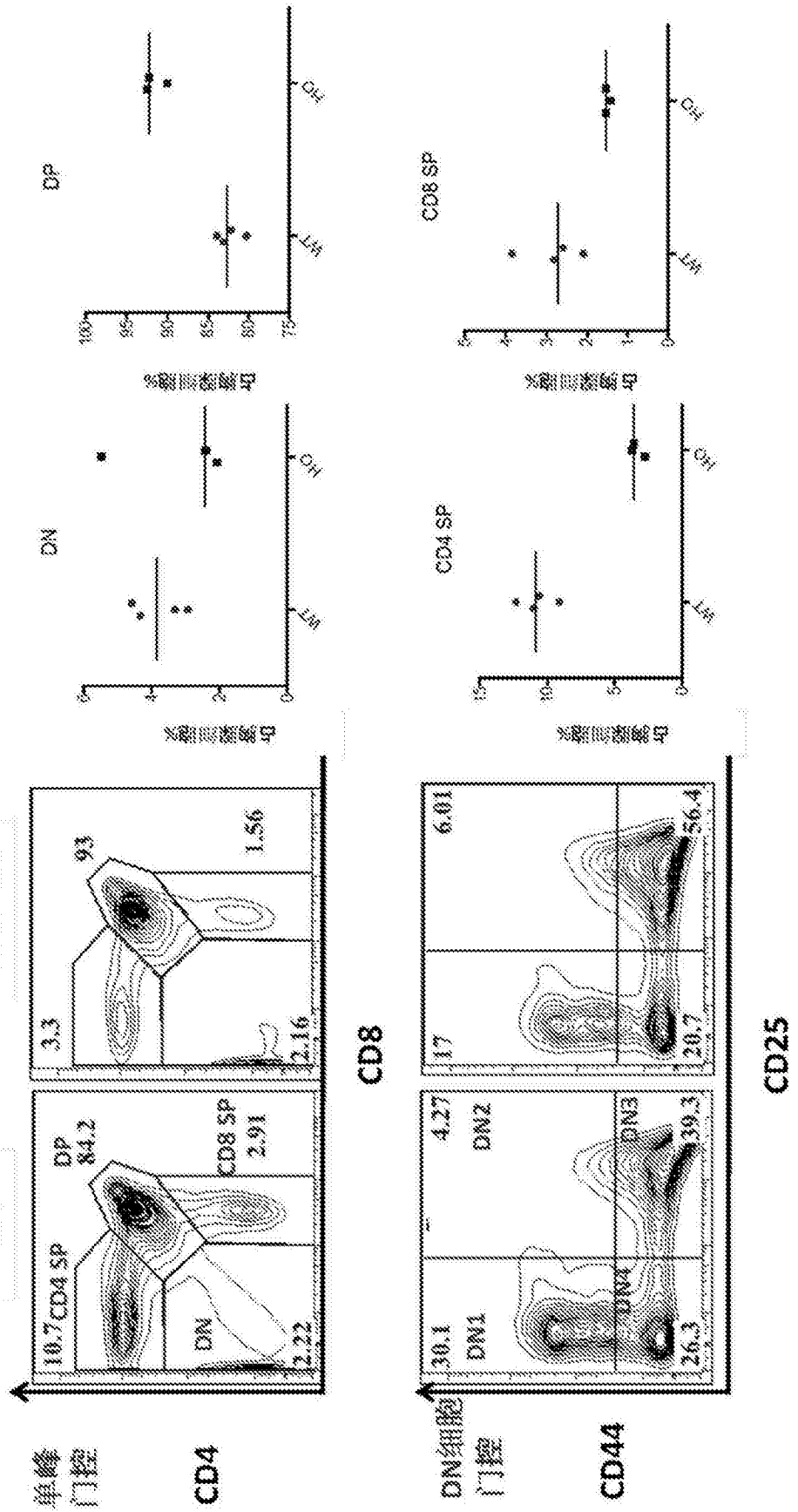

WT
1979 HO
单峰门控
CD4
CD8
CD25
DN细胞门控
CD44
10.7
CD4 SP
DP
84.2
CD8 SP
2.91
DN
2.22
3.3
93
1.56
2.16
30.1
DN1
4.27
DN2
DN3
39.3
DN4
26.3
17
6.01
56.4
20.7
DP
DN
CD4 SP
CD8 SP
WT
HO

图18

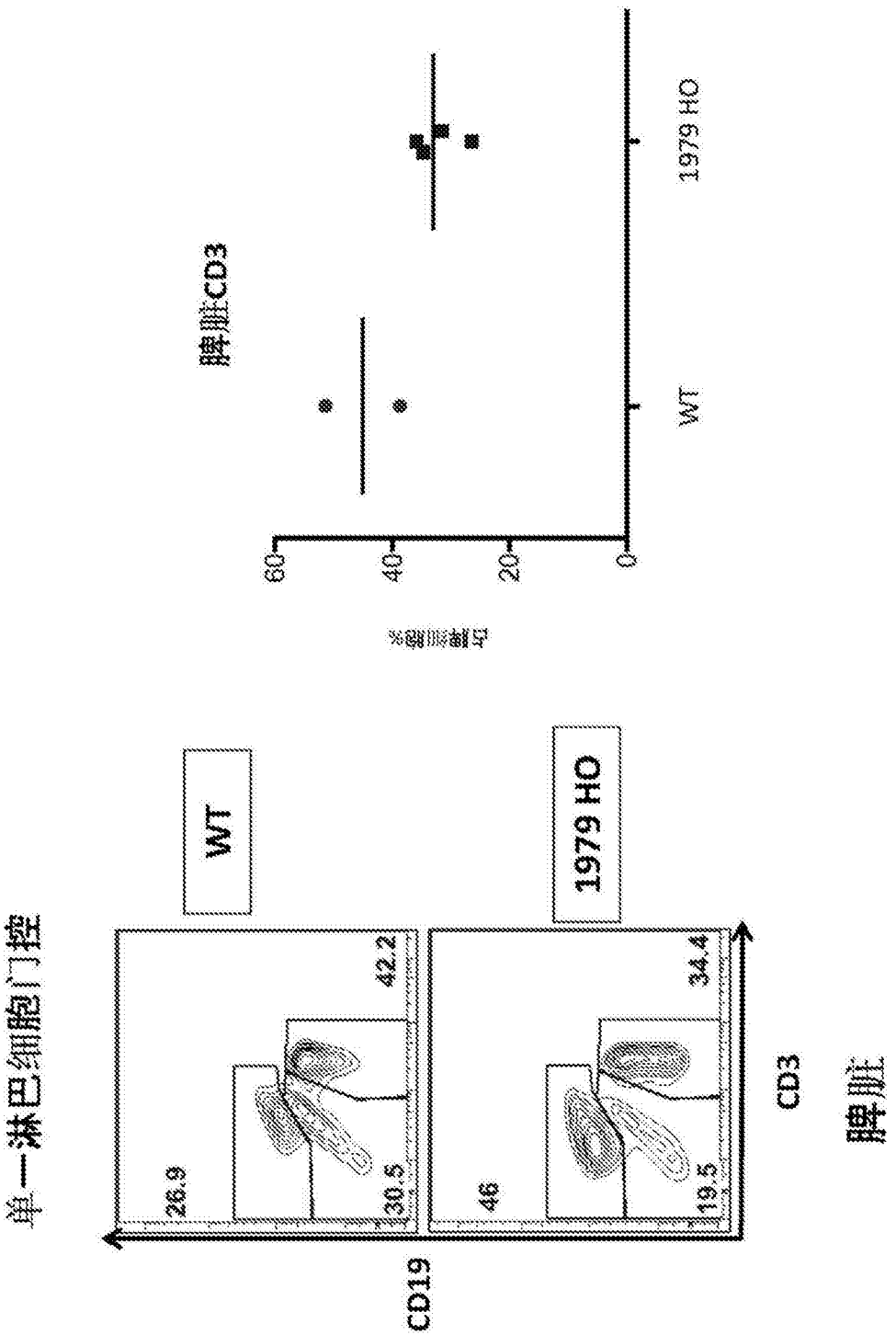

单一淋巴细胞门控
WT
1979 HO
26.9
30.5
42.2
46
19.5
34.4
CD19
CD3
脾脏
脾脏CD3
占脾细胞%
60
40
20
0
WT
1979 HO

图19