



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년06월13일
(11) 등록번호 10-2542272
(24) 등록일자 2023년06월07일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/85 (2006.01) A01K 67/027 (2006.01)
C07K 14/725 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C12N 15/8509 (2013.01)
A01K 67/0278 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2022-7015694(분할)
- (22) 출원일자(국제) 2012년10월26일
심사청구일자 2022년06월07일
- (85) 번역문제출일자 2022년05월10일
- (65) 공개번호 10-2022-0066197
- (43) 공개일자 2022년05월23일
- (62) 원출원 특허 10-2021-7035333
원출원일자(국제) 2012년10월26일
심사청구일자 2021년11월25일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2012/062065
- (87) 국제공개번호 WO 2013/063361
국제공개일자 2013년05월02일
- (30) 우선권주장
61/552,582 2011년10월28일 미국(US)
(뒷면에 계속)
- (56) 선행기술조사문헌
JP2005505236 A*
(뒷면에 계속)

- (73) 특허권자
리제너론 파아마슈티컬스, 인크.
미국 뉴욕 10591-6707 테리타운 올드 소오 밀 리
버 로드 777
- (72) 발명자
맥도날드 린
미국 뉴욕주 10605 화이트 플레인즈 케드니 웨이
16
머피 앤드류 제이.
미국 뉴욕주 10520 크로톤-온-허드슨 뉴턴 코트
10
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
장훈

전체 청구항 수 : 총 13 항

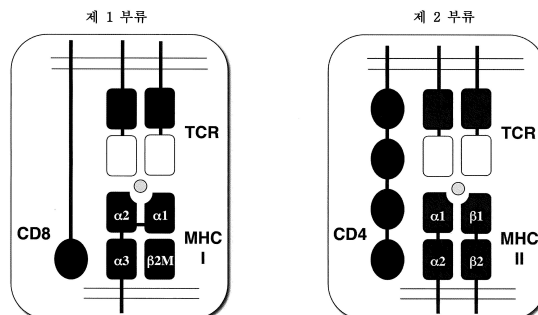
심사관 : 박영관

(54) 발명의 명칭 유전자 변형된 T 세포 수용체 마우스

(57) 요약

본 발명은, 계놈에 재배열되지 않은 T 세포 수용체 가변 유전자좌를 포함하는 유전자 변형된 비-사람 동물뿐만 아니라, 이를 포함하는 비-사람 배아, 세포 및 조직도 제공한다. 또한, 본 발명은, 상기 유전자 변형된 비-사람 동물을 제조하기 위한 작제물 및 이의 제조 방법도 제공한다. 본 발명은 또한 유전자 변형된 비-사람 동물의 각종 사용 방법을 제공한다.

대표도



- (52) CPC특허분류
C07K 14/7051 (2013.01)
A01K 2207/15 (2013.01)
A01K 2217/072 (2013.01)
A01K 2217/15 (2013.01)
A01K 2227/105 (2013.01)
A01K 2267/0387 (2013.01)
C07K 2319/00 (2013.01)
C12N 2800/204 (2013.01)
C12N 2800/30 (2013.01)
- (72) 발명자
맥휘터 존
 미국 뉴욕주 10591 테리타운 크레센트 드라이브 2035
투 나신
 미국 뉴욕주 10570 플레전트빌 워싱턴 예비뉴 514
보로니나 베라
 미국 뉴욕주 10594 쏘우드 그래머시 피엘. 33
규레르 카간
 미국 뉴욕주 10594 발할라 파멜라 레인 8
미저 캐롤리나
 미국 뉴욕주 10591 테리타운 처치 스트리트 14 세
 킨트 플로어
스티븐스 션
 미국 캘리포니아주 94158 샌프란시스코 베리 스트
 리트 355 에이피티 413
- (56) 선행기술조사문헌
 W02011004192 A1
 J. Exp. Med., vol.170(4), pp.1091-1101(1989).
 J. Exp. Med., vol.173(4), pp.1007-1015(1991).
 J. Immunol., vol.149(1), pp.136-142(1992).
 Eur. J. Immunol., vol.19(12),
 pp.2349-2354(1989).
 W02003006639 A1
 W02005004592 A2
 Nature, vol. 348(6302),
 pp.642-644(1990.12.13).
 US20050050580 A1
 W02008010100 A2
 *는 심사관에 의하여 인용된 문헌
- (30) 우선권주장
 61/621,198 2012년04월06일 미국(US)
 61/700,908 2012년09월14일 미국(US)
-

명세서

청구범위

청구항 1

재배열되지 않은 사람 TCR α 가변 영역 서열을 포함하는 표적화 벡터로서,

상기 재배열되지 않은 사람 TCR α 가변 영역 서열이 기능성 재배열되지 않은 사람 TCR J α 유전자 분절들에 작동가능하게 연결된 기능성 재배열되지 않은 사람 TCR V α 유전자 분절들을 포함하고,

상기 재배열되지 않은 사람 TCR α 가변 영역 서열이 마우스 배아 줄기(ES) 세포에서의 내인성 TCR α 유전자좌에 대하여 상기 표적화 벡터를 표적화하는 표적화 아암에 의해 플랭킹되어 상기 기능성 재배열되지 않은 사람 TCR V α 유전자 분절들 및 상기 기능성 재배열되지 않은 사람 TCR J α 유전자 분절들이 내인성 TCR C α 유전자 서열에 작동가능하게 연결되는, 표적화 벡터.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 표적화 벡터 및 내인성 TCR α 유전자좌 사이의 상동성 재조합 시:

(i) 모든 내인성 TCR V α 유전자 분절들이 상기 기능성 재배열되지 않은 사람 TCR V α 유전자 분절들로 대체되고,

(ii) 모든 내인성 TCR J α 유전자 분절들이 상기 기능성 재배열되지 않은 사람 TCR J α 유전자 분절들로 대체되는, 표적화 벡터.

청구항 3

제1항에 있어서,

(i) 상기 기능성 재배열되지 않은 사람 TCR V α 유전자 분절들이 재배열되지 않은 사람 TRAV40 유전자 분절, 재배열되지 않은 사람 TRAV41 유전자 분절, 재배열되지 않은 사람 TRAV39 유전자 분절, 재배열되지 않은 사람 TRAV35 유전자 분절, 재배열되지 않은 사람 TRAV34 유전자 분절, 재배열되지 않은 사람 TRAV22 유전자 분절, 재배열되지 않은 사람 TRAV21 유전자 분절, 재배열되지 않은 사람 TRAV13-2 유전자 분절, 재배열되지 않은 사람 TRAV8.5 유전자 분절, 재배열되지 않은 사람 TRAV6 유전자 분절, 재배열되지 않은 사람 TRAV5 유전자 분절, 및/또는 재배열되지 않은 사람 TRAV1-1 유전자 분절을 포함하고,

(ii) 상기 기능성 재배열되지 않은 사람 TCR J α 유전자 분절들이 모든 기능성 재배열되지 않은 사람 TCR J α 유전자 분절들을 포함하는, 표적화 벡터.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 기능성 재배열되지 않은 사람 TCR V α 유전자 분절들의 재조합 부위 다운스트림을 포함하는, 표적화 벡터.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 기능성 재배열되지 않은 사람 TCR V α 유전자 분절들의 재조합 부위 다운스트림이 상기 기능성 재배열되지 않은 사람 TCR J α 유전자 분절들의 업스트림인, 표적화 벡터.

청구항 6

제1항에 있어서, 하기 중 적어도 하나를 포함하는, 표적화 벡터:

(i) 재조합 AsiSI 제한 부위,

(ii) 재조합 AscI 제한 부위,

(iii) 서열번호 1, 서열번호 2, 서열번호 3, 서열번호 4, 서열번호 5, 서열번호 6, 서열번호 7, 서열번호 8, 서열번호 9, 서열번호 10, 서열번호 11, 서열번호 12, 및/또는 서열번호 13에 제시된 뉴클레오타이드 서열, 및

(iv) 선별 카세트.

청구항 7

재배열되지 않은 사람 TCR β 가변 영역 서열을 포함하는 표적화 벡터로서, 상기 재배열되지 않은 사람 TCR β 가변 영역 서열이

- (i) 기능성 재배열되지 않은 사람 TCR V β 유전자 분절들, 또는
- (ii) 기능성 재배열되지 않은 사람 TCR D β 유전자 분절들 및 기능성 재배열되지 않은 사람 TCR J β 유전자 분절들을 포함하고,

상기 기능성 재배열되지 않은 사람 TCR β 가변 영역 서열이 설치류 ES 세포에서의 내인성 설치류 TCR β 가변 유전자좌에 대하여 상기 표적화 벡터를 표적화하는 표적화 아암에 의해 플랭킹되어

- (i) 상기 기능성 재배열되지 않은 TCR V β 유전자 분절들이 하나 이상의 트립시노겐 유전자의 업스트림에 삽입되고, 기능성 재배열되지 않은 TCR D β 및 TCR J β 유전자 분절들 및 내인성 TCR C β 유전자 서열에 작동가능하게 연결되거나, 또는
- (ii) 상기 기능성 재배열되지 않은 사람 TCR D β 유전자 분절들 및 기능성 재배열되지 않은 사람 TCR J β 유전자 분절들이 하나 이상의 트립시노겐 유전자의 다운스트림에 삽입되고, 재배열되지 않은 기능성 사람 TCR V β 유전자 분절들 및 내인성 TCR C β 유전자 서열에 작동가능하게 연결되는, 표적화 벡터.

청구항 8

제7항에 있어서,

- (a) 상기 기능성 재배열되지 않은 사람 TCR V β 유전자 분절들을 포함하는 상기 표적화 벡터 및 (b) 내인성 TCR β 유전자좌 사이의 상동성 재조합 시, 5' 트립시노겐 클러스터 및 3' 트립시노겐 클러스터 사이에 위치한 모든 내인성 TCR V β 유전자 분절들이 상기 기능성 재배열되지 않은 사람 TCR V β 유전자 분절들로 대체되거나, 또는
- (a) 상기 기능성 재배열되지 않은 사람 TCR D β 유전자 분절들 및 기능성 재배열되지 않은 사람 TCR J β 유전자 분절들을 포함하는 상기 표적화 벡터 및 (b) 내인성 TCR β 유전자좌 사이의 상동성 재조합 시, 모든 내인성 TCR D β 유전자 분절들이 상기 기능성 재배열되지 않은 사람 TCR D β 유전자 분절들로 대체되고, 모든 내인성 TCR J β 유전자 분절들이 상기 기능성 재배열되지 않은 사람 TCR J β 유전자 분절들로 대체되는, 표적화 벡터.

청구항 9

제7항에 있어서,

- (i) 상기 기능성 재배열되지 않은 사람 TCR V β 유전자 분절들이 재배열되지 않은 사람 TRBV18 유전자 분절, 재배열되지 않은 사람 TRBV19 유전자 분절, 재배열되지 않은 사람 TRBV20 유전자 분절, 재배열되지 않은 사람 TRBV24 유전자 분절, 재배열되지 않은 사람 TRBV25 유전자 분절, 재배열되지 않은 사람 TRBV27 유전자 분절, 재배열되지 않은 사람 TRBV28 유전자 분절, 및/또는 재배열되지 않은 사람 TRBV29 유전자 분절을 포함하거나,
- (ii) 상기 기능성 재배열되지 않은 사람 TCR D β 유전자 분절들이 모든 기능성 재배열되지 않은 사람 TCR D β 유전자 분절들을 포함하거나, 또는
- (iii) 상기 기능성 재배열되지 않은 사람 TCR J β 유전자 분절들이 모든 기능성 재배열되지 않은 사람 TCR J β 유전자 분절들을 포함하는, 표적화 벡터.

청구항 10

제7항에 있어서, 하기 중 적어도 하나를 포함하는, 표적화 벡터:

- (i) 재조합 AsiSI 제한 부위,
- (ii) 재조합 AscI 제한 부위,
- (iii) 서열번호 14, 서열번호 15, 서열번호 16, 서열번호 17, 서열번호 18, 서열번호 19, 서열번호 20, 서열번호 21, 서열번호 22, 서열번호 23, 서열번호 24, 서열번호 25, 서열번호 26 및/또는 서열번호 27에 제시된 뉴클

레오타이드 서열, 및

(iv) 선별 카세트.

청구항 11

마우스 배아 줄기 (ES) 세포를 변형시키는 방법으로서, 상기 방법이 상기 ES 세포를 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 따른 표적화 벡터와 접촉시키는 것을 포함하는, 방법.

청구항 12

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 따른 표적화 벡터를 포함하는, 마우스 ES 세포.

청구항 13

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 따른 표적화 벡터를 포함하는, 마우스.

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

- 청구항 26
삭제
- 청구항 27
삭제
- 청구항 28
삭제
- 청구항 29
삭제
- 청구항 30
삭제
- 청구항 31
삭제
- 청구항 32
삭제
- 청구항 33
삭제
- 청구항 34
삭제
- 청구항 35
삭제
- 청구항 36
삭제
- 청구항 37
삭제
- 청구항 38
삭제
- 청구항 39
삭제
- 청구항 40
삭제
- 청구항 41
삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

청구항 67

삭제

청구항 68

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원에 대한 상호 참조

[0002] 본 출원은 2011년 10월 28일자로 출원된 미국 가출원 제61/552,582호, 2012년 4월 6일자로 출원된 미국 가출원 제61/621,198호 및 2012년 9월 14일자로 출원된 미국 가출원 제61/700,908호에 대한 우선권 이익을 주장하며, 이들 모두의 전문은 본원에 인용에 의해 포함된다.

[0003] 본 발명은, 유전자 변형된 비-사람 동물의 계놈에, 사람 또는 사람화된 T 세포 수용체(T Cell Receptor: TCR) 가변 유전자좌(예를 들면, TCR α 및 TCR β 가변 유전자좌 및/또는 TCR δ 및 TCR γ 가변 유전자좌)를 포함하고, 상기 사람 또는 사람화된 TCR 가변 유전자좌로부터 사람 또는 사람화된 TCR 폴리펩타이드(예를 들면, TCR α 및 TCR β 폴리펩타이드 및/또는 TCR δ 및 TCR γ 폴리펩타이드)를 발현하는, 유전자 변형된 비-사람 동물, 예를 들면, 설치류(예를 들면, 마우스 또는 래트)에 관한 것이다. 본 발명의 사람 또는 사람화된 TCR 가변 유전자좌를 갖는 비-사람 동물은, 내인성 비-사람 TCR 유전자좌에서, 재배열되지 않은 사람 TCR 가변 영역 유전자 분절(예를 들면, V, D 및/또는 J 분절)을 포함한다. 본 발명은 또한 사람 또는 사람화된 TCR 가변 유전자좌를 포함하고 사람 또는 사람화된 TCR 폴리펩타이드를 발현하는 배아, 조직, 및 세포(예를 들면, T 세포)에 관한 것이다.

또한, 본 발명은 사람 또는 사람화된 TCR 가변 유전자좌를 포함하는 유전자 변형된 비-사람 동물의 제조 방법; 및 사람 또는 사람화된 TCR 가변 유전자좌를 포함하고 상기 유전자좌로부터 사람 또는 사람화된 TCR 폴리펩타이드를 발현하는 비-사람 동물, 배아, 조직, 및 세포의 사용 방법을 제공한다.

배경 기술

[0004] 후천성 면역 반응에서, 외부 항원은 B 림프구(예를 들면, 면역글로불린) 및 T 림프구(예를 들면, T 세포 수용체 또는 TCR) 상의 수용체 분자에 의해 인식된다. 혈액 및 세포의 공간 중의 병원체는 체액성 면역 반응의 과정 동안 항체에 의해 인식되는 반면, 세포 내부의 병원체의 파괴는 세포성 면역 반응의 과정 동안 T 세포에 의해 매개된다.

[0005] T 세포는, 세포 표면상의 주요 조직적합성 복합체(Major Histocompatibility Complex: MHC)와 관련하여 이들에 제시된 항원을 인식하고 공격한다. 상기 항원 인식은 T 세포의 표면 상에서 발현된 TCR에 의해 매개된다. 2개의 주요 부류(class)의 T 세포는 다음과 같은 기능을 제공한다: 세포독성 T 세포는 세포 표면 단백질 CD8을 발현하고 보조 T 세포는 세포 표면 단백질 CD4를 발현한다. 세포독성 T 세포는 (MHC와 관련하여) 항원을 제시하는 세포를 직접 파괴하는 신호전달 캐스케이드를 활성화하고, 한편, 보조 T 세포는 몇몇의 부류로 분화하고 (MHC II와 관련하여 제시된 항원의 인식에 의해 프라이밍됨) 이의 활성화는 대식세포-매개된 병원체를 파괴하고 B 세포에 의한 항체 생산을 자극한다.

[0006] 이들의 항원 특이성으로 인해, 다수의 사람 장애에 대한 항체의 치료 가능성에 대해 항체를 현재 널리 연구하고 있다. 사람 표적을 중화할 수 있는 항체를 생성하기 위해, 과학자들은, 동시에 이러한 항체에 대한 면역 반응의 활성화를 회피하면서, 사람 또는 사람화된 면역글로불린을 생산하는데 노력을 집중하였다. 생체내에서 사람화된 항체를 생산하는 하나의 방법은, (1) 서로 작동가능하게 연결되어 있는 재배열되지 않은 사람 면역글로불린 V, D 및 J 분절 레퍼토리 및 내인성 마우스 면역글로불린 중쇄 유전자좌에서의 마우스 불변 영역, 및 (2) 서로 작동가능하게 연결되어 있는 재배열되지 않은 사람 V_K 및 J_K 분절 레퍼토리 및 내인성 마우스 면역글로불린 κ 경쇄 유전자좌에서의 마우스 불변 κ 영역을 포함하는, 사람화된 마우스인 VELOCIMMUNE® 마우스를 사용함에 의한 방법이다. 이와 같이, VELOCIMMUNE® 마우스는 사람 항체를 조작하는데 사용하기 위한 매우 다양한 재배열된 항체 가변 도메인의 풍부한 공급원을 제공한다.

[0007] 항체와 유사하게, T 세포 수용체는, V(D)J 가변 영역 분절을 포함하는 재배열되지 않은 유전자좌(α와 β 유전자좌 또는 δ와 γ 유전자좌)에 의해 암호화된 가변 영역을 포함하고, 이러한 가변 영역은 항원 결합 특이성을 T 세포에게 부여한다. 또한, 항체와 유사하게, 항원에 대한 TCR 특이성은 신규한 치료제의 개발을 위해 이용될 수 있다. 따라서, 서로 동족인 도메인을 포함하고 목적하는 항원에 특이적으로 결합하는 도메인을 포함하는, 사람 T 세포 수용체 가변 도메인을 암호화하는 유전자를 형성하기 위해 재배열될 수 있는 재배열되지 않은 사람 T 세포 가변 영역 유전자 분절을 포함하는 비-사람 동물(예를 들면, 설치류, 예를 들면, 래트 또는 마우스)에 대한 필요성이 당업계에 존재한다. 비-사람 (내인성) T 세포 수용체 불변 유전자 서열에 연결되어 있는 T 세포 수용체 가변 영역 유전자를 형성하기 위해 재배열할 수 있는 재배열되지 않은 사람 유전자 분절을 포함하는 비-사람 동물을 포함한 보존적인 인간화를 포함하는 T 세포 가변 영역 유전자좌를 포함하는 비-사람 동물에 대한 필요성도 또한 존재한다. 사람 T 세포 수용체 가변 서열의 다양한 레퍼토리를 생성할 수 있는 비-사람 동물에 대한 필요성이 여전히 존재한다. 완전한 사람 가변 도메인을 포함하는 T 세포 수용체 폴리펩타이드를 형성하기 위해, 목적하는 항원에 반응하여 대부분 또는 모든 기능성 T 세포 수용체 가변 영역 분절을 재배열할 수 있는 비-사람 동물에 대한 필요성이 존재한다.

발명의 내용

[0008] 본 발명의 요약

[0009] 본 발명은, 세포성 면역 반응에서 기능하는 사람화된 분자를 발현하는 비-사람 세포를 포함하는 비-사람 동물, 예를 들면, 설치류를 제공한다. 또한, 본 발명은, 재배열되지 않은 TCR 가변 유전자좌를 포함하는 비-사람 동물도 제공한다. 본 발명은, 사람화된 설치류 세포를 포함하는 생체내 및 시험관내 시스템을 제공하고, 여기서, 상기 설치류 세포는 하나 이상의 사람화된 면역계 분자를 발현한다. 또한, 본 발명은, 사람화된 TCR 단백질을 암호화하는 재배열되지 않은 사람화된 TCR 설치류 유전자좌도 제공한다.

[0010] 하나의 양상에서, 본 발명은, 유전자 변형된 비-사람 동물의 계놈에, (a) 비-사람(예를 들면, 설치류, 예를 들면, 마우스 또는 래트) TCR α 불변 유전자 서열에 작동가능하게 연결되어 있는, 하나 이상의 사람 V_α 분절 및

하나 이상의 사람 J α 분절을 포함하는 재배열되지 않은 TCR α 가변 유전자좌, 및/또는 (b) 비-사람(예를 들면, 설치류, 예를 들면, 마우스 또는 래트) TCR β 불변 유전자 서열에 작동가능하게 연결되어 있는, 하나 이상의 사람 V β 분절, 하나 이상의 사람 D β 분절, 및 하나 이상의 사람 J β 분절을 포함하는 재배열되지 않은 TCR β 가변 유전자좌를 포함하는, 유전자 변형된 비-사람 동물(예를 들면, 설치류, 예를 들면, 마우스 또는 래트)을 제공한다.

- [0011] 하나의 실시형태에서, 상기 재배열되지 않은 TCR α 가변 유전자좌는 내인성 TCR α 가변 유전자좌에서 내인성 비-사람(예를 들면, 설치류) TCR α 가변 유전자좌를 대체한다. 하나의 실시형태에서, 상기 재배열되지 않은 TCR β 가변 유전자좌는 내인성 TCR β 가변 유전자좌에서 내인성 비-사람(예를 들면, 설치류) TCR β 가변 유전자좌를 대체한다. 하나의 실시형태에서, 상기 내인성 비-사람(예를 들면, 설치류) V α 분절 및 J α 분절은, 재배열된 V α /J α 서열을 형성하도록 재배열될 수 없다. 하나의 실시형태에서, 상기 내인성 비-사람(예를 들면, 설치류) V β 분절, D β 분절, 및 J β 분절은, 재배열된 V β /D β /J β 서열을 형성하도록 재배열될 수 없다. 하나의 실시형태에서, 상기 비-사람 동물은, 상기 동물의 게놈이 기능성 V α 및 기능성 J α 분절을 포함하지 않도록 하는 결실을 포함한다. 하나의 실시형태에서, 상기 비-사람 동물은 상기 동물의 게놈이 기능성 내인성 V β , 기능성 내인성 D β , 및 기능성 내인성 J β 분절을 포함하지 않도록 하는 결실을 포함한다. 하나의 실시형태에서, 상기 동물은 모든 기능성 내인성 V α 분절 및 J α 분절의 결실을 포함한다. 하나의 실시형태에서, 상기 설치류는 모든 기능성 내인성 V β , D β , 및 J β 분절의 결실을 포함한다. 일부 실시형태에서, 사람 V α 분절 및 J α 분절은, 재배열된 V α /J α 서열을 형성하도록 재배열된다. 일부 실시형태에서, 사람 V β 분절, D β 분절, 및 J β 분절은, 재배열된 V β /D β /J β 서열을 형성하도록 재배열된다. 따라서, 각종 실시형태에서, 상기 비-사람 동물(예를 들면, 설치류)은, T 세포의 표면 상에서, 사람 가변 영역 및 비-사람(예를 들면, 설치류) 불변 영역을 포함하는 T 세포 수용체를 발현한다.
- [0012] 일부 양상에서, 상기 비-사람 동물의 T 세포는 흉선에서 T 세포를 발달시켜 CD4 단일 양성 및 CD8 단일 양성 T 세포를 생산한다. 일부 양상에서, 상기 비-사람 동물은 비장 CD3+ T 세포 대 총 비장세포의 정상 비율을 포함한다. 각종 실시형태에서, 상기 비-사람 동물은 말초에서 중심 기억 T 세포 및 효과기 기억 T 세포의 집단을 생성한다.
- [0013] 하나의 실시형태에서, 본원에 기술된 비-사람 동물에서의 상기 재배열되지 않은 TCR α 가변 유전자좌는 61개의 사람 J α 분절 및 8개의 사람 V α 분절을 포함한다. 다른 실시형태에서, 상기 비-사람 동물에서의 상기 재배열되지 않은 TCR α 가변 유전자좌는 사람 J α 분절들의 완전한 레퍼토리 및 사람 V α 분절들의 완전한 레퍼토리를 포함한다.
- [0014] 하나의 실시형태에서, 본원에 기술된 비-사람 동물에서의 상기 재배열되지 않은 TCR β 가변 유전자좌는 14개의 사람 J β 분절, 2개의 사람 D β 분절 및 14개의 사람 V β 분절을 포함한다. 다른 실시형태에서, 상기 비-사람 동물에서의 상기 재배열되지 않은 TCR β 가변 유전자좌는 사람 J β 분절들의 완전한 레퍼토리, 사람 D β 분절들의 완전한 레퍼토리, 및 사람 V β 분절들의 완전한 레퍼토리를 포함한다.
- [0015] 추가의 실시형태에서, 본원에 기술된 비-사람 동물(예를 들면, 설치류)은 사람화된 TCR α 유전자좌에서 사람 TCR δ 가변 분절의 뉴클레오타이드 서열을 추가로 포함한다. 하나의 실시형태에서, 상기 비-사람 동물(예를 들면, 설치류)은 사람화된 TCR α 유전자좌에서 하나 이상의 사람 V δ , D δ , 및 J δ 분절, 예를 들면, 사람 V δ , D δ , 및 J δ 분절들의 완전한 레퍼토리를 추가로 포함한다.
- [0016] 하나의 실시형태에서, 상기 비-사람 동물은 내인성 비-사람 TCR α 및/또는 TCR β 유전자좌를 유지하고, 상기 유전자좌는 비-기능성 유전자좌이다.
- [0017] 하나의 실시형태에서, 상기 비-사람 동물은 설치류이다. 하나의 실시형태에서, 상기 설치류는 마우스 및 래트로부터 선택된다. 하나의 실시형태에서, 상기 설치류는 마우스이다.
- [0018] 하나의 양상에서, 본 발명은, 유전자 변형된 마우스의 게놈에, (a) 비-사람(예를 들면, 마우스 또는 래트) TCR α 불변 유전자 서열에 작동가능하게 연결되어 있는, 사람 J α 분절의 레퍼토리 및 사람 V α 분절의 레퍼토리를 포함하는 재배열되지 않은 TCR α 가변 유전자좌, 및/또는 (b) 비-사람(예를 들면, 마우스 또는 래트) TCR β 불변 유전자 서열에 작동가능하게 연결되어 있는, 사람 J β 분절의 레퍼토리, 사람 D β 분절의 레퍼토리, 및 사람 V β 분절의 레퍼토리를 포함하는 재배열되지 않은 TCR β 가변 유전자좌를 포함하는, 유전자 변형된 마우스를 제공한다. 하나의 실시형태에서, 상기 마우스는 사람 V α 분절들의 완전한 레퍼토리를 포함한다. 하나의 실시형태에서, 상기 마우스는 사람 V β 분절들의 완전한 레퍼토리를 포함한다. 하나의 실시형태에서, 상기 마우스는

사람 Va 분절 및 사람 Ja 분절들의 완전한 레퍼토리를 포함한다. 하나의 실시형태에서, 상기 마우스는 사람 Va 분절 및 사람 Vβ 분절들의 완전한 레퍼토리를 포함한다. 하나의 실시형태에서, 상기 마우스는 사람 Va, 사람 Ja, 사람 Vβ, 사람 Dβ 및 사람 Jβ 분절들의 완전한 레퍼토리를 포함한다.

- [0019] 하나의 실시형태에서, 상기 마우스는 하나 이상의 내인성 마우스 Va 및 하나 이상의 내인성 마우스 Ja 분절을 포함하며, 여기서, 상기 내인성 분절들은, 재배열된 Va/Ja 서열을 형성하도록 재배열될 수 없고, 또한, 하나 이상의 내인성 마우스 Vβ, 하나 이상의 내인성 마우스 Dβ, 및 하나 이상의 내인성 마우스 Jβ 분절을 포함하며, 여기서, 상기 내인성 분절들은, 재배열된 Vβ/Dβ/Jβ 서열을 형성하도록 재배열될 수 없다.
- [0020] 하나의 실시형태에서, 사람 TCRα 가변 영역 분절을 포함하는 재배열되지 않은 TCRα 가변 유전자좌는 내인성 마우스 TCRα 가변 유전자좌에서 마우스 TCRα 가변 유전자를 대체하고, 사람 TCRβ 가변 영역 분절을 포함하는 재배열되지 않은 TCRβ 가변 유전자좌는 내인성 마우스 TCRβ 가변 유전자좌에서 마우스 TCRβ 가변 유전자를 대체한다.
- [0021] 하나의 실시형태에서, 상기 사람 Va 분절 및 Ja 분절은, 재배열된 사람 Va/Ja 서열을 형성하고, 상기 사람 Vβ 분절, Dβ 분절, 및 Jβ 분절은, 재배열된 사람 Vβ/Dβ/Jβ 서열을 형성하도록 재배열된다. 하나의 실시형태에서, 상기 재배열된 사람 Va/Ja 서열은 마우스 TCRα 불변 영역 서열에 작동가능하게 연결되어 있다. 하나의 실시형태에서, 상기 재배열된 사람 Vβ/Dβ/Jβ 서열은 마우스 TCRβ 불변 영역 서열에 작동가능하게 연결되어 있다. 따라서, 각종 실시형태에서, 상기 마우스는 T 세포의 표면 상에서 T 세포 수용체를 발현하고, 여기서, 상기 T 세포 수용체는 사람 가변 영역 및 마우스 불변 영역을 포함한다.
- [0022] 하나의 실시형태에서, 상기 마우스는, 사람화된 TCRα 유전자좌에서 사람 TCRδ 가변 영역 분절(예를 들면, 사람 Vδ, Jδ, 및 Dδ 분절)의 레퍼토리를 추가로 포함한다. 하나의 실시형태에서, 사람 TCRδ 가변 영역 분절의 레퍼토리는 완전한 사람 TCRδ 가변 영역 분절 레퍼토리이다. 하나의 실시형태에서, 상기 사람 TCRδ 가변 영역 분절은 내인성 TCRα 유전자좌에 존재한다. 하나의 실시형태에서, 상기 사람 TCRδ 가변 영역 분절은 내인성 마우스 TCRδ 가변 영역 분절을 대체한다.
- [0023] 하나의 실시형태에서, 상기 유전자 변형된 마우스는, T 세포의 표면 상에서, 사람 가변 영역 및 마우스 불변 영역을 포함하는 T 세포 수용체를 발현한다. 하나의 양상에서, 상기 마우스의 T 세포는 흥선 T 세포를 발달시켜 CD4 단일 양성 및 CD8 단일 양성 T 세포를 생산한다. 하나의 양상에서, 상기 마우스는 비장 CD3+ T 세포 대 총 비장세포의 정상 비율을 포함하고; 하나의 양상에서, 상기 마우스는, 목적하는 항원에 대한 중심 기억 T 세포 및 효과기 기억 T 세포의 집단을 생성한다.
- [0024] 본 발명은, 또한, 본원에 기술된 유전자 변형된 비-사람 동물(예를 들면, 설치류, 예를 들면, 마우스 또는 래트)의 제조 방법을 제공한다.
- [0025] 하나의 양상에서, 본 발명은, 내인성 설치류 TCR 유전자좌에서, 설치류 불변 유전자를 제외한 설치류 TCRα 및 TCRβ 가변 영역 분절을 재배열되지 않은 사람 TCRα 및 TCRβ 가변 영역 분절로 대체함을 포함하는, 사람화된 설치류(예를 들면, 마우스 또는 래트)의 제조 방법을 제공한다. 하나의 실시형태에서, 상기 방법은, 설치류 TCRα 가변 영역 분절(Vα 및/또는 Ja)을 사람 TCRα 가변 영역 분절(Vα 및/또는 Ja)로 대체함(여기서, 상기 TCRα 가변 영역 분절이 비-사람 TCR 불변 영역 유전자에 작동가능하게 연결되어 있어 사람화된 TCRα 유전자좌를 형성한다); 및 설치류 TCRβ 가변 영역 분절(Vβ 및/또는 Dβ 및/또는 Jβ)을 사람 TCRβ 가변 영역 분절(Vβ 및/또는 Dβ 및/또는 Jβ)로 대체함(여기서, 상기 TCRβ 가변 영역 분절이 비-사람 TCR 불변 영역 유전자에 작동가능하게 연결되어 있어 사람화된 TCRβ 유전자좌를 형성한다)을 포함한다. 하나의 실시형태에서, 상기 사람화된 설치류는 마우스이고, 상기 마우스의 생식세포 계열은, 내인성 TCRα 유전자좌에서, 내인성 마우스 TCRα 불변 서열에 작동가능하게 연결되어 있는 사람 TCRα 가변 영역 분절을 포함하고; 상기 마우스의 생식세포 계열은, 내인성 TCRβ 유전자좌에서, 내인성 마우스 TCRβ 불변 서열에 작동가능하게 연결되어 있는 사람 TCRβ 가변 영역 분절을 포함한다.
- [0026] 하나의 실시형태에서, 본 발명은, T 세포의 표면 상에서, 사람 또는 사람화된 가변 영역 및 비-사람(예를 들면, 설치류) 불변 영역을 포함하는 T 세포 수용체를 발현하는, 유전자 변형된 비-사람 동물(예를 들면, 설치류, 예를 들면, 마우스 또는 래트)의 제조 방법으로서, 상기 제조 방법은, 제1 비-사람 동물에서, 내인성 비-사람 TCRα 가변 유전자좌를, 하나 이상의 사람 Va 분절 및 하나 이상의 사람 Ja 분절을 포함하는 재배열되지 않은 사람화된 TCRα 가변 유전자좌로 대체함(여기서, 상기 사람화된 TCRα 가변 유전자좌가 내인성 비-사람 TCRα 불변 영역에 작동가능하게 연결된다); 제2 비-사람 동물에서, 내인성 비-사람 TCRβ 가변 유전자좌를 하나 이상의

사람 V β 분절, 하나 이상의 사람 D β 분절, 및 하나 이상의 사람 J β 분절을 포함하는 재배열되지 않은 사람화된 TCR β 가변 유전자좌로 대체함(여기서, 상기 사람화된 TCR β 가변 유전자좌가 내인성 TCR β 불변 영역에 작동가능하게 연결된다); 및 상기 제1 비-사람 동물과 상기 제2 비-사람 동물을 교배하여, 사람 또는 사람화된 가변 영역 및 비-사람 불변 영역을 포함하는 T 세포 수용체를 발현하는 비-사람 동물을 수득함을 포함하는, 방법을 제공한다.

- [0027] 상기 방법의 하나의 실시형태에서, 상기 내인성 비-사람(예를 들면, 설치류) V α 분절 및 J α 분절은, 재배열된 V α /J α 서열을 형성하도록 재배열될 수 없고, 상기 내인성 비-사람(예를 들면, 설치류) V β 분절, D β 분절, 및 J β 분절은, 재배열된 V β /D β /J β 서열을 형성하도록 재배열될 수 없다. 상기 방법의 하나의 실시형태에서, 상기 사람 V α 분절 및 J α 분절은, 재배열된 V α /J α 서열을 형성하도록 재배열되고, 상기 사람 V β 분절, D β 분절, 및 J β 분절은, 재배열된 V β /D β /J β 서열을 형성하도록 재배열된다. 상기 방법의 하나의 실시형태에서, 상기 재배열되지 않은 사람화된 TCR α 가변 유전자좌는 61개의 사람 J α 분절 및 8개의 사람 V α 분절을 포함하고, 상기 재배열되지 않은 사람화된 TCR β 가변 유전자좌는 14개의 사람 V β 분절, 2개의 사람 D β 분절, 및 14개의 사람 J β 분절을 포함한다. 상기 방법의 다른 실시형태에서, 상기 재배열되지 않은 사람화된 TCR α 가변 유전자좌는 사람 J α 분절들의 완전한 레퍼토리 및 사람 V α 분절들의 완전한 레퍼토리를 포함하고, 상기 재배열되지 않은 사람화된 TCR β 가변 유전자좌는 사람 V β 분절들의 완전한 레퍼토리, 사람 D β 분절들의 완전한 레퍼토리, 및 사람 J β 분절들의 완전한 레퍼토리를 포함한다.
- [0028] 상기 방법의 하나의 양상에서, 상기 비-사람 동물(예를 들면, 설치류)의 T 세포는 흉선 T 세포를 발달시켜 CD4 단일 양성 및 CD8 단일 양성 T 세포를 생산한다. 하나의 양상에서, 상기 비-사람 동물(예를 들면, 설치류)은 비장 CD3+ T 세포 대 총 비장세포의 정상 비율을 포함한다. 하나의 양상에서, 상기 비-사람 동물(예를 들면, 설치류)은, 목적하는 항원에 대한 중심 기억 T 세포 및 효과기 기억 T 세포의 집단을 생성한다.
- [0029] 일부 실시형태에서, 본원에 기술된 내인성 비-사람 TCR α 가변 유전자좌의 대체는 단일 ES 세포에서 이루어지며, 상기 단일 ES 세포를 비-사람(예를 들면, 설치류, 예를 들면, 마우스 또는 래트) 배아에 도입하여 유전자 변형된 비-사람 동물(즉, 제1 비-사람 동물, 예를 들면, 제1 설치류)을 제조하고; 본원에 기술된 내인성 비-사람 TCR β 가변 유전자좌의 대체는 단일 ES 세포에서 이루어지며, 상기 단일 ES 세포를 비-사람(예를 들면, 설치류, 예를 들면, 마우스 또는 래트) 배아에 도입하여 유전자 변형된 비-사람 동물(즉, 제2 비-사람 동물, 예를 들면, 제2 설치류)을 제조한다. 하나의 실시형태에서, 상기 제1 설치류와 상기 제2 설치류를 교배하여 자손을 형성하고, 상기 자손은, 생식세포 계열에 사람화된 TCR α 가변 유전자좌 및 사람화된 TCR β 가변 유전자좌를 포함한다.
- [0030] 상기 방법의 하나의 실시형태에서, 상기 비-사람 동물은 설치류, 예를 들면, 마우스이다. 따라서, 본 발명은, 또한, 유전자 변형된 마우스의 제조 방법도 제공한다.
- [0031] 본 발명은, 또한, 본원에 기술된 비-사람 동물(예를 들면, 설치류, 예를 들면, 마우스 또는 래트)로부터 유도된 세포, 예를 들면, 분리된 T 세포(예를 들면, 세포독성 T 세포, 보조 T 세포, 기억 T 세포 등)를 제공한다. 또한, 본 발명은 본원에 기술된 비-사람 동물로부터 유도된 조직 및 배아를 제공한다.
- [0032] 하나의 양상에서, 본 발명은, 본원에 기술된 바와 같은 설치류를 유전자 변형시켜, 사람화된 TCR α 유전자좌 및/또는 사람화된 TCR β 유전자좌를 포함하도록 하고, 상기 설치류를 T 세포를 형성하기에 충분한 조건 하에 유지함을 포함하고, 여기서, 상기 T 세포가 사람 TCR α 및/또는 사람 TCR β 가변 도메인을 발현하는, 사람 TCR 가변 도메인의 제조 방법을 제공한다.
- [0033] 하나의 양상에서, 본 발명은, 본원에 기술된 바와 같은 비-사람 동물을 목적하는 에피토프에 노출시키고, 상기 비-사람 동물이, 상기 비-사람 동물의 사람화된 TCR에 상기 목적하는 에피토프를 제시하기에 충분한 조건 하에 상기 비-사람 동물을 유지시킴, 및 상기 목적하는 에피토프에 결합하는 사람 TCR 가변 도메인 폴리펩타이드를 암호화하는 상기 비-사람 동물의 핵산을 확인함을 포함하는, 목적하는 에피토프에 결합하는 사람 TCR 가변 도메인을 암호화하는 핵산 서열의 제조 방법을 제공한다.
- [0034] 하나의 양상에서, 본 발명은, 사람화된 TCR 수용체를 제조하기 위한 본원에 기술된 바와 같은 비-사람 동물의 용도를 제공한다. 하나의 양상에서, 본 발명은, 사람 TCR 가변 도메인을 제조하기 위한 본원에 기술된 바와 같은 비-사람 동물의 용도를 제공한다. 하나의 양상에서, 본 발명은, 사람 TCR 가변 도메인을 암호화하는 핵산 서열을 제조하기 위한 본원에 기술된 바와 같은 비-사람 동물의 용도를 제공한다.
- [0035] 하나의 양상에서, 본 발명은, 항원-결합 단백질을 제조하기 위한 사람 TCR 가변 도메인을 암호화하는 핵산 서열

또는 이의 단편의 용도를 제공한다. 하나의 실시형태에서, 상기 항원-결합 단백질은, 목적하는 항원에 결합하는 사람 TCR α 및/또는 사람 TCR β 가변 도메인을 포함하는 TCR 가변 도메인을 포함한다.

[0036] 하나의 양상에서, 본 발명은, 사람화된 T 세포 수용체를 이의 표면 상에서 발현하는 비-사람 세포를 제조하기 위한 기술에 개시된 바와 같은 비-사람 동물의 용도를 제공한다.

[0037] 하나의 양상에서, 본 발명은, 본원에 기술된 바와 같은 비-사람 동물로부터의 사람화된 T 세포 수용체를 제공한다.

[0038] 본원에 기술된 모든 실시형태 및 양상은, 달리 명시되지 않거나 내용으로부터 명백하지 않다면 서로 연계하여 사용될 수 있다. 다른 실시형태는, 이하의 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용의 검토로부터 당업자에게 자명해질 것이다. 이하의 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용은 본 발명의 각종 실시형태의 대표적인 예를 포함하고, 이는 본 발명의 특허청구범위를 제한하지 않는다. 첨부한 도면은 본 명세서의 일부를 구성하며, 상세한 설명과 함께 실시형태를 설명하기 위한 것이지 본 발명을 제한하기 위한 것이 아니다.

도면의 간단한 설명

[0039] 도 1은 마우스에서 TCR 분자와 MHC 분자 사이의 상호작용에 대한 도해이다: 좌측 패널은 사람 가변 TCR 도메인 및 마우스 불변 TCR 도메인을 갖는 T 세포 수용체를 포함하는 사람화된 TCR 마우스로부터의 마우스 T 세포(상부)를 나타내는데, 이는 항원 제시 세포(하부)에 의해 MHC 제I류를 통해 제시된 항원(회색 원)을 인식하며; 우측 패널은 MHC 제II류에 대한 동일한 것을 나타낸다. 상기 MHC I 및 MHC II 복합체는 이들 각각의 보조 수용체인 CD8 및 CD4와 함께 도시되어 있다. 마우스 영역은 흑색이고 사람 영역은 백색이다.

도 2는 마우스(상부 패널, 제1 유전자좌) 및 사람(상부 패널, 제2 유전자좌) TCR α 유전자좌의 일반적인 조직에 대한 도해이다(비례척 아님). 하부 패널은 염색체 14 상의 내인성 마우스 유전자좌에서 마우스 중의 TCR α 가변 영역 분절(폐쇄 기호)을 사람 TCR α 가변 영역 분절(개방 기호)로 대체하기 위한 전략에 대한 도해이고; 사람 Vα 분절 및 Jα 분절을 갖는 사람화된 TCR α 유전자좌는 마우스 불변 영역 및 마우스 인헨서와 함께 도시되어 있으며; 도시된 실시형태에서, TCR δ 유전자좌는 사람화 과정에서 결실된다.

도 3은 마우스 TCR α 유전자좌를 사람화하기 위한 진행 전략에 대한 도해로서(비례척 아님), TCR α 가변 영역 유전자 분절은 결실된 마우스 유전자좌(MAID1540)의 초기 사람화의 상류에 순차적으로 추가된다. 마우스 서열은 폐쇄 기호로 표시되며, 사람 서열은 개방 기호로 표시된다. MAID란 변형된 대립유전자 ID 번호를 의미한다. TRAV는 TCR Vα 분절이고, TRAJ는 TCR Jα 분절이고(hTRAJ는 사람 TRAJ이다), TRAC는 TCR Cα 도메인이고, TRCD는 TCR δ 이다.

도 4a 내지 4g는 TCR α 유전자좌에서의 진행 사람화 전략에 대한 상세한 도해이다(비례척 아님). 도 4a는 마우스 TCR α V 및 J 분절의 결실에 대한 도해이고, 도 4b는 2V 및 61J 사람 분절을 결실된 마우스 TCR α 유전자좌에 삽입하기 위한 전략에 대한 도해이고, 도 4c는 추가의 사람 V 분절을 삽입하여 총 8V 및 61J 사람 분절을 생산하기 위한 전략에 대한 도해이고, 도 4d는 추가의 사람 V 분절을 삽입하여 총 23V 및 61J 사람 분절을 생산하기 위한 전략에 대한 도해이고, 도 4e는 추가의 사람 V 분절을 삽입하여 총 35V 및 61J 사람 분절을 생산하기 위한 전략에 대한 도해이고, 도 4f는 추가의 사람 분절을 삽입하여 총 48V 및 61J 사람 분절을 생산하기 위한 전략에 대한 도해이고, 도 4g는 추가의 사람 분절을 삽입하여 총 54V 및 61J 사람 분절을 생산하기 위한 전략에 대한 도해이다. MAID란 변형된 대립유전자 ID 번호를 의미한다.

도 5는 마우스 TCR α 유전자좌 사람화 전략의 한 실시형태에 대한 도해로서(비례척 아님), 여기서, 사람 TCR δ 서열(TCR δ Vs, TCR δ Ds, TCR δ Js, TCR δ enh(인헨서) 및 TCR δ 불변(C))은 또한 사람화된 TCR α 유전자좌에서 대체된다. 마우스 서열은 폐쇄 기호로서 표시되고; 사람 서열은 개방 기호로서 표시된다. LTVEC란 대형 표적화 벡터를 의미하며, hTRD는 사람 TCR δ 이다.

도 6은 마우스(상부 패널, 마우스 염색체 6 상의 제1 유전자좌) 및 사람(상부 패널, 사람 염색체 7 상의 제2 유전자좌) TCR β 유전자좌의 일반적인 조직에 대한 도해이다(비례척 아님). 하부 패널은 마우스 염색체 6 상의 내인성 마우스 유전자좌에서 마우스 중의 TCR β 가변 영역 분절(폐쇄 기호)을 사람 TCR β 가변 영역 분절(개방 기호)로 대체하기 위한 전략에 대한 도해이다. 사람 Vβ, Dβ, 및 Jβ 분절을 갖는 사람화된 TCR β 유전자좌는 마우스 불변 영역 및 마우스 인헨서와 함께 도시되어 있고; 도시된 실시형태에서, 상기 사람화된 유전자좌는 마우스 트립시노겐 유전자(흑색 사각형)를 유지하며; 도시된 특정 실시형태에서, 단일 마우스 V 분절은 5' 마우스 트립시노겐 유전자의 상류에 유지된다.

도 7은 마우스 TCR β 유전자좌를 사람화하기 위한 진행 전략에 대한 도해로서(비례적 아님), 여기서, TCR β 가변 영역 유전자 분절은 결실된 마우스 TCR β 가변 유전자좌에 순차적으로 부가된다. 마우스 서열은 폐쇄 기호로 표시되고, 사람 서열은 개방 기호로 표시된다. MAID란 변형된 대립유전자 ID 번호를 의미한다. TRBV 또는 TCRBV는 TCR β V 분절이다.

도 8a 내지 8f는 TCR β 유전자좌에서의 진행 사람화 전략에 대한 상세한 도해이다. 도 8a는 마우스 TCR β V 분절을 결실시키기 위한 전략에 대한 도해이고, 도 8b는 14V 분절을 결실된 마우스 TCR β 유전자좌에 삽입하기 위한 전략에 대한 도해이고, 도 8c는 2D 및 14J 분절을 TCR β 유전자좌(i)에 삽입한 후 *I α P* 부위(ii)를 결실시켜 14V, 2D 및 14J 사람 분절을 생산하기 위한 전략에 대한 도해이고, 도 8d는 추가의 사람 V 분절을 삽입하여 40V, 2D 및 14J 사람 분절을 생산하기 위한 전략에 대한 도해이고, 도 8e는 추가의 사람 V 분절을 삽입하여 66V, 2D 및 14J 사람 분절을 생산하기 위한 전략에 대한 도해이고, 도 8f는 마우스 인헨서의 마우스 V 분절 상류를 대체하여 67V, 2D 및 14J 사람 분절을 생산하기 위한 것에 대한 도해이다. 본 특정 실시형태에서, 하나의 마우스 V 분절은 마우스 트립시노겐의 5'에 유지된다.

도 9는 야생형(Wild Type: WT) 마우스, 결실된 TCR α 유전자좌에 대한 동형접합성 마우스(제1 상부 패널, 도 3의 MAID 1540), 결실된 TCR α 유전자좌에 대해 동형접합성이고 8개의 사람 V α 및 61개의 사람 J α 분절을 포함하는 마우스(제2 상부 패널, 도 3의 MAID 1767 또는 사람화된 TCR α 마우스), 하나의 상류 및 하나의 하류 마우스 V β 분절을 제외한 결실된 TCR β 유전자좌에 대한 동형접합성 마우스(제1 하부 패널, 도 7의 MAID 1545), 하나의 상류 및 하나의 하류 마우스 V β 분절을 갖는 결실된 TCR β 유전자좌에 대해 동형접합성이고 14개의 사람 V β , 2개의 사람 D β 및 14개의 사람 J β 분절을 포함하는 마우스(제2 하부 패널, 도 7의 MAID 1716 또는 사람화된 TCR β 마우스) 및 (상기 2개의 마우스 V β 분절을 제외한) TCR α 와 TCR β 유전자좌 결실 둘 다에 대해 동형접합성이고 내인성 TCR α 유전자좌에서 8개의 사람 V α 및 61개의 사람 J α 분절 및 내인성 TCR β 유전자좌에서 14개의 사람 V β , 2개의 사람 D β 및 14개의 사람 J β 분절을 포함하는 마우스(MAID 1767/1716 또는 사람화된 TCR α/β 마우스)에서 항-CD3 항체로 착색된 비장 세포 %에 대한 대표적인 FACS 분석 히스토그램의 도해이다 (여기서, Y축은 세포수이고, X축은 평균 형광 강도이고, 게이트는 단항 림프구 집단 내 CD3+ T 세포의 빈도를 나타낸다).

도 10은 항-CD4(Y축) 및 항-CD8(X축) 항체(상부 패널)와 항-CD44(Y축) 및 항-CD25(X축) 항체(하부 패널)로 착색된 WT, 동형접합성 사람화된 TCR α (1767 HO; hTCR α), 동형접합성 사람화된 TCR β (1716 HO; hTCR β) 및 동형접합성 사람화된 TCR α/β 마우스(1716 HO 1767 HO; hTCR α/β)로부터의 마우스 흉선 세포의 대표적인 FACS 등고선도이다. 상부 패널의 FACS 플롯은 이중 음성(DN), 이중 양성(DP), CD4 단일 양성(CD4 SP) 및 CD8 단일 양성(SP CD8) T 세포를 구별할 수 있게 한다. 하부 패널의 FACS 플롯은 T 세포 발달 동안 이중 음성 T 세포의 각 단계(DN1, DN2, DN3 및 DN4)를 구별할 수 있게 한다. 1716 및 1767은 도 3 및 7에서 확인되는 바와 같은 MAID 번호를 의미한다.

도 11은 WT, hTCR α (1767 HO), hTCR β (1716 HO) 또는 hTCR α/β (1716 HO 1767 HO) 마우스(n=4)의 흉선에서 DN, DP, CD4 SP, and CD SP T 세포의 빈도(상부 패널) 및 절대 수(하부 패널)를 나타낸다.

도 12는 WT, hTCR α (1767 HO), hTCR β (1716 HO) 또는 hTCR α/β (1716 HO 1767 HO) 마우스의 비장 세포의 대표적인 FACS 분석이다. 좌측 패널은 항-CD19 항체(Y축: B 림프구에 대한 착색) 또는 항-CD3 항체(X축: T 림프구에 대한 착색) 착색에 기초한 단항 세포의 분석을 나타내고, 중간 패널은 항-CD4(Y축) 또는 항-CD8(X축) 항체 착색에 기초한 CD3+ 세포의 분석을 나타내고, 우측 패널은 항-CD44(Y축) 또는 항-CD62L 항체 착색에 기초한 CD4+ 또는 CD8+ 세포의 분석을 나타낸다. 상기 착색은 말초에서 각종 유형의 T 세포(미접촉 T 세포(T_{naive}) 대 중심 기억 T 세포(T_{cm}) 대 효과기 또는 효과기 기억 T 세포(T_{eff}/T_{em}))를 구별하게 해준다.

도 13은 WT, hTCR α (1767 HO), hTCR β (1716 HO) 또는 hTCR α/β (1716 HO 1767 HO) 마우스(n=4)의 CD4+(좌측 패널) 또는 CD8+(우측 패널) T 세포수/비장(Y축)을 도시한 것이다.

도 14는 WT, hTCR α (1767 HO), hTCR β (1716 HO) 또는 hTCR α/β (1716 HO 1767 HO) 마우스(n=4)의 CD4+(상부 패널) 또는 CD8+(하부 패널) T 세포의 T_{naive}, T_{cm} 및 T_{eff/cm} 세포수/비장(Y축)을 도시한 것이다.

도 15a 및 15b는 WT, hTCR β (1716 HO) 또는 hTCR α/β (1716 HO 1767 HO) 마우스의 비장 CD8+ T 세포(도 15a) 또는 CD4+ T 세포(도 15b)에서 각종 사람 TCR β V 분절의 발현(가변 분절-특이적인 항체를 사용하여 FACS 분석에 의해 결정함)을 요약한 표이다. 데이터는 평균 \pm SD(n=4마리의 마우스/그룹)로 표시된다.

도 16a 및 도 16b는 흉선 또는 비장 T 세포에서 WT, hTCR α (1767 HO), hTCR β (1716 HO) 또는 hTCR α/β (1716 HO 1767 HO) 마우스에 존재하는 각종 사람 TCR β V 분절의 mRNA 발현(Y축)을 도시한 것이다. 도 16a는 사람 TCR β 가변 분절(hTRBV) 18, 19, 20 및 24의 mRNA 발현의 분석을 나타내며, 도 16b는 hTRBV 25, 27, 28 및 29의 mRNA 발현의 분석을 나타낸다.

도 17은 WT 마우스, 결실된 TCR α 유전자좌에 대한 동형접합성 마우스(TCRA Δ V), 2개의 사람 V 분절 및 61개의 사람 J 분절을 포함하는 결실된 TCR α 유전자좌에 대한 동형접합성 마우스(TCRA 2 hV, 도 3의 MAID 1626), 8개의 사람 V 분절 및 61개의 사람 J 분절을 포함하는 결실된 TCR α 유전자좌에 대한 동형접합성 마우스(TCRA 8 hV, 도 3의 MAID 1767) 및 23개의 사람 V 분절 및 61개의 사람 J 분절을 포함하는 결실된 TCR α 유전자좌에 대한 동형접합성 마우스(TCRA 23 hV, 도 3의 MAID 1979)에서 항-CD3 항체로 착색된 비장 세포(여기서, Y축은 세포 수이고, X축은 평균 형광 강도이고, 게이트는 단항 림프구 집단 내 CD3+ T 세포의 빈도를 나타낸다)에 대한 대표적인 FACS 분석 히스토그램을 도시한 것이다.

도 18에서, 좌측 상부 패널은 항-CD4(Y축) 또는 항-CD8(X축) 항체로 착색된 WT 마우스 또는 23개의 사람 V 분절 및 61개의 사람 J 분절을 포함하는 동형접합성 hTCR α 마우스(1979 HO)로부터 수득한 흉선의 CD3+ T 세포에 대한 대표적인 FACS 분석이고, 좌측 하부 패널은 항-CD44(Y축) 또는 항-CD25(X축)로 착색된 WT 또는 1979 마우스로부터 수득한 DN T 세포에 대한 FACS 분석이고, 우측 패널은 WT 또는 1979 HO 마우스(n=4)에서 DN, DP, CD4 SP 또는 CD8 SP인 흉선 세포 퍼센트(%) (Y축)의 그래프이다.

도 19에서, 좌측 패널은 항-CD19 또는 항-CD3 항체로 착색된 WT 또는 1979 HO 마우스로부터의 비장 림프구에 대한 대표적인 FACS 분석이고, 우측 패널은 CD3+인 WT 및 1979 HO 마우스(n=4)로부터 수득한 퍼센트 비장 세포(Y축)의 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

정의

[0040]

본 발명은 사람화된 T 세포 수용체를 발현하는 유전자 변형된 비-사람 동물, 예를 들면, 설치류, 예를 들면, 마우스 또는 래트를 제공한다. 본 발명은 또한 재배열되지 않은 T 세포 수용체 가변 유전자좌를 생식세포 계열에 포함하는 유전자 변형된 비-사람 동물에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 이를 포함하는 배아, 세포 및 조직, 이의 제조 방법 및 이의 사용 방법을 제공한다. 달리 정의되지 않는다면, 본원에 사용된 모든 용어 및 어구는 그 용어 또는 어구가 사용된 문맥으로부터 반대가 명시되지 않거나 명백하지않는 한 그 용어 및 어구가 당업계에서 획득한 의미를 포함한다.

[0041]

[0042]

보존적 아미노산 대체를 설명하기 위해 사용된 용어 "보존적"이란, 유사한 화학적 성질(예를 들면, 전하 또는 소수성)을 갖는 측쇄 R 그룹을 갖는 다른 아미노산 잔기에 의한 아미노산의 대체를 포함한다. 보존적 아미노산 대체는 뉴클레오타이드 서열을 변형시켜 보존적 대체를 암호화하는 뉴클레오타이드 변화를 도입함으로써 달성될 수도 있다. 일반적으로, 보존적 아미노산 대체는 단백질의 목적하는 기능적인 성질, 예를 들면, MHC 분자에 의해 제시된 단백질을 인식하는 T 세포의 능력을 실질적으로 변화시키지 않는다. 유사한 화학적 성질을 갖는 측쇄를 갖는 아미노산 그룹의 예는 글리신, 알라닌, 발린, 류신 및 이소류신과 같은 지방족 측쇄; 세린 및 트레오닌과 같은 지방족-하이드록실 측쇄; 아스파라긴 및 글루타민과 같은 아미드-함유 측쇄; 페닐알라닌, 타이로신 및 트립토판과 같은 방향족 측쇄; 리신, 아르기닌 및 히스티딘과 같은 염기성 측쇄; 아스파르트산 및 글루탐산과 같은 산성 측쇄; 및 시스테인 및 메티오닌과 같은 황-함유 측쇄를 포함한다. 보존적인 아미노산 대체 그룹은, 예를 들면, 발린/류신/이소류신, 페닐알라닌/타이로신, 리신/아르기닌, 알라닌/발린, 글루타메이트/아스파르트이트, 및 아스파라긴/글루타민을 포함한다. 일부 실시형태에서, 본원에 인용에 의해 포함되는 문헌[참조: Gonnet et al., (1992) Exhaustive Matching of the Entire Protein Sequence Database, Science 256: 1443-45]에 개시된 RAM250 로그-우도(log likelihood) 매트릭스에서 양성 값을 갖는 보존적 아미노산 대체이 이루어진다. 일부 실시형태에서, 상기 대체은 RAM250 로그-우도 매트릭스에서 비음성 값을 갖는 완전한 보존적 대체이다.

[0043]

따라서, 본 발명은 본원에 개시된 아미노산 서열에서 보존적 아미노산 대체를 포함하는 사람화된 TCR α 및 TCR β 폴리펩타이드(및/또는 사람화된 TCR δ 및 TCR γ 폴리펩타이드)를 발현하는 유전자 변형된 비-사람 동물을 포함한다.

[0044]

당업자는 본원에 개시된 사람화된 TCR α 및 TCR β 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산 잔기에 추가하여, 유전자 코드의 축퇴로 인해, 다른 핵산도 본 발명의 폴리펩타이드를 암호화할 수 있다. 따라서, 본원에 개시된 사람화된

TCR 폴리펩타이드를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 게놈에 포함하는 유전자 변형된 비-사람 동물에 추가하여, 본 발명은 유전자 코드의 축퇴로 인해 본원에 개시된 것과 상이한 뉴클레오타이드 서열을 게놈에 포함하는 비-사람 동물도 또한 제공한다.

[0045] 서열과 관련하여 사용되는 용어 "동일성"이란, 뉴클레오타이드 및/또는 아미노산 서열 동일성을 측정하기 위해 사용될 수 있는 당업계에 공지된 다수의 상이한 알고리즘에 의해 결정되는 동일성을 포함한다. 본원에 개시된 일부 실시형태에서, 동일성은 10.0의 개방 갭 패널티 및 0.1의 확장 갭 패널티를 적용하는 ClustalW v. 1.83(느림) 정렬과 Gonnet 유사 매트릭스(MacVector™ 10.0.2, MacVector Inc., 2008)를 사용하여 결정된다. 서열의 동일성과 관련하여 비교되는 서열의 길이는 특정 서열에 좌우된다. 각종 실시형태에서, 동일성은 N-말단에서 C-말단까지 성숙 단백질의 서열을 비교함으로써 결정된다. 각종 실시형태에서, 키메라 사람/비-사람 서열을 사람 서열과 비교할 때, 키메라 사람/비-사람 서열의 사람 부분(비-사람 부분이 아님)은 사람 서열과 키메라 사람/비-사람 서열의 사람 부분 사이의 동일성의 수준을 확인하기 위한 비교에 사용된다(예를 들면, 키메라 사람/마우스 단백질의 사람 엑토도메인과 사람 단백질의 사람 엑토도메인을 비교함).

[0046] 서열, 예를 들면, 뉴클레오타이드 또는 아미노산 서열과 관련하여 사용되는 용어 "상동성" 또는 "상동"이란, 최적으로 정렬하고 비교할 때, 뉴클레오타이드 또는 아미노산의 약 75% 이상, 뉴클레오타이드 또는 아미노산의 약 80% 이상, 뉴클레오타이드 또는 아미노산의 약 90% 내지 95% 이상, 예를 들면, 뉴클레오타이드 또는 아미노산의 약 97% 초과가 동일한 2개의 서열을 의미한다. 당업자는 최적의 유전자 표적화 동안, 표적화 작제물이 내인성 DNA 서열과 상동성인 아암(즉, "상동성 아암(homology arm)")을 함유해야 하며; 따라서, 상동성 재조합이 표적화 작제물과 표적화된 내인성 서열 사이에서 발생할 수 있음을 이해할 것이다.

[0047] 용어 "작동가능하게 연결되어 있는"이란, 이렇게 개시된 성분이 이를 의도되는 방식으로 기능하게 하는 관계에 있는 병렬을 의미한다. 이와 같이, 단백질을 암호화하는 핵산 서열은 조절 서열(예를 들면, 프로모터, 인핸서, 사일렌서 서열 등)에 작동가능하게 연결되어 적절한 전사 조절을 유지할 수 있다. 또한, 본 발명의 사람화된 단백질의 각종 부분은 세포에서의 적절한 접기, 가공, 표적화, 발현 및 단백질의 다른 기능성을 유지하기 위해 작동가능하게 연결될 수 있다. 달리 명시되지 않는다면, 본 발명의 사람화된 단백질의 각종 도메인은 서로 작동가능하게 연결되어 있다.

[0048] 유전자 대체과 관련하여 사용되는 용어 "대체"이란, 내인성 유전자좌에서 외인성 유전 물질을 배치하여 내인성 유전자의 모두 또는 일부를 이중상동성 또는 상동성 핵산 서열로 대체하는 것을 의미한다. 하나의 경우에서, 내인성 비-사람 유전자 또는 이의 단편을 상응하는 사람 유전자 또는 이의 단편으로 대체한다. 상응하는 사람 유전자 또는 이의 단편은 구조 및/또는 기능에서 이중상동성이거나, 상동성이거나, 또는 실질적으로 동일 또는 동일한 사람 유전자 또는 단편인데, 이는 내인성 비-사람 유전자 또는 이의 단편이 대체되기 때문이다. 하기 실시예에서 입증되는 바와 같이, 내인성 비-사람 TCR α 및 TCR β 가변 유전자좌의 뉴클레오타이드 서열을 사람 TCR α 및 TCR β 가변 유전자좌에 상응하는 뉴클레오타이드 서열로 대체한다.

[0049] 기능성 단백질과 관련하여 본원에 사용되는 "기능성"이란, 선천성 단백질과 정상적으로 결합되는 하나 이상의 생물학적 활성을 유지하는 단백질을 의미한다. 예를 들면, 본 발명의 일부 실시형태에서, 내인성 유전자좌에서의 대체(내인성 비-사람 TCR α , TCR β , TCR δ 및/또는 TCR γ 가변 유전자좌에서의 대체)으로 인해, 기능성 내인성 단백질을 발현하지 못하는 유전자좌가 발생한다.

[0050] 본원에 사용되는 TCR 유전자좌(예를 들면, TCR α 유전자좌 또는 TCR β 유전자좌)란, 재배열되지 않은 V(D)J 서열, 인핸서, 서열, 불변 서열 및 임의의 상류 또는 하류(UTR, 조절 영역 등) 또는 개재 DNA 서열(인트론 등)을 포함한 전체 TCR 암호 영역을 포함하여 TCR 암호 영역을 포함하는 게놈 DNA를 의미한다. TCR 가변 유전자좌(예를 들면, TCR α 가변 유전자좌 또는 TCR β 가변 유전자좌)란, TCR 가변 영역 분절(V(D)J 영역)을 포함하지만 TCR 불변 서열 및 각종 실시형태에서는 인핸서 서열을 포함하지 않은 영역을 포함하는 게놈 DNA를 의미한다. 다른 서열이 유전자 조작(예를 들면, 선별 카세트, 제한 부위 등)을 위한 TCR 가변 유전자좌에 포함될 수 있으며, 이들은 본원에 포함된다.

[0051] **유전자 변형된 TCR 동물**

[0052] 각종 실시형태에서, 본 발명은 일반적으로 유전자 변형된 비-사람 동물을 제공하는데, 상기 비-사람 동물은 재배열되지 않은 사람화된 TCR 가변 유전자좌를 게놈에 포함한다.

[0053] T 세포는 주요 조직적합성 복합체(MHC; 마우스에서) 또는 사람 백혈구 항원(Human Leukocyte Antigen: HLA; 사람에서) 복합체와 관련된 항원 제시 세포의 표면상의 작은 항원 결정기상의 에피토프와 결합한다. T 세포는 T

세포의 표면상의 T 세포 수용체(TCR) 복합체를 통해 이들 에피토프와 결합한다. T 세포 수용체는 α 및 β 쇠, 또는 γ 및 δ 쇠와 같은 2가지 유형의 쇠로 이루어진 이질이합체 구조이다. α 쇠는 전체 δ 유전자좌를 또한 포함하는 (사람 또는 마우스 염색체 14 상의) α 유전자좌 내에 위치한 핵산 서열에 의해 암호화되며, β 쇠는 (마우스 염색체 6 또는 사람 염색체 7 상의) β 유전자좌 내에 위치한 핵산 서열에 의해 암호화된다. T 세포의 다수는 αβ TCR을 갖고 있는 반면, T 세포의 소수는 γδ TCR을 갖고 있다. TCR과 (CD8+ T 세포에 제시하는) MHC 제I류 및 (CD4+ T 세포에 제시하는) MHC 제II류 분자의 상호작용을 도 1에 도시한다(이는 본 발명의 TCR 단백질의 하나의 특정 실시형태를 나타내며, 폐쇄 기호는 비-사람 서열을 나타내고, 개방 기호는 사람 서열을 나타낸다).

[0054] T 세포 수용체 α 및 β 폴리펩타이드 (및 유사하게 γ 및 δ 폴리펩타이드)는 이황화 결합을 통해 서로 연결되어 있다. TCR을 이루는 상기 2개의 폴리펩타이드의 각각은 불변 및 가변 영역을 포함하는 세포외 도메인, 막관통 도메인 및 세포질 꼬리(tail)를 함유한다(상기 막관통 도메인 및 세포질 꼬리는 또한 상기 불변 영역의 일부이다). TCR의 가변 영역은 항원 특이성을 결정하고, 면역글로불린과 유사하게 3개의 상보성 결정 영역(CDR)을 포함한다. 또한, 면역글로불린 유전자와 유사하게, T 세포 수용체 가변 유전자좌(예를 들면, TCRα 및 TCRβ 유전자좌)는 다수의 재배열되지 않은 V(D)J 분절(가변(V), 연결(J), 및 TCRβ 및 TCRβ δ에서는 다양성(D) 분절)을 함유한다. 흉선에서의 T 세포 발달 동안, TCRα 가변 유전자좌는 재배열하여 생성된 TCRα 쇠는 VJ 분절의 특정 조합(Vα/Jα 서열)에 의해 암호화되고; TCRβ 가변 유전자좌는 재배열하여 생성된 TCRβ 쇠는 VDJ 분절의 특정 조합(Vβ/Dβ/Jβ 서열)에 의해 암호화된다.

[0055] 흉선 기질과의 상호작용으로 인해, 흉선 세포는 각종 세포 표면 마커의 발현을 특징으로 하는 몇 개의 발달 단계를 겪는다. 흉선에서 각종 발달 단계에서의 특징적인 세포 표면 마커의 요약은 표 1에 나타낸다. TCRβ 가변 유전자좌에서의 재배열은 DN2 단계에서 개시하여 DN4 단계 동안 종결하는 반면, TCRα 가변 유전자좌는 DP 단계에서 일어난다. TCRβ 유전자좌 재배열의 완료 후, 세포는 대용 α 쇠인 pTα와 함께 세포 표면에서 TCRβ 쇠를 발현한다[참조: Janeway's Immunobiology, Chapter 7].

표 1

흉선에서 T 세포의 발달 단계

발달 단계	DN1	DN2	DN3	DN4	DP	SP
마커	CD44+/CD25-	CD44+/CD25+	CD44 ^{low} /CD25+	CD44-/CD25-	CD4+/CD8+	CD4+ or CD8+

[0056]

[0057] 미접촉 CD4+ 및 CD8+ T 세포는 흉선을 나와서 말초 림프계 기관(예를 들면, 비장)으로 들어가는데, 이들은 항원에 노출되고 활성화되어 클론에 의하여 팽창하고 다수의 효과기 T 세포(T_{eff}), 예를 들면, 세포독성 T 세포, T_{REG} 세포, T_H17 세포, T_H1 세포, T_H2 세포 등으로 분화한다. 감염 이후, 다수의 T 세포는 기억 T 세포로서 지속되고, 중심 기억 세포(T_{cm}) 또는 효과기 기억 T 세포(T_{em})로서 분류된다[참조: Sallusto et al., (1999) Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions, Nature 401: 708-12; 및 Mackay, (1999) Dual personality of memory T cells, Nature 401: 659-660]. Sallusto 및 동료들에 의하면, 초기 감염 이후, T_{em} 세포는 효과기 기능을 갖는 말초 조직에서 항원-접촉 기억 T 세포의 용이하게 이용가능한 풀을 나타내는 반면, T_{cm} 세포는 이차 감염시 새로운 효과기 T 세포로 될 수 있는 말초 림프계 기관에서의 항원-접촉 기억 T 세포를 나타내는 것으로 제안되었다. 모든 기억 T 세포는 CD45의 CD45RO 이소형을 발현하는 반면(미접촉 T 세포는 CD45RA 이소형을 발현한다), T_{cm}은 말초 림프계 기관 및 림프절에 결합하고 신호전달하는데 중요한 L-셀렉틴(또한 CD62L로도 공지됨) 및 CCR7+의 발현을 특징으로 한다. 따라서, 말초 림프계 기관(예를 들면, 미접촉 T 세포, T_{cm} 세포 등)에서 발견된 모든 T 세포는 CD62L을 발현한다. CD45RO에 추가하여, 모든 기억 T 세포는 다수의 상이한 세포 표면 마커, 예를 들면, CD44를 발현하는 것으로 공지되어 있다. T 세포상의 각종 세포 표면 마커에 대한 요약은 문헌[Janeway's Immunobiology, Chapter 10]에 개시되어 있다.

[0058] TCR 가변 도메인은 항원 인식에서 주로 기능하는 반면, 불변 도메인의 세포외 부분뿐만 아니라, TCR의 막관통

및 세포질 도메인도 또한 중요한 기능을 제공한다. 완전한 TCR 수용체 복합체는 하나 이상의 α 및 β , 또는 γ 및 δ 폴리펩타이드를 필요로 하며, 필요한 추가의 분자는 CD3 γ , CD3 δ 및 CD3 ϵ 뿐만 아니라, ζ 쇠 동질이 합체 ($\zeta\zeta$)를 포함한다. TCR β 재배열의 완료에서, 세포가 TCR β /pT α 를 발현할 때, 이러한 전구(pre)-TCR 복합체는 세포 표면상의 CD3과 함께 존재한다. 세포 표면상의 TCR α (또는 pT α)는 막관통 도메인에서 2개의 염기성 잔기를 가지며, 이 중 하나는 CD3 γ ϵ 이질이합체를 구성하고, 다른 하나는 각각의 산성 잔기를 통해 $\zeta\zeta$ 를 구성한다. TCR β 는 막관통 도메인에서 추가의 염기성 잔기를 가지며, 이는 CD3 δ ϵ 이질이합체를 구성하는 것으로 믿어진다[참조: Kuhns et al., (2006) Deconstructing the Form and Function of the TCR/CD3 Complex, *Immunity* 24: 133-139; Wucherpfennig et al., (2009) Structural Biology of the T-cell Receptor: Insights into Receptor Assembly, Ligand Recognition, and Initiation of Signaling, Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2:a005140]. TCR $\alpha\beta$ 이질이합체인 CD3 $\gamma\epsilon$, CD3 $\delta\epsilon$ 및 $\zeta\zeta$ 를 포함한 조립된 복합체는 T 세포 표면에 발현된다. 막관통 도메인에서의 극성 잔기는 소포체를 퇴장시키기 위한 품질 통제장치로서 역할을 하는 것으로 제안되었으며, 이는 CD3 서브유닛의 부재하에 TCR 쇠가 ER에 유지되고 분해를 위해 표적화되는 것으로 입증되었다[참조: Call and Wucherpfennig, (2005) The T Cell Receptor: Critical Role of the Membrane Environment in Receptor Assembly and Function, *Annu. Rev. Immunol.* 23: 101-125].

[0059] 조립된 복합체의 CD3 및 ζ 쇠는 신호전달 활성을 스스로 결여시킨 TCR $\alpha\beta$ 이질이합체(또는 TCR $\gamma\delta$ 이질이합체)로서 TCR 신호전달을 위한 성분을 제공한다. CD3 쇠는 하나의 면역 수용체 타이로신계 활성화 모티프 (Immune-Receptor-Tyrosine-based-Activation-Motif: ITAM)를 갖고 있는 반면, 각 ζ 쇠는 3개의 직렬 ITAM을 포함한다. ITAM은 관련 키나제에 의해 인산화될 수 있는 타이로신 잔기를 함유한다. 따라서, 조립된 TCR-CD3 복합체는 10개의 ITAM 모티프를 함유한다[참조: Love and Hayes, (2010) ITAM-Mediated Signaling by the T-Cell Antigen Receptor, Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2:e002485]. TCR 진입 이후, ITAM 모티프는 Src 계열 타이로신 키나제, Lck 및 Fyn에 의해 인산화되며, 신호전달 캐스케이드를 개시하여 Ras 활성화, 칼슘 이동, 액틴 세포골격 재배열 및 전사 인자 활성화를 유발하고, 모두 궁극적으로 T 세포 분화, 증식 및 효과기 작용을 유도한다[참조: Janeway's Immunobiology, 7th Ed., Murphy et al. eds., Garland Science, 2008; 이 둘 다 본원에 인용에 의해 포함된다].

[0060] 추가로, TCR β 막관통 및 세포질 도메인은 미토콘드리아 표적화 및 아포토시스 유도에 역할을 하는 것으로 생각되며, 실제로 자연 발생의 N-말단 절단된 TCR β 분자는 흉선 세포에 존재한다[참조: Shani et al., (2009) Incomplete T-cell receptor- β peptides target the mitochondrion and induce apoptosis, *Blood* 113: 3530-41]. 따라서, 몇몇의 중요한 기능은 TCR 불변 영역(각종 실시형태에서, 세포외 부분뿐만 아니라, 막관통 및 세포질 도메인을 포함함)에 의해 제공되며, 각종 실시형태에서, 이러한 영역의 δ 구조는 이를 발현하는 사람화된 TCR 또는 유전자 변형된 비-사람 동물을 설계할 때 고려되어야 한다.

[0061] 재배열된 T 세포 수용체 서열에 대한 유전자 도입 마우스는 당업계에 공지되어 있다. 본 발명은 재배열된 사람 가변 도메인 및 비-사람(예를 들면, 마우스 또는 래트) 불변 영역을 포함하는 T 세포를 포함하는 동물을 포함하여, 재배열하여 사람 T 세포 수용체 가변 도메인을 암호화하는 핵산 서열을 형성할 수 있는 재배열되지 않은 사람 또는 사람화된 T 세포 가변 유전자좌를 포함하는 유전자 변형된 비-사람 동물(예를 들면, 설치류, 예를 들면, 래트 및 마우스)에 관한 것이다. 본 발명은 또한 사람 T 세포 수용체 가변 영역 서열의 다양한 레퍼토리를 생산할 수 있는 비-사람 동물(예를 들면, 설치류, 예를 들면, 래트 및 마우스)을 제공하고, 따라서 본 발명은 목적하는 항원에 반응하여 완전한 사람 가변 도메인을 갖는 TCR을 발현하고 목적하는 항원의 에피토프에 결합하는 비-사람 동물을 제공한다. 일부 실시형태에서, 본 발명은 APC에 의해 제시되는 항원을 포함하지만 이에 한정되지 않는 각종 항원과 반응할 수 있는 다양한 T 세포 수용체 레퍼토리를 생산하는 비-사람 동물을 제공한다.

[0062] 하나의 실시형태에서, 본 발명은 재배열되지 않은 사람 TCR 가변 영역 분절(V(D)J 분절)을 게놈에 포함하는 유전자 변형된 비-사람 동물(예를 들면, 설치류, 예를 들면, 래트 및 마우스)을 제공하는 것으로, 상기 재배열되지 않은 사람 TCR 가변 영역 분절은 내인성 비-사람(예를 들면, 설치류) TCR 가변 유전자좌(예를 들면, TCR α , TCR β , TCR δ 및/또는 TCR γ 가변 유전자좌)에서 내인성 비-사람 TCR 가변 영역 분절을 대체한다. 하나의 실시형태에서, 재배열되지 않은 사람 TCR 가변 유전자좌는 내인성 비-사람 TCR 가변 유전자좌를 대체한다.

[0063] 또 다른 실시형태에서, 본 발명은 재배열되지 않은 사람 TCR 가변 영역 분절(V(D)J 분절)을 게놈에 포함하는 유전자 변형된 비-사람 동물(예를 들면, 설치류, 예를 들면, 래트 및 마우스)을 제공하는 것으로, 상기 재배열되지 않은 사람 TCR 가변 영역 분절은 비-사람 TCR 불변 영역 유전자 서열에 작동가능하게 연결되어 사람화된 TCR

유전자좌를 유발하고, 상기 사람화된 TCR 유전자좌는 상기 내인성 비-사람 TCR 유전자좌 이외의 다른 계놈의 부위에서 존재한다. 따라서, 하나의 실시형태에서, 본 발명은 또한 비-사람 TCR 불변 영역 서열에 작동가능하게 연결되어 있는 재배열되지 않은 사람 TCR 가변 영역 분절을 포함하는 전이유전자를 포함하는 비-사람 동물(예를 들면, 설치류, 예를 들면, 래트 및 마우스)을 제공한다.

[0064] 하나의 양상에서, 본 발명의 유전자 변형된 비-사람 동물은 비-사람(예를 들면, 설치류, 예를 들면, 래트 및 마우스) TCR 불변 유전자 분절을 유지하면서 사람 TCR 가변 영역 분절을 계놈에 포함한다. 각종 실시형태에서, 불변 영역은 TCR의 막관통 도메인 및 세포질 꼬리를 포함한다. 따라서, 본 발명의 각종 실시형태에서, 상기 유전자 변형된 비-사람 동물은 내인성 비-사람 TCR 막관통 도메인 및 세포질 꼬리를 유지한다. 다른 실시형태에서, 비-사람 동물은 비-사람 비-내인성 TCR 불변 유전자 서열, 예를 들면, 비-사람 비-내인성 TCR 막관통 도메인 및 세포질 꼬리를 포함한다. 상기에 나타난 바와 같이, TCR의 불변 영역은 항원-접촉 T 세포 활성화 동안 개시된 신호전달 캐스케이드에 참여하고, 따라서 내인성 TCR 불변 영역은 T 세포의 각종 비-사람 앵커(anchor) 및 신호전달 단백질과 상호작용한다. 따라서, 하나의 양상에서, 본 발명의 유전자 변형된 비-사람 동물은 내인성 비-사람 앵커 또는 신호전달 분자, 예를 들면, CD3 분자(예를 들면, CD3 γ , CD3 δ 및 CD3 ϵ), ζ 쇄, Lck, Fyn, ZAP-70 등을 구성하는 능력을 유지하는 사람화된 T 세포 수용체를 발현한다. TCR 복합체에 구성되어 있는 분자의 목록은 문헌[참조: Janeway's Immunobiology]에 개시되어 있지만, 이에 한정되지는 않는다. 또한, 적어도 내인성 마우스 유전자좌에서의 가변 영역의 대체 및 마우스 불변 도메인의 유지에 기인하는 것으로 믿어지는 정상 B 세포 발달 및 정상 클론 선택 과정을 나타내는 VELOCIMMUNE® 마우스와 유사하게, 하나의 양상에서, 본 발명의 비-사람 동물은 정상 T 세포 발달 및 T 세포 분화 과정을 나타낸다.

[0065] 일부 실시형태에서, 본 발명은 재배열되지 않은 사람 TCR α 가변 영역 분절을 계놈에 포함하는 비-사람 동물을 제공하는 것으로, 상기 재배열되지 않은 사람 TCR α 가변 영역 분절은 비-사람 TCR α 불변 영역 유전자 서열에 작동가능하게 연결되어 사람화된 TCR α 유전자좌를 유발한다. 하나의 실시형태에서, 상기 사람화된 TCR α 유전자좌는 상기 내인성 비-사람 TCR α 유전자좌 이외의 다른 계놈의 부위에서 존재한다. 또 다른 실시형태에서, 상기 재배열되지 않은 사람 TCR α 가변 영역 분절은 내인성 비-사람 TCR α 불변 영역을 유지하면서 내인성 비-사람 TCR α 가변 영역 분절을 대체한다. 하나의 실시형태에서, 상기 재배열되지 않은 사람 TCR α 가변 유전자좌는 내인성 비-사람 TCR α 가변 유전자좌를 대체한다. 일부 실시형태에서, 상기 동물은 내인성 비-사람 TCR β 가변 영역 및 불변 영역 유전자 서열을 유지한다. 따라서, 상기 동물은 키메라 사람/비-사람(즉, 사람화) TCR α 쇠 및 비-사람 TCR β 쇠를 포함하는 TCR을 발현한다.

[0066] 다른 실시형태에서, 본 발명은 재배열되지 않은 사람 TCR β 가변 영역 분절을 계놈에 포함하는 비-사람 동물을 제공하는 것으로, 상기 재배열되지 않은 사람 TCR β 가변 영역 분절은 비-사람 TCR β 불변 영역 유전자 서열에 작동가능하게 연결되어 사람화된 TCR β 유전자좌를 유발한다. 하나의 실시형태에서, 상기 사람화된 TCR β 유전자좌는 상기 내인성 비-사람 TCR β 유전자좌 이외의 다른 계놈의 부위에서 존재한다. 또 다른 실시형태에서, 상기 재배열되지 않은 사람 TCR β 가변 영역 분절은 내인성 비-사람 TCR β 불변 영역을 유지하면서 내인성 비-사람 TCR β 가변 영역 분절을 대체한다. 하나의 실시형태에서, 상기 재배열되지 않은 사람 TCR β 가변 유전자좌는 내인성 비-사람 TCR β 가변 유전자좌를 대체한다. 일부 실시형태에서, 상기 동물은 내인성 비-사람 TCR α 가변 영역 및 불변 영역 유전자 서열을 유지한다. 따라서, 상기 동물은 키메라 사람/비-사람(즉, 사람화) TCR β 쇠 및 비-사람 TCR α 쇠를 포함하는 TCR을 발현한다.

[0067] 일부 특이적 실시형태에서, 본 발명은 (a) 내인성 비-사람(예를 들면, 설치류, 예를 들면, 마우스 또는 래트) TCR α 불변 유전자 서열에 작동가능하게 연결되어 있는, 하나 이상의 사람 V α 분절 및 하나 이상의 사람 J α 분절을 포함하는 재배열되지 않은 T 세포 수용체(TCR) α 가변 유전자좌, 및/또는 (b) 내인성 비-사람(예를 들면, 설치류, 예를 들면, 마우스 또는 래트) TCR β 불변 유전자 서열에 작동가능하게 연결되어 있는, 하나 이상의 사람 V β 분절, 하나 이상의 사람 D β 분절 및 하나 이상의 사람 J β 분절을 포함하는 재배열되지 않은 TCR β 가변 유전자좌를 계놈에 포함하는 유전자 변형된 비-사람 동물(예를 들면, 설치류, 예를 들면, 마우스 또는 래트)을 제공한다.

[0068] 본 발명의 각종 실시형태에서, 상기 재배열되지 않은 사람 또는 사람화된 TCR 가변 유전자좌(예를 들면, TCR α 및/또는 TCR β 가변 유전자좌)는 상기 비-사람 동물(예를 들면, 설치류, 예를 들면, 마우스 또는 래트)의 생식 세포 계열에 포함되어 있다. 각종 실시형태에서, 재배열되지 않은 사람 TCR V(D)J 분절(예를 들면, V α 과 J α 및/또는 V β 와 D β 와 J β 분절)에 의한 TCR V(D)J 분절의 대체는 내인성 비-사람 TCR 가변 유전자좌에 존재하는 데, 상기 사람 V와 J 및/또는 V와 D와 J 분절은 비-사람 TCR 불변 영역 유전자에 작동가능하게 연결되어 있다.

- [0069] 본 발명의 일부 실시형태에서, 상기 비-사람 동물은 2카피의 재배열되지 않은 사람 또는 사람화된 TCR α 가변 유전자좌 및/또는 2카피의 재배열되지 않은 사람 또는 사람화된 TCR β 가변 유전자좌를 포함한다. 따라서, 상기 비-사람 동물은 재배열되지 않은 사람 또는 사람화된 TCR α 와 TCR β 가변 유전자좌 중의 하나 또는 둘에 대해 동형접합성이다. 본 발명의 일부 실시형태에서, 상기 비-사람 동물은 1카피의 재배열되지 않은 사람 또는 사람화된 TCR α 가변 유전자좌 및/또는 1카피의 재배열되지 않은 사람 또는 사람화된 TCR β 가변 유전자좌를 포함한다. 따라서, 상기 비-사람 동물은 재배열되지 않은 사람 또는 사람화된 TCR α 와 TCR β 가변 유전자좌 중의 하나 또는 둘에 대해 동형접합성이다.
- [0070] 하나의 실시형태에서, 사람 가변 영역 분절(예를 들면, 사람 V α 분절 및 J α 분절)을 포함하는 재배열되지 않은 TCR α 가변 유전자좌는 비-사람 게놈에 위치하여 상기 사람 가변 영역 분절은 상응하는 비-사람 가변 영역 분절을 대체한다. 하나의 실시형태에서, 사람 가변 영역 분절을 포함하는 재배열되지 않은 TCR α 가변 유전자좌는 내인성 TCR α 가변 유전자좌를 대체한다. 하나의 양상에서, 내인성 비-사람 V α 분절 및 J α 분절은 재배열되어 재배열된 V α /J α 서열을 형성할 수 없다. 따라서, 하나의 양상에서, 상기 재배열되지 않은 TCR α 가변 유전자좌 중의 상기 사람 V α 분절 및 J α 분절은 재배열되어 재배열된 사람 V α /J α 서열을 형성할 수 있다.
- [0071] 유사하게, 하나의 실시형태에서, 사람 가변 영역 분절(예를 들면, 사람 V β , D β , 및 J β 분절)을 포함하는 재배열되지 않은 TCR β 가변 유전자좌는 비-사람 게놈에 위치하여 상기 사람 가변 영역 분절은 상응하는 비-사람 가변 영역 분절을 대체한다. 하나의 실시형태에서, 사람 가변 영역 분절을 포함하는 재배열되지 않은 TCR β 가변 유전자좌는 내인성 TCR β 가변 유전자좌를 대체한다. 하나의 양상에서, 내인성 비-사람 V β , D β , 및 J β 분절은 재배열되어 재배열된 V β /D β /J β 서열을 형성할 수 없다. 따라서, 하나의 양상에서, 상기 재배열되지 않은 TCR β 가변 유전자좌 중의 상기 사람 V β , D β , 및 J β 분절은 재배열되어 재배열된 사람 V β /D β /J β 서열을 형성할 수 있다.
- [0072] 또 다른 실시형태에서, 사람 가변 영역 분절을 포함하는 재배열되지 않은 TCR α 및 TCR β 가변 유전자좌는 각각의 내인성 TCR α 및 TCR β 가변 유전자좌를 대체한다. 하나의 실시형태에서, 내인성 비-사람 V α 분절 및 J α 분절은 재배열되어 재배열된 V α /J α 서열을 형성할 수 없으며, 내인성 비-사람 V β , D β , 및 J β 분절은 재배열되어 재배열된 V β /D β /J β 서열을 형성할 수 없다. 따라서, 하나의 양상에서, 상기 재배열되지 않은 TCR α 가변 유전자좌 중의 상기 사람 V α 분절 및 J α 분절은 재배열되어 재배열된 사람 V α /J α 서열을 형성할 수 있으며, 상기 재배열되지 않은 TCR β 가변 유전자좌 중의 상기 사람 V β , D β , 및 J β 분절은 재배열되어 재배열된 사람 V β /D β /J β 서열을 형성할 수 있다.
- [0073] 본 발명의 일부 실시형태에서, 사람화된 TCR α 및/또는 TCR β 유전자좌(재배열되지 않은 TCR α 및/또는 TCR β 가변 유전자좌를 포함함)를 포함하는 비-사람 동물은 내인성 비-사람 TCR α 및/또는 TCR β 가변 유전자좌를 유지한다. 하나의 실시형태에서, 상기 비-기능성 유전자좌는 활성화된 유전자좌, 예를 들면, 역유전자좌이다(예를 들면, 가변 유전자좌의 암호화 핵산 서열은 불변 영역 서열에 대하여 역 배향이어서 어떠한 재배열도 역유전자좌로부터 가변 영역 분절을 이용하여 성공할 수 없다). 하나의 실시형태에서, 상기 사람화된 TCR α 및/또는 TCR β 가변 유전자좌는 내인성 비-사람 TCR α 및/또는 TCR β 가변 유전자좌와 내인성 비-사람 TCR α 및/또는 TCR β 불변 유전자좌 사이에 위치할 수 있다.
- [0074] 사람 및 마우스 TCR 유전자좌의 V 및 J 및/또는 V, D, 및 J 분절의 개수, 명명, 위치 및 다른 양상은 www.imgt.org에서 이용가능한 IMGT 데이터베이스를 사용하여 확인될 수 있다. 마우스 TCR α 가변 유전자좌는 대략 1.5메가염기이고, 총 100개의 V α 및 60개의 J α 분절을 포함한다(도 2 참조). 사람 TCR α 가변 유전자좌는 대략 1메가염기이고, 총 54개의 V α 및 61개의 J α 분절을 포함하며, 이중 45개의 V α 및 50개의 J α 는 기능성인 것으로 믿어진다. 달리 명시되지 않는다면, 본 명세서를 통해 언급된 사람 V(D)J 분절의 개수는 V(D)J 분절의 총개수를 의미한다. 본 발명의 하나의 실시형태에서, 상기 유전자 변형된 비-사람 동물(예를 들면, 설치류, 예를 들면, 마우스 또는 래트)은 하나 이상의 사람 V α 및 하나 이상의 사람 J α 분절을 포함한다. 하나의 실시형태에서, 상기 비-사람 동물은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 23, 25, 30, 35, 40, 45, 48, 50 또는 54개 이하의 사람 V α 분절을 포함하는 사람화된 TCR α 유전자좌를 포함한다. 일부 실시형태에서, 상기 사람화된 TCR α 유전자좌는 2, 8, 23, 35, 48 또는 54개의 사람 V α 분절을 포함한다. 따라서, 일부 실시형태에서, 상기 비-사람 동물 중의 상기 사람화된 TCR α 유전자좌는 사람 V α 의 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%를 포함하고, 일부 실시형태에서, 이는 사람 V α 의 약 2%, 약 3%, 약 15%, 약 65%, 약 90% 또는 100%를 포함할 수 있다.

- [0075] 하나의 실시형태에서, 상기 비-사람 동물은 사람 Va40 내지 Va41(Va 분절은 "TRAV" 또는 "TCRAV"로도 또한 언급됨)의 인접 사람 서열을 포함하는 DNA 단편 및 61개의 사람 Ja 분절(Ja 분절은 "TRAJ" 또는 "TCRAJ"로도 또한 언급됨)의 인접 사람 서열을 포함하는 DNA 단편을 포함하는 사람화된 TCR α 유전자좌를 포함한다. 하나의 실시형태에서, 상기 비-사람 동물은 사람 TRAV35 내지 TRAV41의 인접 사람 서열을 포함하는 DNA 단편 및 61개의 사람 TRAJ의 인접 사람 서열을 포함하는 DNA 단편을 포함하는 사람화된 TCR α 유전자좌를 포함한다. 하나의 실시형태에서, 상기 비-사람 동물은 사람 TRAV22 내지 TRAV41의 인접 사람 서열을 포함하는 DNA 단편 및 61개의 사람 TRAJ의 인접 사람 서열을 포함하는 DNA 단편을 포함하는 사람화된 TCR α 유전자좌를 포함한다. 하나의 실시형태에서, 상기 비-사람 동물은 사람 TRAV13-2 내지 TRAV41의 인접 사람 서열을 포함하는 DNA 단편 및 61개의 사람 TRAJ의 인접 사람 서열을 포함하는 DNA 단편을 포함하는 사람화된 TCR α 유전자좌를 포함한다. 하나의 실시형태에서, 상기 비-사람 동물은 사람 TRAV6 내지 TRAV41의 및 61개의 사람 TRAJ의 인접 사람 서열을 포함하는 DNA 단편을 포함하는 사람화된 TCR α 유전자좌를 포함한다. 하나의 실시형태에서, 상기 비-사람 동물은 사람 TRAV1-1 내지 TRAV41의 및 61개의 사람 TRAJ의 인접 사람 서열을 포함하는 DNA 단편을 포함하는 사람화된 TCR α 유전자좌를 포함한다. 각종 실시형태에서, 사람 TCR α 가변 영역 분절의 인접 사람 서열을 포함하는 DNA 단편은 또한 제한 효소 부위, 선별 카세트, 엔도뉴클레아제 부위, 또는 유전자좌 사람화 과정 동안 클로닝 및 선택을 용이하게 하기 위해 삽입된 다른 부위를 포함한다. 각종 실시형태에서, 이들 추가 부위는 TCR α 유전자좌에서 각종 유전자의 적절한 기능성화(예를 들면, 재배열, 스플라이싱 등)를 방해하지 않는다.
- [0076] 하나의 실시형태에서, 상기 사람화된 TCR α 유전자좌는 67개의 사람 Ja 분절 또는 사람 Ja 분절의 100%를 포함한다. 특정 실시형태에서, 사람화된 TCR α 유전자좌는 8개의 사람 Va 분절 및 61개의 사람 Ja 분절을 포함하고, 또 다른 특정 실시형태에서, 사람화된 TCR α 유전자좌는 23개의 사람 Va 분절 및 61개의 사람 Ja 분절을 포함한다. 또 다른 특정 실시형태에서, 상기 사람화된 TCR α 유전자좌는 사람 Va 분절 및 Ja 분절의 완전한 레퍼토리, 즉 α 유전자좌에 의해 암호화된 모든 사람 가변 α 영역 유전자 분절, 또는 54개의 사람 Va 및 61개의 사람 Ja 분절을 포함한다. 각종 실시형태에서, 상기 비-사람 동물은 TCR α 유전자좌에서 어떠한 내인성 비-사람 Va 또는 Ja 분절도 포함하지 않는다.
- [0077] 마우스 TCR β 가변 유전자좌는 대략 0.6메가염기이고, 총 33개의 V β , 2개의 D β 및 14개의 J β 분절을 포함한다(도 6 참조). 사람 TCR β 가변 유전자좌는 대략 0.6메가염기이고, 총 67개의 V β , 2개의 D β 및 14개의 J β 분절을 포함한다. 본 발명의 하나의 실시형태에서, 상기 유전자 변형된 비-사람 동물(예를 들면, 설치류, 예를 들면, 마우스 또는 래트)은 하나 이상의 사람 V β , 하나 이상의 사람 D β 및 하나 이상의 사람 J β 분절을 포함한다. 하나의 실시형태에서, 상기 비-사람 동물은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 23, 25, 30, 35, 40, 45, 48, 50, 55, 60 또는 67개 이하의 사람 V β 분절을 포함하는 사람화된 TCR β 유전자좌를 포함한다. 일부 실시형태에서, 상기 사람화된 TCR β 유전자좌는 8, 14, 40, 66 또는 67개의 사람 V β 분절을 포함한다. 따라서, 일부 실시형태에서, 상기 비-사람 동물 중의 상기 사람화된 TCR β 유전자좌는 사람 V β 의 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 99% 또는 100%를 포함하고, 일부 실시형태에서, 이는 사람 V β 의 약 20%, 약 60%, 약 15%, 약 98% 또는 100%를 포함할 수 있다.
- [0078] 하나의 실시형태에서, 상기 비-사람 동물은 사람 V β 18 내지 V β 29-1(V β 분절은 "TRBV" 또는 "TCRBV"로도 또한 언급됨)의 인접 사람 서열을 포함하는 DNA 단편을 포함하는 사람화된 TCR β 유전자좌를 포함한다. 하나의 실시형태에서, 상기 비-사람 동물은 사람 TRBV18 내지 TRBV29-1의 인접 사람 서열을 포함하는 DNA 단편, 사람 D β 1-J β 1(즉, 사람 D β 1-J β 1-1-J β 1-6 분절)의 인접 사람 서열을 포함하는 별도의 DNA 단편, 및 사람 D β 2-J β 2(즉, 사람 D β 2-J β 2-1-J β 2-7 분절)의 인접 사람 서열을 포함하는 별도의 DNA 단편을 포함하는 사람화된 TCR β 유전자좌를 포함한다. 하나의 실시형태에서, 상기 비-사람 동물은 사람 TRBV6-5 내지 TRBV29-1의 인접 사람 서열을 포함하는 DNA 단편, 사람 D β 1-J β 1(즉, 사람 D β 1-J β 1-1-J β 1-6 분절)의 인접 사람 서열을 포함하는 별도의 DNA 단편, 및 사람 D β 2-J β 2(즉, 사람 D β 2-J β 2-1-J β 2-7 분절)의 인접 사람 서열을 포함하는 별도의 DNA 단편을 포함하는 사람화된 TCR β 유전자좌를 포함한다. 하나의 실시형태에서, 상기 비-사람 동물은 사람 TRBV1 내지 TRBV29-1의 인접 사람 서열을 포함하는 DNA 단편, 사람 D β 1-J β 1의 인접 사람 서열을 포함하는 별도의 DNA 단편, 및 사람 D β 2-J β 2의 인접 사람 서열을 포함하는 별도의 DNA 단편을 포함하는 사람화된 TCR β 유전자좌를 포함한다. 하나의 실시형태에서, 상기 비-사람 동물은 사람 TRBV1 내지 TRBV29-1의 인접 사람 서열을 포함하는 DNA 단편, 사람 D β 1-J β 1의 인접 사람 서열을 포함하는 별도의 DNA 단편, 사람 D β 2-J β 2의 인접 사람 서열을 포함하는 별도의 DNA 단편, 및 사람 TRBV30의 서열을 포함하는 별도의 DNA 단편을 포함하는 사람화된 TCR β 유전자좌를 포함한다. 각종 실시형태에서, 사람 TCR β 가변 영역 분절의 인접 사람 서열을

포함하는 DNA 단편은 또한 제한 효소 부위, 선별 카세트, 엔도뉴클레아제 부위, 또는 유전자좌 사람화 과정 동안 클로닝 및 선택을 용이하게 하기 위해 삽입된 다른 부위를 포함한다. 각종 실시형태에서, 이들 추가 부위는 TCR β 유전자좌에서 각종 유전자의 적절한 기능성화(예를 들면, 재배열, 스플라이싱 등)를 방해하지 않는다.

[0079] 하나의 실시형태에서, 상기 사람화된 TCR β 유전자좌는 14개의 사람 J β 분절 또는 사람 J β 분절의 100%, 및 2개의 사람 D β 분절 또는 사람 J β 분절의 100%를 포함한다. 또 다른 실시형태에서, 상기 사람화된 TCR β 유전자좌는 하나 이상의 사람 V β 단편, 예를 들면, 14개의 사람 V β 분절 및 모든 마우스 D β , 및 J β 분절을 포함한다. 특정 실시형태에서, 사람화된 TCR β 유전자좌는 14개의 사람 V β 분절, 2개의 사람 D β 분절 및 14개의 사람 J β 분절을 포함한다. 또 다른 특정 실시형태에서, 상기 사람화된 TCR β 유전자좌는 사람 V β 분절, D β 분절, 및 J β 분절의 완전한 레퍼토리, 즉 β 유전자좌에 의해 암호화된 모든 사람 가변 β 영역 유전자 분절, 또는 67개의 사람 V β , 2개의 사람 D β 및 14개의 사람 J β 분절을 포함한다. 하나의 실시형태에서, 상기 비-사람 동물은 상기 사람화된 TCR β 유전자좌에서 하나(예를 들면, 5')의 비-사람 V β 분절을 포함한다. 각종 실시형태에서, 상기 비-사람 동물은 TCR β 유전자좌에서 어떠한 내인성 비-사람 V β , D β 또는 J β 분절도 포함하지 않는다.

[0080] 상기 비-사람 동물(예를 들면, 설치류)이 사람 TCR α 및 TCR β (및 임의로 사람 TCR δ 및 TCR γ) 가변 영역 분절의 레퍼토리(예를 들면, 가변 영역 분절들의 완전한 레퍼토리)를 포함하는 각종 실시형태에서, 상기 각종 분절의 레퍼토리(예를 들면, 각종 분절들의 완전한 레퍼토리)는 각종 항원에 대한 TCR 분자의 다양한 레퍼토리를 생성하기 위해 상기 동물에 의해 이용된다.

[0081] 각종 양상에서, 상기 비-사람 동물은, 예를 들면, 사람 게놈 TCR 가변 유전자좌에서와 같이 배열된 프로모터 서열, 리더 서열, 유전자간 서열, 조절 서열 등을 포함하는 재배열되지 않은 사람 게놈 가변 유전자좌에서와 같이 배열된 V와 D와 J, 또는 D와 J, 또는 V와 J, 또는 V 분절을 포함하는 사람 게놈 TCR 가변 유전자좌의 인접 부분을 포함한다. 다른 양상에서, 각종 분절은 재배열되지 않은 비-사람 게놈 TCR 가변 유전자좌에서와 같이 배열된다. 상기 사람화된 TCR α 및/또는 TCR β 유전자좌의 각종 실시형태에서, 상기 사람화된 유전자좌는 병렬된 사람 게놈에서 나타나지 않는 2개 이상의 사람 게놈 분절, 예를 들면, 사람 V 유전자좌의 상류 말단에서 사람 게놈에 위치되어 있는 사람 V 유전자좌의 V 분절의 단편과 병렬되어 있는 불변 영역에 가까운 사람 게놈에 위치되어 있는 사람 V 유전자좌의 V 분절의 단편을 포함할 수 있다.

[0082] 마우스와 사람 둘 다에서, 상기 TCR δ 유전자 분절은 TCR α 유전자좌와 함께 위치되어 있다(도 2 및 5 참조). TCR δ J 및 D 분절은 V α 와 J α 분절 사이에 위치되어 있는 반면, TCR δ V 분절은 TCR α 유전자좌를 통해 배치되어 있으며, 대다수는 각종 V α 분절 중에 위치되어 있다. 각종 TCR δ 분절의 개수 및 위치는 IMGT 데이터베이스로부터 결정될 수 있다. TCR α 유전자좌 내의 TCR δ 유전자 분절의 게놈 배열로 인해, TCR α 유전자좌에서의 성공적인 재배열은 일반적으로 TCR δ 유전자 분절을 결실시킨다.

[0083] 본 발명의 일부 실시형태에서, 재배열되지 않은 사람 TCR α 가변 유전자좌를 포함하는 비-사람 동물은 또한 하나 이상의 사람 V δ 분절, 예를 들면, 사람 V δ 분절들의 완전한 레퍼토리를 포함한다. 따라서, 일부 실시형태에서, 내인성 TCR α 가변 유전자좌의 대체는 사람 V δ 분절에 의한 하나 이상의 비-사람 V δ 분절의 대체를 유발한다. 다른 실시형태에서, 본 발명의 비-사람 동물은 재배열되지 않은 사람화된 TCR α 유전자좌에서 사람 V δ , D δ 및 J δ 분절들의 완전한 레퍼토리를 포함하고; 다른 실시형태에서, 상기 비-사람 동물은 재배열되지 않은 사람화된 TCR α 유전자좌(즉, 사람 가변 영역 분절뿐만 아니라, 사람 인핸서 및 불변 영역을 포함하는 TCR δ 유전자좌)에서 완전한 재배열되지 않은 사람 TCR δ 유전자좌를 포함한다. 완전한 재배열되지 않은 TCR δ 유전자좌를 포함하는 재배열되지 않은 사람화된 TCR α 유전자좌를 삭제하기 위한 실시형태의 예는 도 5에 도시되어 있다.

[0084] 또 다른 실시형태에서, 본 발명의 비-사람 동물은 재배열되지 않은 TCR γ 유전자좌, 예를 들면, 하나 이상의 사람 V γ 및 하나 이상의 사람 J γ 분절(예를 들면, 사람 V γ 및 사람 J γ 가변 영역 분절들의 완전한 레퍼토리)을 포함하는 TCR γ 유전자좌를 추가로 포함한다. 사람 TCR γ 유전자좌는 사람 염색체 7 상에 존재하는 반면, 마우스 TCR γ 유전자좌는 마우스 염색체 13 상에 존재한다(TCR γ 유전자좌에 대한 보다 상세한 사항은 IMGT 데이터베이스를 참조한다).

[0085] 하나의 양상에서, 본원에 개시된 사람화된 TCR α 및 TCR β 가변 유전자좌(및 임의로 사람화된 TCR δ / γ 가변 유전자좌)를 포함하는 비-사람 동물(예를 들면, 설치류, 예를 들면, 마우스 또는 래트)은, T 세포의 표면 상에서, 사람 가변 영역 및 비-사람(예를 들면, 설치류, 예를 들면, 마우스 또는 래트) 불변 영역을 포함하는 사람화된 T 세포 수용체를 발현한다. 일부 실시형태에서, 상기 비-사람 동물은 각종 제시된 항원을 인식하는 사람화된 T

세포 수용체의 다양한 레퍼토리를 발현할 수 있다.

- [0086] 본 발명의 각종 실시형태에서, 본원에 개시된 사람화된 T 세포 수용체 폴리펩타이드는 사람 리더 서열을 포함한다. 대체 실시형태에서, 상기 사람화된 TCR 수용체 핵산 서열은 유전자 조작되어 상기 사람화된 TCR 폴리펩타이드는 비-사람 리더 서열을 포함한다.
- [0087] 본원에 개시된 사람화된 TCR 폴리펩타이드는 내인성 비-사람 조절 요소(예를 들면, 설치류 조절 요소), 예를 들면, 프로모터, 사일렌서, 인핸서 등의 제어하에 발현될 수 있다. 대안적으로, 본원에 개시된 사람화된 TCR 폴리펩타이드는 사람 조절 요소의 제어하에 발현될 수 있다. 각종 실시형태에서, 본원에 개시된 비-사람 동물은 사람 계놈의 동일 자리에서 정상적으로 발견되는 모든 조절 및 기타 서열을 추가로 포함한다.
- [0088] 각종 실시형태에서, 상기 사람화된 TCR 단백질의 사람 가변 영역은 동일 세포 또는 다른 세포의 표면 상에서 각종 단백질과 상호작용할 수 있다. 하나의 실시형태에서, 상기 사람화된 TCR의 사람 가변 영역은 제2 세포, 예를 들면, 항원 제시 세포(Angigen Presenting Cell: APC)의 표면 상에서 항원을 제시하는 MHC 단백질(예를 들면, MHC 제I류 또는 II 단백질)과 상호작용한다. 일부 실시형태에서, 상기 MHC I 또는 II 단백질은 비-사람(예를 들면, 설치류, 예를 들면, 마우스 또는 래트) 단백질이다. 다른 실시형태에서, 상기 MHC I 또는 II 단백질은 사람 단백질이다. 하나의 양상에서, 제2 세포, 예를 들면, APC는 사람 또는 사람화된 MHC 분자를 발현하는 내인성 비-사람 세포이다. 상이한 실시형태에서, 제2 세포는 사람 MHC 분자를 발현하는 사람 세포이다.
- [0089] 하나의 양상에서, 상기 비-사람 동물은, T 세포의 표면 상에서, 비-사람 불변 영역을 갖는 사람화된 T 세포 수용체를 발현하며, 상기 수용체는 비-사람 분자, 예를 들면, T 세포에서 발현된 앵커 또는 신호전달 분자(예를 들면, CD3 분자, ζ 쇠, 또는 CD3 분자 또는 ζ 쇠를 통해 TCR에 고정된 기타 단백질)와 상호작용할 수 있다.
- [0090] 따라서, 하나의 양상에서, 본 발명은 본원에 개시된 사람화된 TCR α 쇠 및 본원에 개시된 사람화된 TCR β 쇠를 포함하는 TCR을 발현하는 비-사람 T 세포, 및 MHC I 또는 MHC II에 결합된 항원을 포함하는 비-사람 항원 제시 세포를 포함하는 세포 복합체를 제공한다. 하나의 실시형태에서, 상기 비-사람 불변 TCR α 및 TCR β 쇠는 비-사람 제타(ζ) 쇠 동질이합체 및 CD3 이질이합체와 복합체를 형성한다. 하나의 실시형태에서, 상기 세포 복합체는 생체내 세포 복합체이다. 하나의 실시형태에서, 상기 세포 복합체는 시험관내 세포 복합체이다.
- [0091] 상기 유전자 변형된 비-사람 동물은 마우스, 래트, 토끼, 돼지, 소(예를 들면, 암소, 황소 및 물소), 사슴, 양, 염소, 닭, 고양이, 개, 흰담비 및 영장류(예를 들면, 마모셋 및 붉은털 원숭이)로 이루어진 그룹으로부터 선택될 수 있다. 적절한 유전자 변형가능한 ES 세포가 용이하게 이용가능하지 않는 비-사람 동물의 경우, 다른 방법을 사용하여 유전자 변형을 포함하는 비-사람 동물을 생산한다. 이러한 방법은, 예를 들면, 비-ES 세포 계놈(예를 들면, 섬유모세포 또는 유도 만능 세포)을 변형하고, 핵 이식을 사용하여 변형된 계놈을 적합한 세포, 예를 들면, 난모세포에 이식하고, 배아를 형성하는 적합한 조건하에 변형된 세포(예를 들면, 변형된 섬유모세포)를 비-사람 동물에 임신시키는 것을 포함한다.
- [0092] 하나의 양상에서, 상기 비-사람 동물은 포유동물이다. 하나의 양상에서, 상기 비-사람 동물은 작은 포유동물, 예를 들면, 상과 디포도이데아(Dipodoidea) 또는 무로이데아(Muroidea)이다. 하나의 실시형태에서, 상기 유전자 변형된 동물은 설치류이다. 하나의 실시형태에서, 상기 설치류는 마우스, 래트 및 햄스터로부터 선택된다. 하나의 실시형태에서, 상기 설치류는 쥐상과로부터 선택된다. 하나의 실시형태에서, 상기 유전자 변형된 동물은 칼로마이시다에(Calomyscidae)(예를 들면, 마우스 유사 햄스터), 크리세티다에(Cricetidae)(예를 들면, 햄스터, 뉴월드 래트 및 마우스, 들쥐), 무리다에(Muridae)(참 마우스 및 래트, 게르빌루스쥐, 아프리카가시쥐, 갈기쥐), 네소마이다에(Nesomyidae)(등산쥐, 바위쥐, 흰꼬리쥐, 말라가시 래트 및 마우스), 플라타칸토마이다에(Platacanthomyidae)(예를 들면, 가시겨울잠쥐) 및 스팔라시다에(Spalacidae)(예를 들면, 두더지쥐, 대나무쥐 및 조커)로부터 선택된 과로부터 유도된다. 특이적인 실시형태에서, 상기 유전자 변형된 설치류는 참 마우스 또는 래트(무리다에과), 게르빌루스쥐, 아프리카가시쥐 및 갈기쥐로부터 선택된다. 하나의 실시형태에서, 상기 유전자 변형된 마우스는 무리다에과의 구성원으로부터 유래한다. 하나의 실시형태에서, 상기 동물은 설치류이다. 특이적인 실시형태에서, 상기 설치류는 마우스 및 래트로부터 선택된다. 하나의 실시형태에서, 상기 비-사람 동물은 마우스이다.
- [0093] 특이적인 실시형태에서, 상기 비-사람 동물은 C57BL/A, C57BL/An, C57BL/GrFa, C57BL/KaLwN, C57BL/6, C57BL/6J, C57BL/6ByJ, C57BL/6NJ, C57BL/10, C57BL/10ScSn, C57BL/10Cr 및 C57BL/01a로부터 선택된 C57BL 품종의 마우스인 설치류이다. 또 다른 실시형태에서, 상기 마우스는 129P1, 129P2, 129P3, 129X1, 129S1 (예를 들면, 129S1/SV, 129S1/SvIm), 129S2, 129S4, 129S5, 129S9/SvEvH, 129S6 (129/SvEvTac), 129S7, 129S8,

129T1 및 129T2인 품종으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 129 품종이다[참조: Festing et al., (1999) Revised nomenclature for strain 129 mice, *Mammalian Genome* 10: 836; 및 Auerbach et al., (2000) Establishment and Chimera Analysis of 129/SvEv- and C57BL/6-Derived Mouse Embryonic Stem Cell Lines]. 특이적인 실시형태에서, 상기 유전자 변형된 마우스는 전술된 129 품종과 전술된 C57BL/6 품종의 혼합체이다. 또 다른 특이적인 실시형태에서, 상기 마우스는 전술된 129 품종의 혼합체 또는 전술된 BL/6 품종의 혼합체이다. 특이적인 실시형태에서, 상기 혼합체의 129 품종은 129S6 (129/SvEvTac) 품종이다. 또 다른 실시형태에서, 상기 마우스는 BALB 품종, 예를 들면, BALB/c 품종이다. 또 다른 실시형태에서, 상기 마우스는 BALB 품종과 또 다른 전술된 품종의 혼합체이다.

[0094] 하나의 실시형태에서, 상기 비-사람 동물은 래트이다. 하나의 실시형태에서, 상기 래트는 위스타(Wistar) 래트, LEA 품종, 스프라그 돌리(Sprague Dawley) 품종, 피셔(Fischer) 품종, F344, F6 및 검은 아구티(Dark Agouti)로부터 선택된다. 하나의 실시형태에서, 상기 래트 품종은 위스타, LEA, 스프라그 돌리, 피셔, F344, F6 및 검은 아구티로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 2개 이상의 품종의 혼합체이다.

[0095] 따라서, 하나의 실시형태에서, 본 발명은 재배열되지 않은 사람 또는 사람화된 TCR 가변 유전자좌, 예를 들면, TCR α , TCR β , TCR δ 및/또는 TCR γ 가변 유전자좌를 게놈에 포함하는 유전자 변형된 마우스를 제공한다. 일부 실시형태에서, 상기 재배열되지 않은 사람 또는 사람화된 TCR 가변 유전자좌는 내인성 마우스 TCR 가변 유전자좌를 대체한다. 다른 실시형태에서, 상기 재배열되지 않은 사람 또는 사람화된 TCR 가변 유전자좌는 상응하는 내인성 마우스 TCR 유전자좌 이외의 다른 게놈의 부위에 존재한다. 일부 실시형태에서, 재배열되지 않은 사람 또는 사람화된 TCR 가변 유전자좌는 마우스 TCR 불변 영역에 작동가능하게 결합되어 있다.

[0096] 하나의 실시형태에서, 본 발명은 유전자 변형된 마우스를 제공하는 것으로, 상기 마우스는 마우스 TCR α 불변 유전자 서열에 작동가능하게 연결되어 있는, 하나 이상의 사람 J α 분절 및 하나 이상의 사람 V α 분절을 포함하는 재배열되지 않은 TCR α 가변 유전자좌; 및 마우스 TCR β 불변 유전자 서열에 작동가능하게 연결되어 있는, 하나 이상의 사람 J β 분절, 하나 이상의 사람 D β 분절 및 하나 이상의 사람 V β 분절을 포함하는 재배열되지 않은 TCR β 가변 유전자좌를 게놈에 포함한다. 하나의 특이적인 실시형태에서, 상기 마우스는 마우스 TCR α 불변 유전자 서열에 작동가능하게 연결되어 있는, 사람 J α 분절들의 완전한 레퍼토리 및 사람 V α 분절들의 완전한 레퍼토리를 포함하는 재배열되지 않은 TCR α 가변 유전자좌; 및 마우스 TCR β 불변 유전자 서열에 작동가능하게 연결되어 있는, 사람 J β 분절들의 완전한 레퍼토리, 사람 D β 분절들의 완전한 레퍼토리 및 사람 V β 분절들의 완전한 레퍼토리를 포함하는 재배열되지 않은 TCR β 가변 유전자좌를 게놈에 포함한다.

[0097] 일부 실시형태에서, 사람 TCR α 가변 영역 분절을 포함하는 재배열되지 않은 TCR α 가변 유전자좌는 내인성 마우스 TCR α 가변 유전자좌를 대체하고, 사람 TCR β 가변 영역 분절을 포함하는 재배열되지 않은 TCR β 가변 유전자좌는 내인성 마우스 TCR β 가변 유전자좌를 대체한다. 일부 실시형태에서, 상기 내인성 마우스 V α 분절 및 J α 분절은, 재배열된 V α /J α 서열을 형성하도록 재배열될 수 없고, 상기 내인성 마우스 V β 분절, D β 분절, 및 J β 분절은, 재배열된 V β /D β /J β 서열을 형성하도록 재배열될 수 없다. 일부 실시형태에서, 상기 사람 V α 분절 및 J α 분절은, 재배열된 사람 V α /J α 서열을 형성하도록 재배열되고, 상기 사람 V β 분절, D β 분절, 및 J β 분절은, 재배열된 사람 V β /D β /J β 서열을 형성하도록 재배열된다.

[0098] 각종 실시형태에서, 본원에 개시된 비-사람 동물(예를 들면, 설치류, 예를 들면, 마우스 또는 래트)은 DN1으로부터 DN1, DN2, DN3, DN4, DP로 및 CD4 또는 CD8 SP T 세포로 진행하는 흉선 발달을 수행할 수 있는 T 세포를 생산한다. 본 발명의 비-사람 동물의 이러한 T 세포는 흉선 발달의 특정 단계 동안 T 세포에 의해 통상적으로 생산되는 세포 표면 분자(예를 들면, CD25, CD44, Kit, CD3, pT α 등)를 발현한다. 따라서, 본원에 개시된 비-사람 동물은 흉선 발달의 DN3 단계에서 TCR β 와 복합체를 형성한 pT α 를 발현한다. 본원에 개시된 비-사람 동물은 흉선을 발달시켜 CD4+ 및 CD8+ T 세포를 생산할 수 있는 T 세포를 발현한다. 일반적으로, 흉선에서, CD4+ 대 CD8+ T 세포의 생리학적 비율은 약 2:1과 3:1의 사이이다[Ge and Stanley, (2008) The O-fucose glycan in the ligand-binding domain of Notch 1 regulates embryogenesis and T cell development, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105: 1539-1544]. 따라서, 하나의 실시형태에서, 본원에 개시된 비-사람 동물은 약 2:1과 3:1 사이의 비율(CD4+:CD8+)로 흉선에서 CD4+ 및 CD8+ T 세포를 생산한다.

[0099] 각종 실시형태에서, 본원에 개시된 비-사람 동물은 말초에서 정상 T 세포를 분화시킬 수 있다. 일부 실시형태에서, 본원에 개시된 비-사람 동물은 효과기 T 세포, 예를 들면, 세포독성 T 림프구(Cytotoxic T Lymphocyte: CTL), T_H1, T_H2, T_{REG}, T_H17 등의 정상 레퍼토리를 생산할 수 있다. 따라서, 이들 실시형태에서, 본원에 개시된 비-사람 동물은 특정한 T 세포 유형을 대표하는 다양한 기능을 수행하는, 예를 들면, 외부 항원을 인식하고 이

에 결합하고 이에 반응하는 효과기 T 세포를 생산한다. 각종 실시형태에서, 본원에 개시된 비-사람 동물은 MHC I 분자와 관련하여 발현되는 세포질 병원체의 펩타이드 단편을 보여주는 세포를 사멸하고, 세포소낭에서 분해되고 대식세포의 표면 상에서 MHC II 분자에 의해 제시된 항원으로부터 유도된 펩타이드를 인식하고 대식세포가 미생물을 사멸하도록 유도하고, B 세포 분화를 촉진시키는 사이토카인을 생성하고, B 세포를 활성화시켜 옵소닌 항체(opsonizing antibody)를 생산하고, 감염 부위에 호중구를 모으는 케모카인을 상피 세포가 생산하도록 유도하는 효과기 T 세포를 생산한다.

- [0100] 추가의 실시형태에서, 본원에 개시된 비-사람 동물은 말초, 예를 들면, 비장에서 정상 수의 CD3+ T 세포를 포함한다. 일부 실시형태에서, 본원에 개시된 비-사람 동물 중의 말초 CD3+ T 세포의 퍼센트(%)는 야생형 동물(즉, 모든 내인성 TCR 가변 영역 분절을 포함하는 동물)의 것에 필적한다. 하나의 실시형태에서, 본원에 개시된 비-사람 동물은 비장 CD3+ T 세포 대 총 비장세포의 정상 비율을 포함한다.
- [0101] 다른 양상에서, 본원에 개시된 비-사람 동물은 목적하는 항원에 반응하여 기억 T 세포의 집단을 생산할 수 있다. 예를 들면, 상기 비-사람 동물은 항원, 예를 들면, 목적하는 항원(예를 들면, 백신 개발 등을 위한 시험용 항원)에 대한 중심 기억 T 세포(T_{cm})와 효과기 기억 T 세포(T_{em}) 둘 다를 생산한다.
- [0102] 충분한 신호(예를 들면, 노치 신호)를 수신하지 못하는 DN1 및 DN2 세포는 B 세포, 골수 세포(예를 들면, 수지상 세포), 비만 세포 및 NK 세포로 발달할 수 있다[참조: Yashiro-Ohtani et al., (2010) Notch regulation of early thymocyte development, *Seminars in Immunology* 22: 261-269]. 일부 실시형태에서, 본원에 개시된 비-사람 동물은 정상 수의 B 세포, 골수 세포(예를 들면, 수지상 세포), 비만 세포 및 NK 세포를 발달시킨다. 일부 실시형태에서, 본원에 개시된 비-사람 동물은 흉선에서 정상 수지상 세포 집단을 발달시킨다.
- [0103] T 세포의 표면 상에서 발현되는 T 세포 수용체의 주요 유형은 TCR α/β 이고, 상기 세포의 소수는 TCR δ/γ 를 발현한다. 본 발명의 일부 실시형태에서, 사람화된 TCR α 및/또는 TCR β 유전자좌를 포함하는 비-사람 동물의 T 세포는 TCR α/β 및 TCR δ/γ 유전자좌의 정상 이용, 예를 들면, 야생형 동물과 유사한 TCR α/β 및 TCR δ/γ 유전자좌의 이용을 나타낸다(예를 들면, 본원에 개시된 비-사람 동물의 T 세포는 야생형 동물에 의해 발현되는 것에 필적하는 비율로 TCR α/β 및 TCR δ/γ 단백질을 발현한다). 따라서, 일부 실시형태에서, 사람화된 TCR α/β 및 내인성 비-사람 TCR δ/γ 유전자좌를 포함하는 비-사람 동물은 모든 유전자좌의 정상 이용을 나타낸다.
- [0104] 본원에 개시된 유전자 조작된 비-사람 동물에 추가하여, 본 발명은 또한 비-사람 배아(예를 들면, 설치류 배아, 예를 들면, 마우스 또는 래트 배아)를 제공하는 것으로, 상기 배아는 본원에 개시된 바와 같은 비-사람 동물(예를 들면, 설치류, 예를 들면, 마우스 또는 래트)로부터 유래하는 공여자 ES 세포를 포함한다. 하나의 양상에서, 상기 배아는 재배열되지 않은 사람화된 TCR 유전자좌를 포함하는 ES 공여자 세포 및 숙주 배아 세포를 포함한다.
- [0105] 본 발명은 또한 조직을 제공하는 것으로, 상기 조직은 본원에 개시된 바와 같은 비-사람 동물(예를 들면, 마우스 또는 래트)로부터 유래하고, 사람화된 TCR 폴리펩타이드(예를 들면, TCR α 및/또는 TCR β, 또는 TCR δ 및/또는 TCR γ 폴리펩타이드)를 발현한다.
- [0106] 추가로, 본 발명은 본원에 개시된 바와 같은 비-사람 동물로부터 분리된 비-사람 세포를 제공한다. 하나의 실시형태에서, 상기 세포는 ES 세포이다. 하나의 실시형태에서, 상기 세포는 T 세포이다. 하나의 실시형태에서, 상기 T 세포는 CD4+ T 세포이다. 또 다른 실시형태에서, 상기 T 세포는 CD8+ T 세포이다.
- [0107] 본 발명은 또한 본원에 개시된 바와 같은 비-사람 동물의 염색체 또는 이의 단편을 포함하는 비-사람 세포를 제공한다. 하나의 실시형태에서, 상기 비-사람 세포는 본원에 개시된 바와 같은 비-사람 동물의 핵을 포함한다. 하나의 실시형태에서, 상기 비-사람 세포는 핵 이식의 결과로서 염색체 또는 이의 단편을 포함한다.
- [0108] 본 발명은 또한 사람 가변 영역 및 비-사람 불변 영역을 포함하는 TCR 단백질을 발현하는 비-사람 세포를 제공한다. TCR 단백질은 TCR α, TCR β 또는 이들의 배합물을 포함할 수 있다. 하나의 실시형태에서, 상기 세포는 T 세포, 예를 들면, CD4+ 또는 CD8+ T 세포이다.
- [0109] 하나의 양상에서, 본 발명은 본원에 개시된 바와 같은 사람화된 TCR 폴리펩타이드를 암호화하는 재배열되지 않은 사람화된 TCR 유전자좌를 포함하는 비-사람 유도된 만능 세포를 제공한다. 하나의 실시형태에서, 상기 유도된 만능 세포는 본원에 개시된 바와 같은 비-사람 동물로부터 유도된다.
- [0110] 하나의 양상에서, 본 발명은 본원에 개시된 바와 같은 비-사람 동물의 세포로부터 유도된 하이브리도마 또는 쿼드로마(quadroma)를 제공한다. 하나의 실시형태에서, 상기 비-사람 동물은 설치류, 예를 들면, 마우스 또는 래

트이다.

[0111] 본 발명은 또한 본원에 개시된 유전자 변형된 비-사람 동물(예를 들면, 설치류, 예를 들면, 마우스 또는 래트)의 제조 방법을 제공한다. 상기 유전자 변형된 비-사람 동물의 제조 방법은 게놈이 사람화된 재배열되지 않은 TCR 유전자좌(예를 들면, 사람화된 재배열되지 않은 TCR α , TCR β , TCR δ 및/또는 TCR γ 유전자좌)를 포함하는 동물을 생산한다. 하나의 실시형태에서, 본 발명은, T 세포의 표면 상에서, 사람 가변 영역 및 비-사람(예를 들면, 설치류, 예를 들면, 마우스 또는 래트) 불변 영역을 포함하는 T 세포 수용체를 발현하는 유전자 변형된 비-사람 동물(예를 들면, 설치류, 예를 들면, 마우스 또는 래트)의 제조 방법을 제공하는 것으로, 상기 방법은 제1 비-사람 동물에서 내인성 비-사람 TCR α 가변 유전자좌를 하나 이상의 사람 V α 분절 및 하나 이상의 사람 J α 분절을 포함하는 재배열되지 않은 사람화된 TCR α 가변 유전자좌로 대체하고, 상기 사람화된 TCR α 가변 유전자좌가 내인성 TCR α 불변 영역에 작동가능하게 연결되어 있고; 제2 비-사람 동물에서 내인성 비-사람 TCR β 가변 유전자좌를 하나 이상의 사람 V β 분절, 하나 이상의 사람 D β 분절 및 하나 이상의 사람 J β 분절을 포함하는 재배열되지 않은 사람화된 TCR β 가변 유전자좌로 대체하고, 상기 사람화된 TCR β 가변 유전자좌가 내인성 TCR β 불변 영역에 작동가능하게 연결되어 있고; 상기 제1 비-사람 동물과 상기 제2 비-사람 동물을 교배하여 사람 가변 영역 및 비-사람 불변 영역을 포함하는 T 세포 수용체를 발현하는 비-사람 동물을 수득함을 포함한다. 다른 실시형태에서, 본 발명은 게놈이 사람화된 재배열되지 않은 TCR α 유전자좌를 포함하는 유전자 변형된 비-사람 동물의 제조 방법을 제공하거나, 게놈이 본원에 개시된 방법에 따라 생산된 사람화된 재배열되지 않은 TCR β 유전자좌를 포함하는 비-사람 동물을 제공한다. 각종 실시형태에서, 대체은 내인성 유전자좌에서 이루어진다. 일부 실시형태에서, 상기 방법은 VELOCIGENE® 기술을 사용하여 제조된 하나 이상의 표적화 작제물을 이용하는데, 이는 실시예에 개시된 바와 같이 상기 작제물을 ES 세포에 도입하고, VELOCIMOUSE® 기술을 사용하여 표적화된 ES 세포 클론을 마우스 배아에 도입한다. 일부 실시형태에서, 상기 ES 세포는 129와 C57BL/6 품종의 혼합체인 마우스로부터 유도된다. 각종 실시형태에서, 상기 방법은 진행성 사람화 전략을 포함하는데, 이는 추가의 가변 영역 분절을 포함하는 작제물을 사람화의 각각의 후속 단계에서 ES 세포에 도입하여, 결국 사람 가변 영역 분절들의 완전한 레퍼토리를 포함하는 마우스를 생산하는 것이다(도 3 및 7 참조).

[0112] 따라서, 본 발명은 또한 본원에 개시된 유전자 조작된 비-사람 동물을 생산하는데 사용된 뉴클레오타이드 작제물을 제공한다. 하나의 양상에서, 상기 뉴클레오타이드 작제물은 5' 및 3' 상동성 아암, 사람 TCR 가변 영역 유전자 분절을 포함하는 사람 DNA 단편 및 재조합 부위에 의해 둘러싸인 선별 카세트를 포함한다. 하나의 실시형태에서, 상기 사람 DNA 단편은 TCR α 유전자 단편이고, 이는 하나 이상의 사람 TCR α 가변 영역 분절을 포함한다. 또 다른 실시형태에서, 상기 사람 DNA 단편은 TCR β 유전자 단편이고, 이는 하나 이상의 사람 TCR β 가변 영역 분절을 포함한다. 하나의 양상에서, 하나 이상의 상동성 아암은 비-사람 상동성 아암이고, 이는 비-사람 TCR 유전자좌(예를 들면, 비-사람 TCR α 또는 TCR β 유전자좌)에 대해 상동성이다.

[0113] 선별 카세트는 목적하는 작제물을 통합하는 세포(예를 들면, ES 세포)의 선택을 용이하게 하기 위해 표적화 작제물에 삽입된 뉴클레오타이드 서열이다. 다수의 적합한 선별 카세트는 당업계에 공지되어 있다. 일반적으로, 선별 카세트는 특정 항생제(예를 들면, Neo, Hyg, Pur, CM, Spec 등)의 존재하에 양성 선택을 가능하게 한다. 추가로, 선별 카세트는 재조합 효소 처리시 선별 카세트의 결실을 가능하게 하는 재조합 부위에 의해 인접할 수 있다. 일반적으로 사용되는 재조합 부위는 Cre 및 Flp 효소에 의해 각각 인식되는 *loxP* 및 *Frt*이지만, 다른 것들도 당업계에 공지되어 있다.

[0114] 하나의 실시형태에서, 선별 카세트는 사람 DNA 단편의 5' 말단에 위치된다. 또 다른 실시형태에서, 선별 카세트는 사람 DNA 단편의 3' 말단에 위치된다. 또 다른 실시형태에서, 선별 카세트는 사람 DNA 단편 내에, 예를 들면, 사람 인트론 내에 위치된다. 또 다른 실시형태에서, 선별 카세트는 사람과 마우스 DNA 단편의 접합부에 위치된다.

[0115] 유전자 조작된 비-사람 동물의 생산을 위한 표적화 전략, 작제물 및 이를 위해 사용되는 표적화 벡터의 각종 실시형태에 대한 예는 도 3, 4, 5, 7 및 8에 제시되어 있다.

[0116] 유전자 표적화가 완료되면, ES 세포 또는 유전자 변형된 비-사람 동물을 선별하여 목적하는 외인성 뉴클레오타이드 서열의 성공적인 혼입 또는 외인성 폴리펩타이드(예를 들면, 사람 TCR 가변 영역 분절)의 발현을 확인한다. 다수의 기술은 당업자에게 공지되어 있으며, 서던 블로팅(Southern blotting), 롱 PCR(long PCR), 정량적 PCT(예를 들면, TAQMAN®을 사용하는 실시간 PCR), 제자리 형광 혼성화(fluorescence *in situ* hybridization), 노던 블로팅(Northern blotting), 유동 세포측정법, 웨스턴 분석(Western analysis), 면역세포화학법, 면역조직화학법 등을 포함한다(이에 한정되지 않음). 하나의 예에서, 목적하는 유전자 변형을 갖는

비-사람 동물(예를 들면, 마우스)은 문헌[참조: Valenzuela et al., (2003) High-throughput engineering of the mouse genome coupled with high-resolution expression analysis, Nature Biotech. 21(6): 652-659]에 개시된 대립유전자 검정법의 변형을 사용하여 마우스 대립유전자의 소실 및/또는 사람 대립유전자의 획득에 대해 선별함으로써 확인될 수 있다. 유전자 변형된 동물에서 특이적인 뉴클레오타이드 또는 아미노산 서열을 확인하는 다른 검정법은 당업자에게 공지되어 있다.

[0117] 본 개시내용은 또한 본원에 개시된 사람화된 TCR 단백질을 발현하기 위한 비-사람 동물의 TCR 가변 유전자좌(예를 들면, TCR α , TCR β , TCR δ 및/또는 TCR γ 유전자좌)의 변형방법을 제공한다. 하나의 실시형태에서, 본 발명은, T 세포의 표면 상에서, 사람화된 TCR 단백질을 발현하기 위한 TCR 가변 유전자의 변형방법을 제공하는 것으로, 상기 방법은 비-사람 동물에서 내인성 비-사람 TCR 가변 유전자좌를 재배열되지 않은 사람화된 TCR 가변 유전자좌로 대체함을 포함한다. TCR 가변 유전자좌가 TCR α 가변 유전자좌인 하나의 실시형태에서, 상기 재배열되지 않은 사람화된 TCR 가변 유전자좌는 하나 이상의 사람 V α 분절 및 하나 이상의 사람 J α 분절을 포함한다. 상기 TCR 가변 유전자좌가 TCR β 가변 유전자좌인 하나의 실시형태에서, 상기 재배열되지 않은 사람화된 TCR 가변 유전자좌는 하나 이상의 사람 V β 분절, 하나 이상의 사람 D β 분절 및 하나 이상의 사람 J β 분절을 포함한다. 각종 양상에서, 상기 재배열되지 않은 사람화된 TCR 가변 유전자좌는 상응하는 내인성 비-사람 TCR 불변 영역에 작동가능하게 연결되어 있다.

[0118] 본 발명은 또한 본원에 개시된 바와 같은 비-사람 동물(예를 들면, 설치류, 예를 들면, 마우스 또는 래트)에 의해 제조된 사람화된 TCR 단백질을 제공하는 것으로, 상기 사람화된 TCR 단백질은 사람 가변 영역 및 비-사람 불변 영역을 포함한다. 따라서, 상기 사람화된 TCR 단백질은 가변 도메인에서의 사람 상보성 결정 영역(즉, 사람 CDR1, 2 및 3) 및 비-사람 불변 영역을 포함한다.

[0119] 비록 하기의 실시예는 게놈이 사람화된 TCR α 및/또는 사람화된 TCR β 가변 유전자좌를 포함하는 유전자 조작된 비-사람 동물을 설명하지만, 당업자는 게놈이 사람화된 TCR δ 및/또는 TCR γ 가변 유전자좌를 포함하는 유전자 조작된 동물을 생산하기 위해 유사한 전략이 사용될 수 있음을 이해할 것이다. 본 발명은 또한 모두 4개의 TCR 가변 유전자좌의 사람화를 갖는 유전자 조작된 비-사람 동물을 제공한다.

[0120] **유전자 변형된 TCR 동물의 용도**

[0121] 각종 실시형태에서, 본 발명의 유전자 변형된 비-사람 동물은, T 세포의 표면 상에서, 사람화된 TCR 분자를 갖는 T 세포를 생산하고, 결과로서 사람 유사 방식으로 MHC 복합체에 의해 그들에게 제시된 폴리펩타이드를 인식할 것이다. 본원에 개시된 유전자 변형된 비-사람 동물은 사람 T 세포의 발달 및 기능 및 면역 내성의 과정을 연구하기 위해, 사람 백신 후보를 시험하기 위해, TCR 유전자 요법에 대해 특정한 특이성을 갖는 TCR을 생산하기 위해, 질병 관련 항원(예를 들면, 종양 관련 항원(Tumor Associated Antigen: TAA)에 대한 TCR 라이브러리를 생성하기 위해 사용될 수 있다.

[0122] T 세포(예를 들면, 세포독성 T 세포)는 목적하는 항원, 예를 들면, 바이러스성 항원, 세균성 항원, 종양 항원 등 또는 이를 제시하는 세포를 공격하고 파괴하도록 유도될 수 있기 때문에, 당업계에서 T 세포 요법이 관심이 증대하고 있다. 암 T 세포 요법에서의 초기 연구는 종양 세포 덩어리로부터의 종양 침윤 림프구(Tumor Infiltrating Lymphocyte: TIL; 종양 항원에 대하여 반응성인 T 세포를 포함하는 것으로 가정하는 종양 덩어리에서의 림프구 집단)를 분리하고, T 세포 성장 인자를 사용하여 이를 시험관내에서 확장시키고, 입양 T 세포 전이라 불리는 과정에서 환자에게 이를 다시 이식하는 것을 목표로 하였다[참조: Restifo et al., (2012) Adoptive immunotherapy for cancer: harnessing the T cell response, Nature Reviews 12: 269-81; 및 Linnemann et al., (2011) T-Cell Receptor Gene Therapy: Critical Parameters for Clinical Success, J. Invest. Dermatol. 131: 1806-1816]. 그러나, 이러한 요법의 성공은 지금까지 흑색종 및 신장 세포 암종에 한정되었고, TIL 입양 전이는 규정된 종양 관련 항원(TAA)에 관한 것이 명확히 아니다[참조: Linnemann et al., (2011) T-Cell Receptor Gene Therapy: Critical Parameters for Clinical Success, J. Invest. Dermatol. 131: 1806-1816].

[0123] T 세포가, 목적하는 항원, 예를 들면, TAA를 표적화하기 위해 선택되거나 프로그래밍된 TCR 유전자 요법을 개시하기 위한 시도가 이루어졌다. 현행 TCR 유전자 요법은 특이적인 항원, 예를 들면, 종양 관련 항원에 관한 TCR의 서열의 확인에 의존한다. 예를 들면, Rosenberg 및 동료들은 흑색종 관련 항원 MART-1 에피토프에 대해 특이적인 TCR α 및 TCR β 쇄를 암호화하는 유전자를 갖는 흑색종 환자로부터 유도된 말초 혈액 림프구를 형질 도입하고 입양 T 세포 요법을 위해 생성된 확장된 림프구를 사용한 몇 개의 연구를 공개하였다[참조: Johnson et al., (2009) Gene therapy with human and mouse T-cell receptors mediates cancer regression and targets

normal tissues expressing cognate antigen, Blood 114: 535-546; 및 Morgan et al., (2006) Cancer Regression in Patients After Transfer of Genetically Engineered Lymphocytes, Science 314: 126-129]. 상기 MART-1 특이적인 TCR은 TIL 요법에 따른 종양 발현을 경험한 환자로부터 분리되었다. 그러나, 이러한 TCR, 특히 고결합성 TCR(치료에 가장 유용할 것 같음)의 확인은 대부분의 종양 항원이 자가 항원이고 이들 항원을 표적화하는 TCR이 종종 삭제되거나 주로 면역 내성으로 인해 자신의 친화력을 갖는다는 사실에 의해 복잡하다.

[0124] 각종 실시형태에서, 본 발명은 재배열되지 않은 사람 TCR 가변 유전자좌를 게놈에 포함하는 유전자 조작된 비-사람 동물을 제공함으로써 이러한 문제점을 해결한다. 본원에 개시된 비-사람 동물은 사람화된 T 세포 수용체의 다양한 레퍼토리를 갖는 T 세포를 생산할 수 있다. 따라서, 본원에 개시된 비-사람 동물은 사람화된 T 세포 수용체, 예를 들면, 입양 T 세포 전이에 사용하기 위한 고결합성 사람화된 T 세포 수용체의 다양한 레퍼토리의 공급원일 수 있다.

[0125] 따라서, 하나의 실시형태에서, 본 발명은 사람 항원에 대한 T 세포 수용체의 제조 방법을 제공하는 것으로, 상기 제조 방법은 본원에 개시된 비-사람 동물(예를 들면, 설치류, 예를 들면, 마우스 또는 래트)을 목적하는 항원으로 면역시키고, 상기 동물이 면역 반응을 개시하게 하고, 상기 목적하는 항원에 대한 특이성을 갖는 활성화 T 세포를 상기 동물로부터 분리하고, 상기 항원 특이적 T 세포에 의해 발현된 T 세포 수용체의 핵산 서열을 결정함을 포함한다.

[0126] 하나의 실시형태에서, 본 발명은 목적하는 항원에 대해 특이적인 사람 T 세포 수용체의 제조 방법을 제공하는 것으로, 상기 제조 방법은 본원에 개시된 비-사람 동물(예를 들면, 설치류, 예를 들면, 마우스 또는 래트)을 목적하는 항원으로 면역시키고; 상기 동물이 면역 반응을 개시하게 하고; 상기 목적하는 항원에 대해 반응성인 T 세포를 상기 동물로부터 분리하고; 상기 T 세포에 의해 발현된 사람 TCR 가변 영역의 핵산 서열을 결정하고; 상기 사람 TCR 가변 영역을 사람 TCR 불변 영역의 핵산 서열을 포함하는 뉴클레오타이드 작제물에 클로닝하여 상기 사람 TCR 가변 영역이 상기 사람 TCR 불변 영역에 작동가능하게 연결되어 있도록 하고; 상기 작제물로부터 상기 목적하는 항체에 대해 특이적인 사람 T 세포 수용체를 발현시킴을 포함한다. 하나의 실시형태에서, T 세포를 분리하는 단계, 상기 T 세포에 의해 발현된 사람 TCR 가변 영역의 핵산 서열을 결정하는 단계, 상기 사람 TCR 가변 영역을 사람 TCR 불변 영역의 핵산 서열을 포함하는 뉴클레오타이드 작제물에 클로닝하는 단계, 및 사람 T 세포 수용체를 발현시키는 단계는 당업자에게 공지된 표준 기술을 사용하여 수행된다.

[0127] 하나의 실시형태에서, 목적하는 항원에 대해 특이적인 T 세포 수용체를 암호화하는 핵산 서열은 세포에서 발현된다. 하나의 실시형태에서, TCR을 발현하는 세포는 CHO, COS, 293, HeLa, PERC.6™ 세포 등으로부터 선택된다.

[0128] 목적하는 항원은 질병 또는 병태를 일으키거나 이와 관련되는 것으로 공지되어 있는 임의의 항원, 예를 들면, 종양 관련 항원, 바이러스성, 세균성 또는 기타 병원성 기원의 항원 등일 수 있다. 다수의 종양 관련 항원은 당업계에 공지되어 있다. 종양 관련 항원의 선택은 암 면역력(A Journal of the Cancer Research Institute) 펩타이드 데이터베이스 (archive.cancerimmunity.org/peptidedatabase/Tcellepitopes.htm)에 제시되어 있다. 본 발명의 일부 실시형태에서, 목적하는 항원은 사람 항원, 예를 들면, 사람 종양 관련 항원이다. 일부 실시형태에서, 상기 항원은 세포 유형-특이적인 세포내 항원이고, T 세포 수용체는 상기 항원을 발현하는 세포를 사멸하기 위해 사용된다.

[0129] 하나의 실시형태에서, 본 발명은 목적하는 항원, 예를 들면, 종양 관련 항원에 대하여 특이성을 갖는 T 세포의 동정방법을 제공하는 것으로, 상기 동정방법은 본원에 개시된 비-사람 동물을 목적하는 항원으로 면역시키고, 상기 동물이 면역 반응을 개시하게 하고, 상기 항원에 대해 특이성을 갖는 T 세포를 상기 비-사람 동물로부터 분리함을 포함한다.

[0130] 본 발명은 입양 T 세포 요법에 대한 신규한 방법을 제공한다. 따라서, 본 발명은 피험자(예를 들면, 포유동물 피험자, 예를 들면, 사람 피험자)에서 질병 또는 병태(예를 들면, 암)를 치료하거나 개선하는 방법을 제공하는 것으로, 상기 방법은 본원에 개시된 비-사람 동물을 질병 또는 병태와 관련된 항원으로 면역시키고, 상기 동물이 면역 반응을 개시하게 하고, 상기 항원-특이적인 T 세포의 집단을 상기 동물로부터 분리하고, 분리된 항원-특이적인 T 세포를 피험자에게 주입함을 포함한다. 하나의 실시형태에서, 본 발명은 사람 피험자에서 질병 또는 병태를 치료하거나 개선하는 방법을 제공하는 것으로, 상기 방법은 본원에 개시된 비-사람 동물을 목적하는 항원(예를 들면, 질병 또는 병태 관련 항원, 예를 들면, 종양 관련 항원)으로 면역시키고, 상기 동물이 면역 반응을 개시하게 하고, 항원-특이적인 T 세포의 집단을 상기 동물로부터 분리하고, 상기 항원-특이적인 T 세포에

의해 발현된 T 세포 수용체의 핵산 서열을 결정하고, 상기 T 세포 수용체의 핵산 서열을 발현 벡터(예를 들면, 레트로바이러스 벡터)에 클로닝하고, 상기 벡터를 상기 피험자로부터 유도된 T 세포에 도입하여 상기 T 세포가 상기 항원-특이적인 T 세포 수용체를 발현하도록 하고, 상기 T 세포를 피험자에게 주입함을 포함한다. 하나의 실시형태에서, 상기 T 세포 수용체 핵산 서열은 피험자로부터 유도된 T 세포에 도입하기 전에 추가로 사람화되는데, 예를 들면, 상기 비-사람 불변 영역을 암호화하는 서열을 변형하여 사람 TCR 불변 영역(예를 들면, 비-사람 불변 영역을 사람 불변 영역으로 대체함)과 더욱 유사하도록 한다. 일부 실시형태에서, 상기 질병 또는 병태는 암이다. 일부 실시형태에서, 항원-특이적인 T 세포 집단은 피험자에 주입하기 전에 확장된다. 일부 실시형태에서, 피험자의 면역 세포 집단은 항원-특이적인 T 세포의 주입 전에 면역고갈된다. 일부 실시형태에서, 상기 항원-특이적인 TCR은 고결합성 TCR, 예를 들면, 종양 관련 항원에 대한 고결합성 TCR이다. 일부 실시형태에서, 상기 T 세포는 세포독성 T 세포이다. 다른 실시형태에서, 상기 질병 또는 병태는 바이러스 또는 세균에 의해 발생된다.

[0131] 또 다른 실시형태에서, 질병 또는 병태는 자가면역 질병이다. T_{REG} 세포는 자가 항원에 대한 내성을 유지하고 병리학적 자가 반응성을 방지하는 T 세포의 소집단이다. 따라서, 본 발명은 또한 본원에 개시된 본 발명의 비-사람 동물에서 항원-특이적인 T_{REG} 세포의 생산에 의존하는 자가면역 질병의 치료방법을 제공한다.

[0132] 본 발명은 또한 피험자에서 질병 또는 병태(예를 들면, 암)를 치료하거나 개선하는 방법을 제공하는 것으로, 상기 방법은 피험자로부터 질환 또는 병태(예를 들면, 암 세포)에 의해 영향을 받은 세포를 비-사람 동물에 도입하고, 상기 동물이 상기 세포에 대한 면역 반응을 개시하게 하고, 상기 세포에 대하여 반응성인 T 세포의 집단을 상기 동물로부터 분리하고, 상기 T 세포에 의해 발현된 T 세포 수용체의 핵산 서열을 결정하고, 상기 T 세포 수용체 서열을 벡터에 클로닝하고, 상기 벡터를 상기 피험자로부터 유도된 T 세포에 도입하고, 상기 T 세포 수용체를 포함하는 상기 피험자의 T 세포를 상기 피험자에게 주입함을 포함한다.

[0133] 본 발명은 또한 사람 TCR 가변 도메인(예를 들면, TCR α 및/또는 TCR β 가변 도메인)을 암호화하는 핵산 서열을 제조하기 위한 본원에 개시된 바와 같은 비-사람 동물의 용도를 제공한다. 하나의 실시형태에서, 본 발명은 사람 TCR 가변 도메인을 암호화하는 핵산 서열의 제조방법을 제공하는 것으로, 상기 제조방법은 본원에 개시된 바와 같은 비-사람 동물을 목적하는 항원으로 면역시키고, 상기 비-사람 동물이 상기 목적하는 항원에 대한 면역 반응을 개시하게 하고, 이로부터 상기 목적하는 항원에 결합하는 사람 TCR 가변 도메인을 암호화하는 핵산 서열을 수득함을 포함한다. 하나의 실시형태에서, 상기 방법은 본원에 개시된 비-사람 동물로부터 T 세포를 분리하고, 이로부터 TCR 불변 영역에 작동가능하게 연결되어 있는 TCR 가변 도메인을 암호화하는 핵산 서열을 수득함을 포함하는, 비-사람 TCR 불변 영역에 작동가능하게 연결되어 있는 사람 TCR 가변 도메인을 암호화하는 핵산 서열을 제조함을 추가로 포함한다.

[0134] 본 발명은 또한 사람 치료제를 제조하기 위한 본원에 개시된 바와 같은 비-사람 동물의 용도를 제공하는 것으로, 이는 상기 비-사람 동물을 목적하는 항원(예를 들면, 종양 관련 항원)으로 면역시키고, 상기 비-사람 동물이 면역 반응을 개시하게 하고, 상기 동물로부터 상기 목적하는 항원에 대해 반응성인 T 세포를 수득하고, 상기 T 세포로부터 상기 목적하는 항원에 결합하는 사람화된 TCR 단백질을 암호화하는 핵산 서열을 수득하고, 상기 사람화된 TCR 단백질을 암호화하는 핵산 서열을 사람 치료제에 사용함을 포함한다.

[0135] 따라서, 본 발명은 또한 사람 치료제의 제조방법을 제공하는 것으로, 상기 제조방법은 본원에 개시된 바와 같은 비-사람 동물을 목적하는 항원으로 면역시키고, 상기 비-사람 동물이 면역 반응을 개시하게 하고, 상기 동물로부터 상기 목적하는 항원에 대해 반응성인 T 세포를 수득하고, 상기 T 세포로부터 상기 목적하는 항원에 결합하는 사람화된 T 세포 수용체를 암호화하는 핵산 서열을 수득하고, 상기 사람화된 T 세포 수용체를 사람 치료제에 사용함을 포함한다.

[0136] 하나의 실시형태에서, 상기 사람 치료제는 목적하는 핵산 서열(예를 들면, 목적하는 핵산으로 형질감염되거나 형질도입되거나 도입됨)을 포함하는 T 세포(예를 들면, 사람 T 세포, 예를 들면, 사람 피험자로부터 유도된 T 세포)이고, 이는 T 세포가, 목적하는 항원에 대한 친화력을 갖는 사람화된 TCR 단백질을 발현하도록 한다. 하나의 양상에서, 치료제가 사용되는 피험자는 특정한 질병 또는 병태에 대한 치료가 필요하고, 상기 항원은 상기 질병 또는 병태와 관련된다. 하나의 양상에서, 상기 T 세포는 세포독성 T 세포이고, 상기 항원은 종양 관련 항원이고, 상기 질환 또는 병태는 암이다. 하나의 양상에서, 상기 T 세포는 피험자로부터 유도된다.

[0137] 또 다른 실시형태에서, 상기 사람 치료제는 T 세포 수용체이다. 하나의 실시형태에서, 상기 치료 수용체는 가용성 T 세포 수용체이다. 치료제로 사용하기 위한 가용성 T 세포 수용체 또는 TCR 가변 영역을 생산하기 위해

수많은 노력을 쏟았다. 가용성 T 세포 수용체의 생산은 재배열된 TCR 가변 영역을 수득하는데 좌우된다. 하나의 접근법은 TCR α 및 TCR β 를 포함하는 단일쇄 TCR을 설계하고, scFv 면역글로불린 형식과 유사하게, 링커를 통해 함께 이들을 융합하는 것이다(국제공개공보 제WO 2011/044186호 참조). 생성된 scTv는 scFv와 유사하지만 열에 안정한 가용성 형태의 TCR α/β 결합 단백질을 제공한다. 대체 접근법은 TCR β 불변 도메인을 갖는 가용성 TCR을 설계하고[참조: Chung et al., (1994) Functional three-domain single-chain T-cell receptors, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 91: 12654-12658], 비-원래의 이황화 결합을 조작하여 TCR 불변 도메인 사이에 게재시키는 것[참조: Boulter and Jakobsen, (2005) Stable, soluble, high-affinity, engineered T cell receptors: novel antibody-like proteins for specific targeting of peptide antigens, Clinical and Experimental Immunology 142: 454-460; 및 미국 특허 제US 7,569,664호]을 포함한다. 가용성 T 세포 수용체의 다른 형식은 설명되어 있다. 본원에 개시된 비-사람 동물은 목적하는 항원에 고친화력으로 결합하는 T 세포 수용체의 서열을 결정하고, 이어서 상기 서열에 기초하여 가용성 T 세포 수용체를 설계하기 위해 사용될 수 있다.

[0138] 상기 비-사람 동물에 의해 발현된 TCR 수용체 서열로부터 유도된 가용성 T 세포 수용체는 목적하는 단백질, 예를 들면, 바이러스성, 세균성 또는 종양 관련 단백질의 기능을 차단하기 위해 사용될 수 있다. 대안적으로, 가용성 T 세포 수용체는 감염 또는 암 세포, 예를 들면, 세포독성 분자(예를 들면, 화학치료제), 독소, 방사성 핵종, 프로드럭, 항체 등을 사멸시킬 수 있는 간기에 융합될 수 있다. 가용성 T 세포 수용체는 또한 면역조절 분자, 예를 들면, 사이토카인, 케모카인 등에 융합될 수 있다. 가용성 T 세포 수용체는 또한 면역억제 분자, 예를 들면, T 세포에 의해 인식된 항원을 포함하는 다른 세포를 T 세포가 사멸시키는 것을 억제하는 분자에 융합될 수 있다. 면역억제 분자에 융합된 이러한 가용성 T 세포 수용체는, 예를 들면, 자가면역을 차단하는데 사용될 수 있다. 가용성 T 세포 수용체에 융합될 수 있는 각종 면역억제 분자의 예는 본원에 인용에 의해 포함되는 문헌[참조: Ravetch and Lanier, (2000) Immune Inhibitory Receptors, Science 290: 84-89]에서 검토된다.

[0139] 본 발명은 또한 사람 TCR 재배열, T 세포 발달, T 세포 활성화, 면역 내성 등을 포함한 사람 TCR과 관련한 면역 반응을 연구하기 위한 방법을 제공한다.

[0140] 본 발명은 또한 백신 후보의 시험방법을 제공한다. 하나의 실시형태에서, 본 발명은 백신이 면역 반응(예를 들면, T 세포 증식, 사이토카인 방출 등)을 활성화시키는지와 효과기 및 기억 T 세포(예를 들면, 중심 기억 T 세포 및 효과기 기억 T 세포)의 생산을 유도하는지를 결정하는 방법을 제공한다.

[0141] **실시예**

[0142] 본 발명은 하기 비제한적 실시예에 의해 추가로 설명될 것이다. 이들 실시예는 본 발명의 이해를 돕기 위해 제시되는 것이지만, 임의의 방식으로 본 발명의 범위를 제한하는 것으로 의도되는 것은 아니고, 임의의 방식으로 본 발명의 범위를 제한하는 것으로 해석되지 않아야 한다. 실시예는 당업자에게 널리 공지되어 있는 통상의 방법(분자 클로닝 기술 등)에 대한 상세한 설명을 포함하지 않는다. 달리 명시되지 않는다면, 부는 중량부이고, 분자량은 평균 분자량이고, 온도는 섭씨로 표시되며, 압력은 대기압 또는 대기압 근처이다.

[0143] **실시예 1. 사람화된 TCR 가변 유전자좌를 갖는 마우스의 생산**

[0144] 내인성 TCR(α 또는 β) 가변 유전자좌의 결실 및 내인성 V와 J, 또는 V와 D와 J 분절의 대체를 포함하는 마우스는, VELOCIGENE® 유전자 조작 기술[참조: 미국 특허 제US 6,586,251호; 및 Valenzuela, D.M., et al., (2003) High-throughput engineering of the mouse genome coupled with high-resolution expression analysis. Nat. Biotech. 21(6): 652-659]을 사용하여 제조되며, 여기서, 세균성 상동성 재조합을 사용하여 BAC 라이브러리로부터 유도된 사람 서열은, 마우스 ES 세포에서의 내인성 마우스 TCR 가변 유전자좌에 대하여 거대 표적화 벡터(LTVEC)를 표적화하는 표적화 아암에 의해 플랭킹된 사람 TCR 가변 유전자좌의 게놈 단편을 포함하는 LTVEC를 제조하기 위해 사용된다. LTVEC는 문헌[참조: Valenzuela et al.]에 따라 마우스 ES 세포주로 선형화되고 전기천공된다. ES 세포를 하이그로마이신 또는 네오마이신 내성에 대해 선택하고, 마우스 대립유전자좌의 소실 또는 사람 대립유전자좌의 획득에 대해 선별한다.

[0145] 표적화된 ES 세포 클론을 8-세포 단계(또는 조기) 마우스 배아에 VELOCIMOUSE® 방법[참조: Poueymirou, W.T. et al. (2007). F0 generation mice fully derived from gene-targeted embryonic stem cells allowing immediate phenotypic analyses. Nat. Biotech. 25: 91-99]에 의해 도입한다. 대립유전자 검정법의 변형[참조: Valenzuela et al.]을 사용하여 내인성 TCR 가변 대립유전자좌의 소실 및 사람 대립유전자좌의 획득에 대해 선별함으로써, 사람화된 TCR 유전자좌를 지닌 VELOCIMICE®(공여자 ES 세포로부터 완전히 유도된 F0 마우스

스)를 확인한다. F0 새끼들을 유전자형으로 하고 동형접합성으로 번식시킨다. 사람 TCR α 및/또는 TCR β 가변 유전자좌에 대한 동형접합성 마우스(예를 들면, 사람 TCR α 및/또는 TCR β 가변 분절의 아집단을 포함함)를 제조하고 본원에 개시된 바와 같이 표현형으로 한다.

[0146] 모든 마우스를 우리에 가두고 Regeneron Pharmaceuticals의 특정 무-병원체 시설에서 번식시켰다. 모든 동물 실험은 IACUC 및 Regeneron Pharmaceuticals에 의해 승인되었다.

[0147] **실시예 2. TCR α 가변 유전자좌의 진행성 사람화**

[0148] 도 2 및 도 3에서 요약된 진행성 사람화 전략을 사용하여, 110V 및 60J의 마우스 분절에 상응하는 마우스 TCR α 유전자좌에서 1.5메가염기의 DNA를, 사람 TCR α의 54V 및 61J의 분절에 상응하는 1메가염기의 DNA로 대체하였다. TCR α 유전자좌의 진행성 사람화 전략에 사용되는 각종 표적화 벡터의 접합부 핵산 서열은 표 2에 요약되어 있고, 서열 목록에 포함되어 있다.

표 2

각종 TCR α 유전자좌 표적화 벡터에 대한 접합부 핵산 서열

MAID 번호	서열 번호	설명
1626	1	TCR α 가변 유전자좌의 마우스 서열 상류의 3' 말단과 <i>loxP-Ub-Hyg-loxP</i> 카세트의 5' 말단 사이의 접합부 핵산 서열
	2	AsiSI 부위를 포함하는, <i>loxP-Ub-Hyg-loxP</i> 카세트의 3' 말단과 사람 TCRV α 40-TCRV α 41-TCRJ α 1 삽입부의 5' 말단 사이의 접합부 핵산 서열
	3	NotI 부위를 포함하는, 사람 TCRV α 40-TCRV α 41-TCRJ α 1 삽입부의 3' 말단과 사람 TCR α 가변 유전자좌의 마우스 서열 하류의 5' 말단 사이의 접합부 핵산 서열
1767	4	TCR α 가변 유전자좌의 마우스 서열 상류의 3' 말단과 <i>loxP-Ub-Neo-loxP</i> 카세트의 5' 말단 사이의 접합부 핵산 서열
	5	AsiSI 부위를 포함하는, <i>loxP-Ub-Neo-loxP</i> 카세트의 3' 말단과 사람 TCRV α 35-TCRV α 39 삽입부의 5' 말단 사이의 접합부 핵산 서열
1979	6	TCR α 가변 유전자좌의 마우스 서열 상류의 3' 말단과 <i>frt-Pgk-Hyg-frt</i> 카세트의 5' 말단 사이의 접합부 핵산 서열
	7	AsiSI 부위를 포함하는, <i>frt-Pgk-Hyg-frt</i> 카세트의 3' 말단과 사람 TCRV α 22-TCRV α 34 삽입부의 3' 말단 사이의 접합부 핵산 서열
1769	8	TCR α 가변 유전자좌의 마우스 서열 상류의 3' 말단과 <i>loxP-Ub-Neo-loxP</i> 카세트의 5' 말단 사이의 접합부 핵산 서열
	9	AsiSI 부위를 포함하는, <i>loxP-Ub-Neo-loxP</i> 카세트의 3' 말단과 사람 TCRV α 13-2-TCRV α 21 삽입부의 5' 말단 사이의 접합부 핵산 서열
1770	10	TCR α 가변 유전자좌의 마우스 서열 상류의 3' 말단과 <i>loxP-Ub-Hyg-loxP</i> 카세트의 5' 말단 사이의 접합부 핵산 서열
	11	AsiSI 부위를 포함하는, <i>loxP-Ub-Hyg-loxP</i> 카세트의 3' 말단과 사람 TCRV α 6-TCRV α 8-5 삽입부의 5' 말단 사이의 접합부 핵산 서열
1771	12	TCR α 가변 유전자좌의 마우스 서열 상류의 3' 말단과 <i>loxP-Ub-Neo-loxP</i> 카세트의 5' 말단 사이의 접합부 핵산 서열
	13	AsiSI 부위를 포함하는, <i>loxP-Ub-Neo-loxP</i> 카세트의 3' 말단과 사람 TCRV α 1-1-TCRV α 5 삽입부의 5' 말단 사이의 접합부 핵산 서열

[0149]

[0150] 사람 TCR α 가변 영역 분절은 IMGT 데이터베이스에서와 같이 번호를 매겼다. 각각의 접합부에서의 100bp 이상(각각의 말단으로부터 약 50bp)은 서열 목록에 포함되어 있다.

[0151] 구체적으로, 도 4a에서 입증된 바와 같이, 마우스 BAC 클론 RP23-6A14(인비트로젠)으로부터의 DNA를 상동성 재조합으로 변형시켰고, 표적화 벡터(MAID 1539)로서 사용하여 내인성 마우스 TCR α 유전자좌의 TCRAJ1-TCRAJ28 영역을 Ub-하이그로마이신 카세트로 대체하고, 이어서 *loxP* 부위로 대체하였다. 마우스 BAC 클론 RP23-117i19(인비트로젠)로부터의 DNA를 상동성 재조합에 의해 변형시켰고, 표적화 벡터(MAID 1535)로서 사용하여 내인성 마우스 TCR α 및 TCR δ 유전자좌의 TCRAV1을 둘러싸는(및 포함하는) 약 15kb의 영역을 PGK-네오마이신 카세트로 대체하고, 이어서 *loxP* 부위로 대체하였다. 이중 표적화된 염색체(즉, 2개의 표적화 벡터로 표적화된 단일 내인성 마우스 TCR α 유전자좌)를 지닌 ES 세포를, 당업계에서 공지되어 있는 핵형분석 및 선별 방법(예를 들면, TAQMAN™)으로 확인하였다. 변형된 ES 세포를 CRE 재조합효소로 처리하였고, 이로써 2개의 *loxP* 부위 사이의 영역(즉, TCRAV1 내지 TCRAJ1의 내인성 마우스 TCR α 유전자좌로 이루어진 영역)의 결실을 매개하고, 단일 *loxP* 부위, 네오마이신 카세트 및 마우스 불변 및 인헨서 영역만을 남겨 두었다. 이러한 전략에 의해 결실된

마우스 TCR α / δ 유전자좌(MAID 1540)를 생성하였다.

- [0152] TCR α에 대한 제1 사람 표적화 벡터는 2개의 제1 연속 사람 TCR αV 유전자 분절(TRAV40 & 41) 및 61개의 TCR α J(50개의 기능성) 유전자 분절을 함유한 CTD2216p1 및 CTD2285m07 BAC 클론(인비트로젠)으로부터의 191,660bp의 사람 DNA를 가졌다. 이러한 BAC를 상동성 재조합에 의해 변형시켜 3' 마우스 상동성 아암의 연결을 위한 TCR αJ1 유전자 분절의 Not1 부위 403bp 하류(3') 및 5' 마우스 상동성 아암의 연결을 위한 5' AsiSI 부위를 함유하도록 한다. 이러한 사람 단편에 대한 연결을 위해 2개의 상이한 상동성 아암을 사용하였다: RP23-6A14 BAC 클론으로부터의 내인성 마우스 TCR α 서열을 함유하는 3' 상동성 아암 및 마우스 BAC 클론 RP23-117i19로부터의 마우스 TCR αV의 내인성 TCR α 서열 5'를 함유하는 5' 상동성 아암. 이러한 마우스-사람 키메라 BAC를 마우스 TCR α 유전자좌에서의 사람 TCR α 유전자 분절 및 상류 *loxP*-ub-하이그로마이신-*loxP* 카세트의 초기 삽입부를 제조하기 위한 표적화 벡터(MAID 1626)로서 사용하였다(도 4b 참조). MAID 1626의 표적화 벡터를 위한 접합부 핵산 서열(서열번호 1 내지 서열번호 3)은 표 2에 기술되어 있다.
- [0153] 후속적으로, *loxP*-네오마이신-*loxP* 및 *loxP*-하이그로마이신-*loxP*(또는 MAID 1979를 위한 *frt*-하이그로마이신-*frt*) 선별 카세트가 교대로 섞여 있는 마우스 BAC 클론 RP23-117i19로부터의 마우스 TCR αV의 내인성 TCR α 서열 5'를 포함하는 동일한 마우스 5' 아암을 사용한 일련의 사람 표적화 벡터를 제조하였다.
- [0154] 총 8개의 사람 TCR αV(7개의 기능성) 및 61개의 사람 TCR αJ(50개의 기능성) 유전자 분절을 함유하는 사람 TCR α 미니-유전자좌를 생성하기 위해, 사람 BAC 클론 RP11-349p11(인비트로젠)로부터의 DNA를 상동성 재조합에 의해 변형시켰고, 표적화 벡터(MAID 1767)로서 사용하였다(도 4c 참조). 이것에는 다음 6개의(5개의 기능성) 연속 사람 TCR αV 유전자 분절(TRAV35 내지 TRAV39) 및 5' *loxP*-ub-네오마이신-*loxP* 카세트를 함유하는 104,846bp의 사람 DNA가 부가되었다. 생성된 TCR α 유전자좌는, 5' *loxP*-ub-네오마이신-*loxP* 카세트와, 마우스 TCR α 불변 유전자 및 인헨서에 작동가능하게 연결되어 있는 총 8개의 사람 TCR αV(7개의 기능성) 및 61개의 사람 TCR αJ 유전자 분절을 함유한다. MAID 1767 표적화 벡터를 위한 접합부 핵산 서열(서열번호 4 및 서열번호 5)은 표 2에 기재되어 있다.
- [0155] 총 23개의 사람 TCR αV(17개의 기능성) 및 61개의 사람 TCR αJ 유전자 분절을 함유하는 사람 TCR α 미니-유전자좌를 생성하기 위해, 5'부터 3'으로 고유한 I-CeuI 부위, 상동성 재조합을 위해 ES 세포에 사용될 마우스 TCRA 유전자좌의 20kb의 마우스 TCRA 아암 5', 및 역 배향의 *loxP*-Ub-Hyg-*loxP* 카세트를 함유하는, 마우스 BAC 클론으로부터의 DNA를 세균 상동성 재조합에 의해 변형시켜 5'부터 3'으로 고유한 I-CeuI 부위, 마우스 TCRA 유전자좌의 20kb의 마우스 TCRA 아암 5', *frt*-pgk-Hyg-*frt* 카세트 및 고유한 AsiSI 부위를 함유하도록 한다. 사람 TCR αV22-V34를 포함하는 사람 BAC 클론 RP11-622o20으로부터의 DNA를 상동성 재조합에 의해 변형시켜 고유한 I-CeuI 및 AsiSI 부위에 의해 플랭킹된 Spec 카세트를 함유하도록 한다. 후속적으로, 변형된 사람 BAC 클론에서의 Spec 카세트를 변형된 마우스 BAC 클론에서의 I-CeuI와 AsiSI 부위 사이에 포함된 서열로 표준 제한 소화/연결 기술에 의해 대체하였다. 생성된 표적화 벡터(MAID 1979; 도 4d 참조)에는 다음 15개의(10개의 기능성) 연속 사람 TCR αJ 유전자 분절(TRAV22 내지 TRAV34) 및 5' *frt*-pgk-Hyg-*frt* 카세트를 함유하는 136,557bp의 사람 DNA가 부가되었다. 생성된 TCR α 유전자좌는 5' *frt*-pgk-Hyg-*frt* 카세트와 마우스 TCR α 불변 유전자 및 인헨서에 작동가능하게 연결되어 있는 총 23개의 사람 TCR αV(17개의 기능성) 및 61개의 사람 TCR αV 유전자 분절을 함유한다. MAID 1979의 표적화 벡터를 위한 접합부 핵산 서열(서열번호 6 및 서열번호 7)은 표 2에 기재되어 있다.
- [0156] 총 35개의 사람 TCR αV(28개의 기능성) 및 61개의 사람 TCR αJ 유전자 분절을 함유하는 사람 TCR α 미니-유전자좌를 생성하기 위해, 사람 BAC 클론 CTD2501-k5(인비트로젠)로부터의 DNA를 상동성 재조합에 의해 변형시켜 표적화 벡터(MAID 1769)로서 사용하였다(도 4e 참조). 이것에는 다음 12개의(11개의 기능성) 연속 사람 TCR αV 유전자 분절(TRAV13-2 내지 TRAV21) 및 5' *loxP*-ub-네오마이신-*loxP* 카세트를 함유하는 124,118bp의 사람 DNA가 부가되었다. 생성된 TCR α 유전자좌는 5' *loxP*-ub-네오마이신-*loxP* 카세트와 마우스 TCR α 불변 유전자 및 인헨서에 작동가능하게 연결되어 있는 총 35개의 사람 TCR αV(28개의 기능성) 및 61개의 사람 TCR αJ 유전자 분절을 함유한다. MAID 1769의 표적화 벡터를 위한 접합부 핵산 서열(서열번호 8 및 서열번호 9)은 표 2에 기재되어 있다.
- [0157] 총 48개의 사람 TCR αV(39개의 기능성) 및 61개의 사람 TCR αJ 유전자 분절을 함유하는 사람 TCR α 미니-유전자좌를 생성하기 위해, 사람 BAC 클론 RP11-92F11(인비트로젠)로부터의 DNA를 상동성 재조합에 의해 변형시켜 표적화 벡터(MAID 1770)로서 사용하였다(도 4f 참조). 이것에는 다음 13개의(11개의 기능성) 연속 사람 TCR αJ 유전자 분절(TRAV6 내지 TRAV8.5) 및 5' *loxP*-ub-하이그로마이신-*loxP* 카세트를 함유하는 145,505bp의 사람

DNA가 부가되었다. 생성된 TCR α 유전자좌는 5' *loxP*-ub-하이그로마이신-*loxP* 카세트와 마우스 TCR α 불변 유전자 및 인헨서에 작동가능하게 연결되어 있는 총 48개의 사람 TCR αV(39개의 기능성) 및 61개의 사람 TCR αJ 유전자 분절을 함유한다. MAID 1770의 표적화 벡터를 위한 접합부 핵산 서열(서열번호 10 및 서열번호 11)은 표 2에 기재되어 있다.

[0158] 총 54개의 사람 TCR αV(45개의 기능성) 및 61개의 사람 TCR αJ 유전자 분절을 함유하는 사람 TCR α 미니-유전자좌를 생성하기 위해, 사람 BAC 클론 RP11-780M2(인비트로젠)로부터의 DNA를 상동성 재조합에 의해 변형시켜 표적화 벡터(MAID 1771)로서 사용하였다(도 4g 참조). 이것에는 다음 6개의(6개의 기능성) 연속 사람 TCR αV 유전자 분절(TRAV1-1 내지 TRAV5) 및 5' *loxP*-ub-네오마이신-*loxP* 카세트를 함유하는 148,496bp의 사람 DNA가 부가되었다. 생성된 TCR α 유전자좌는 5' *loxP*-ub-네오마이신-*loxP* 카세트와 마우스 TCR α 불변 유전자 및 인헨서에 작동가능하게 연결되어 있는 총 54개의 사람 TCR αV(45개의 기능성) 및 61개의 사람 TCR αJ 유전자 분절을 함유한다. MAID 1771의 표적화 벡터를 위한 접합부 핵산 서열(서열번호 12 및 서열번호 13)은 표 2에 기재되어 있다.

[0159] 상기 단계들 중의 어느 단계에서, 선별 카세트를 Cre 또는 Flp 재조합효소에 의한 결실로 제거한다. 추가로, 사람 TCR δ 유전자좌를 도 5에 도시된 바와 같이 도입할 수 있다.

[0160] 실시예 3: TCR β 가변 유전자좌의 진행성 사람화

[0161] 도 6 및 도 7에서 요약된 진행성 사람화 전략을 사용하여 33V, 2D 및 14J의 마우스 분절에 상응하는 마우스 TCR β 유전자좌에서 0.6메가염기의 DNA를 사람 TCR β의 67V, 2D 및 14J의 분절에 상응하는 0.6메가염기의 DNA로 대체하였다. TCR β 유전자좌의 진행성 사람화 전략에 사용되는 각종 표적화 벡터의 접합부 핵산 서열은 표 3에 요약되어 있고 서열 목록에 포함되어 있다.

표 3

각종 TCR β 유전자좌 표적화 벡터에 대한 접합부 핵산 서열

MAID 번호	서열 번호	설명
1625	14	TCR β 가변 유전자좌의 마우스 서열 상류의 3' 말단(상류 마우스 트립시노젠 유전자 인근)과 <i>frt</i> -Ub-Neo- <i>frt</i> 카세트의 5' 말단 사이의 접합부 핵산 서열
	15	<i>frt</i> -Ub-Neo- <i>frt</i> 카세트의 3' 말단과 사람 TCRV β 18-TCRV β 29-1 삽입부의 5' 말단 사이의 접합부 핵산 서열
	16	사람 TCRV β 18-TCRV β 29-1 삽입부의 3' 말단과 마우스 TCRV β 분절의 마우스 서열 하류의 5' 말단(근접 하류 마우스 트립시노젠 유전자) 사이의 접합부 핵산 서열
1715	17	<i>Ice1</i> 부위를 포함하는, 하류 마우스 트립시노젠 유전자의 3' 말단과 사람 TCRD β 1-TCRJ β 1-1-TCRJ β 1-6 삽입부의 5' 말단 사이의 접합부 핵산 서열
	18	사람 TCRD β 1-TCRJ β 1-1-TCRJ β 1-6 삽입부의 3' 말단과 <i>loxP</i> -Ub-Hyg- <i>loxP</i> 카세트의 5' 말단 사이의 접합부 핵산 서열
	19	<i>loxP</i> -Ub-Hyg- <i>loxP</i> 카세트의 3' 말단과 마우스 Cβ 1 유전자 인근 마우스 서열의 5' 말단 사이의 접합부 핵산 서열
	20	<i>NotI</i> 부위를 포함하는, 마우스 Cβ 1 유전자 인근 마우스 서열의 3' 말단과 사람 TCRD β 2-TCRJ β 2-1-TCRJ β 2-7 삽입부의 5' 말단 사이의 접합부 핵산 서열
	21	사람 TCRD β 2-TCRJ β 2-1-TCRJ β 2-7 삽입부의 3' 말단과 TCR β 가변 유전자좌의 마우스 서열 하류의 5' 말단(Cβ 2 마우스 서열 인근) 사이의 접합부 핵산 서열
1791	22	TCR β 가변 유전자좌의 마우스 서열 상류의 3' 말단(상류 마우스 트립시노젠 유전자 인근)과 <i>frt</i> -Ub-Hyg- <i>frt</i> 카세트의 5' 말단 사이의 접합부 핵산 서열
	23	<i>frt</i> -Ub-Hyg- <i>frt</i> 카세트의 3' 말단과 사람 TCRV β 6-5-TCRV β 17 삽입부의 5' 말단 사이의 접합부 핵산 서열
1792	24	TCR β 가변 유전자좌의 마우스 서열 상류의 3' 말단(상류 마우스 트립시노젠 유전자 인근)과 <i>frt</i> -Ub-Neo- <i>frt</i> 카세트의 5' 말단 사이의 접합부 핵산 서열
	25	<i>frt</i> -Ub-Hyg- <i>frt</i> 카세트의 3' 말단과 사람 TCRV β 1-TCRV β 12-2 삽입부의 5' 말단 사이의 접합부 핵산 서열
6192	26	마우스 Cβ 2 유전자 인근 마우스 서열의 3' 말단과 사람 TCRBV30 엑손 2 서열의 5' 말단 사이의 접합부 핵산 서열
	27	사람 TCRBV30 엑손 1 서열의 3' 말단과 TCR β 유전자좌의 마우스 서열 하류의 5' 말단 사이의 접합부 핵산 서열

[0162]

- [0163] 사람 TCR β 가변 영역 분절은 IMGT 데이터베이스에서와 같이 번호를 매겼다. 각각의 접합부의 100bp 이상(각각의 말단으로부터 약 50bp)은 서열 목록에 포함되어 있다.
- [0164] 구체적으로, 마우스 BAC 클론 RP23-153p19(인비트로젠)로부터의 DNA를 상동성 재조합으로 변형하고, 표적화 벡터(MAID 1544)로서 사용하여 내인성 마우스 TCR β 유전자좌의 3' 트립시노젠 유전자 클러스터의 바로 상류의 17kb 영역(TCRBV30을 포함함)을 PGK-neo 카세트로 대체하고, 이어서 *loxP* 부위로 대체하였다(도 8a 참조). 마우스 BAC 클론 RP23-461h15(인비트로젠)로부터의 DNA를 상동성 재조합으로 변형하고, 표적화 벡터(MAID 1542)로서 사용하여 내인성 마우스 TCR β 의 5' 트립시노젠 유전자 클러스터 상류의 8355bp 영역(TCRBV2 및 TCRBV3을 포함함)을 Ub-하이그로마이신 카세트로 대체하고, 이어서 *loxP* 부위로 대체하였다. 이중 표적화된 염색체(즉, 2개의 표적화 벡터로 표적화된 단일 내인성 마우스 TCR β 유전자좌)를 포함하는 ES 세포를 당업계에 공지된 핵형 분석 및 선별 방법(예를 들면, TAQMAN™)으로 확인하였다. 변형된 ES 세포를 CRE 재조합효소로 처리하고, 이로써 5'과 3' *loxP* 부위 사이의 영역(즉, TCRBV2 내지 TCRBV30으로부터의 내인성 마우스 TCR β 유전자좌로 이루어짐)의 결실을 매개하고 단일 *loxP* 부위, 하이그로마이신 카세트 및 마우스 TCRBD, TCRBJ, 불변 및 인헨서 서열만을 남겨 두었다. 도 8a에 나타난 바와 같이, 하나의 마우스 TCRV β 는 트립시노젠 유전자의 5' 클러스터의 상류에 남아 있고, 하나의 마우스 TCRB β 는 마우스 E β 의 하류에 남아 있다.
- [0165] TCR β 에 대한 제1 사람 표적화 벡터는 제1의 14개의 연속 사람 TCR β V 유전자 분절(TRBV18-TRBV29-1)을 함유한 CTD2559j2 BAC 클론(인비트로젠)으로부터의 125,781bp의 사람 DNA를 갖는다. 이러한 BAC를 상동성 재조합에 의해 변형시켜 5' 및 3' 마우스 상동성 아암의 연결을 위한 5' AsiSI 부위 및 3' AscI 부위를 함유하도록 한다. 이러한 사람 단편에 대한 연결을 위해 2개의 상이한 상동성 아암을 사용하였다: RP23-153p19 BAC 클론으로부터의 하류 마우스 트립시노젠 유전자를 둘러싸는 내인성 TCR β 서열을 함유하는 한 세트의 상동성 아암 및 마우스 BAC 클론 RP23-461h15로부터의 상류 마우스 트립시노젠을 둘러싸는 내인성 TCR β 서열 5'를 함유하는 또 다른 세트의 상동성 아암. 이러한 마우스-사람 키메라 BAC를 마우스 TCR β 유전자좌에서의 사람 TCR β 유전자 분절 및 상류 *frt-ub-네오마이신-frt* 카세트의 초기 삽입부를 제조하기 위한 표적화 벡터(MAID 1625)로서 사용하고, 14개의 사람(8개의 기능성) TCR β V를 함유하는 사람 TCR β 미니-유전자좌를 생성하였다(도 8b 참조). MAID 1625의 표적화 벡터를 위한 접합부 핵산 서열(서열번호 14 내지 서열번호 16)은 표 3에 설명되어 있다.
- [0166] 마우스 TCR β D 및 J 분절을 사람 TCR β D 및 J 분절로 대체하기 위해, 마우스 BAC 클론 RP23-302p18(인비트로젠)로부터 및 사람 BAC 클론 RP11-701D14(인비트로젠)로부터의 DNA를 상동성 재조합으로 변형하고, 상기 기재된 바와 같은 TCR β V 미니-유전자좌(즉, MAID 1625)를 함유하는 ES 세포로의 표적화 벡터(MAID 1715)로서 사용하였다. 이러한 변형은 약 18540bp의 영역(3' 트립시노젠 유전자의 폴리A의 100bp 하류로부터, 마우스 TCRBD1-J1, 마우스 불변 1 및 마우스 TCRBD2-J2를 포함하는 D2 클러스터에서의 J 분절로부터의 100bp 하류까지)을 사람 TCRBD1-J1, *loxP* Ub-하이그로마이신-*loxP* 카세트, 마우스 불변 1 및 사람 TCRBD2-J2를 함유하는 약 25425bp의 서열로 대체하였다(도 8c의 (i) 참조). 이중 표적화된 염색체(즉, 2개의 표적화 벡터로 표적화된 단일 내인성 마우스 TCR β 유전자좌)를 포함하는 ES 세포를 당업계에 공지된 핵형분석 및 선별 방법(예를 들면, TAQMAN™)으로 확인하였다. 변형된 ES 세포를 CRE 재조합효소로 처리하고, 이로써 하이그로마이신 카세트의 결실을 매개하고 D1J 클러스터에서의 사람 J 분절로부터의 단일 *loxP* 부위 하류만을 남겨 두었다(도 8c의 (ii) 참조). MAID 1715의 표적화 벡터를 위한 접합부 핵산 서열(서열번호 17 내지 서열번호 21)은 표 3에 기재되어 있다.
- [0167] 후속적으로, 선별 카세트가 교대로 섞여 있는 마우스 BAC 클론 RP23-461h15로부터의 상류 마우스 트립시노젠 유전자를 둘러싸는 내인성 TCR β 서열을 포함하는 동일한 마우스 5' 아암을 사용하는 일련의 사람 표적화 벡터를 제조하였다.
- [0168] 총 40개의 사람 TCR β V(30개의 기능성) 및 사람 TCR β D 및 J 분절을 함유하는 사람 TCR β 미니-유전자좌를 생성하기 위해, 사람 BAC 클론 RP11-134h14 및 RP11-785k24(인비트로젠)로부터의 DNA를 상동성 재조합으로 변형하고, 표준 세균 상동성 재조합, 제한 소화/연결 및 다른 클로닝 기술을 사용하여 표적화 벡터(MAID 1791)에 조합하였다. MAID 1791의 표적화 벡터의 도입에 의해, 다음 26개의(22개의 기능성) 연속 사람 TCR β V 유전자 분절(TRBV6-5 내지 TRBV17) 및 5' *frt-ub-하이그로마이신-frt* 카세트를 함유하는 198,172bp의 사람 DNA를 추가하였다. 생성된 TCR β 유전자좌는 5' *frt-ub-하이그로마이신-frt* 카세트와 마우스 TCR β 불변 유전자 및 인헨서에 작동가능하게 연결되어 있는 총 40개의 사람 TCR β V(30개의 기능성) 및 사람 TCR β D 및 J 유전자 분절을 함유한다(도 8d 참조). MAID 1791의 표적화 벡터를 위한 접합부 핵산 서열(서열번호 22 및 서열번호 23)은 표 3에 기재되어 있다.
- [0169] 총 66개의 사람 TCR β V(47개의 기능성) 및 사람 TCR β D 및 J 분절을 함유하는 사람 TCR β 미니-유전자좌를 생

성하기 위해, 사람 BAC 클론 RP11-902B7(인비트론)로부터의 DNA를 상동성 재조합으로 변형하고, 표적화 벡터(MAID 1792)로서 사용하였다. 이에 의해, 다음 26개의(17개의 기능성) 연속 사람 TCRβ V 유전자 분절(TRBV1 내지 TRBV12-2) 및 5' *frt-ub-네오마이신-frt* 카세트를 함유하는 159,742bp의 사람 DNA가 부가되었다. 생성된 TCRβ 유전자좌는 5' *frt-ub-네오마이신-frt* 카세트와 마우스 TCRβ 불변 유전자 및 인헨서에 작동가능하게 연결되어 있는 총 66개의 사람 TCRβ V(47개의 기능성) 및 사람 TCRβ D 및 J 유전자 분절을 함유한다(도 8e 참조). MAID 1792의 표적화 벡터를 위한 접합부 핵산 서열(서열번호 24 및 서열번호 25)은 표 3에 기재되어 있다.

[0170] 상기 단계들 중의 어느 단계에서, 선별 카세트를 Cre 또는 Flp 재조합효소에 의한 결실로 제거한다. 예를 들면, 도 7에 도시된 바와 같이, MAID 1716은 하이그로마이신 카세트 결실을 갖는 MAID 1715에 상응한다.

[0171] 최종적으로, 총 67개의 사람 TCRβ V(48개의 기능성) 및 사람 TCRβ D 및 J 분절을 함유하는 사람 TCRβ 미니-유전자좌를 생성하였다. 마우스 TCRBV31은 TCRBC2의 약 9.4kb 3'(제2 TCRB 불변 영역 서열)에 위치하고, 다른 TCRBV 분절에 대하여 반대방향이다. 등가의 사람 V 분절은 TCRBV30이며, 이는 사람 TCRB 유전자좌에서 유사한 위치에 위치되어 있다.

[0172] TCRBV31을 사람화하기 위해, 마우스 TCRBV31을 함유하는 마우스 BAC 클론을 세균 상동성 재조합에 의해 변형하여 LTVEC MAID 6192를 제조하였다(도 8f 참조). 엑손 1에서 개시 코돈부터 시작하는 전체 암호화 영역, 인트론, 3' UTR 및 TCRBV31의 재조합 신호 서열(RSS)을 상동성 사람 TCRBV30 서열로 대체하였다. 5' UTR은 마우스 서열로서 유지되었다. 선택을 위해, 자가-결실 카세트(1ox2372-유비퀴틴 프로모터-Hyg-PGK폴리아-프로타민 프로모터-Cre-SV40폴리아-1ox2372)를 인트론(엑손 1의 72bp 3', 엑손 2의 1,289bp 5')에 삽입하였다. 간단히, 도 7 및 도 8은 hTCRBV30의 선별 카세트 3'을 도시하며, 이는 hTCRBV30 유전자의 엑손 1과 엑손 2 사이의 인트론에 위치되도록 유전자 조작되었다. Cre 발현을 촉진하는 프로타민 프로모터는 감수분열 후 정자세포에서 독점적으로 전사되며, 카세트는 마우스의 F1 세대에서 "자가-결실"된다.

[0173] MAID 6192의 표적화 벡터를 위한 접합부 핵산 서열(서열번호 26 및 서열번호 27)은 표 3에 기재되어 있다. MAID 6192 DNA는 MAID 1792 ES 세포에 전기천공된다. 하이그로마이신 내성을 위해 ES 세포 클론을 선택하고 마우스 TCRB31 대립유전자의 소실 및 사람 TCRB30 대립유전자의 획득에 대해 선별한다.

[0174] 남아 있는 5' 마우스 TCRβ V 분절을 임의로 결실시키기 위해 유사한 유전자 조작 전략을 사용한다.

[0175] **실시예 4: TCR α/TCR β 마우스의 생산**

[0176] TCR α 및 TCRβ 유전자좌의 진행성 사람화의 각 단계에서, 사람화된 TCR α 가변 유전자좌에 대해 동형접합성인 마우스를 사람화된 TCRβ 가변 유전자좌에 대해 동형접합성인 마우스로 번식시켜 사람화된 TCR α 및 TCRβ 가변 유전자좌를 포함하는 자손을 형성할 수 있다. 사람화된 TCR α 및 사람화된 TCRβ 유전자좌에 대하여 동형접합성으로 자손을 번식시킨다.

[0177] 하나의 실시형태에서, 8개의 사람 Vα 및 61개의 사람 Jα(MAID 1767; "1767 HO")를 포함하는 사람화된 TCR α 가변 유전자좌에 대해 동형접합성인 마우스를 14개의 사람 Vβ, 2개의 사람 Dβ 및 14개의 사람 Jβ(MAID 1716; "1716 HO")를 포함하는 사람화된 TCRβ 가변 유전자좌에 대해 동형접합성인 마우스로 번식시켰다. 2개의 사람화된 유전자좌에 대하여 동형접합성으로 자손을 번식시켰다.

[0178] **실시예 5: 사람화된 TCR α 및/또는 TCR β 유전자좌에 대해 동형접합성인 마우스에서의 비장 T 세포 생산**

[0179] 야생형(WT) 마우스, 결실된 마우스 TCR α 유전자좌("MAID 1540", 도 3 참조)를 갖는 마우스, 사람 TCR α 유전자좌("MAID 1767", 도 3 참조)에 대해 동형접합성인 마우스, 2개의 남아 있는 마우스 V 분절을 제외하고 결실된 TCRβ V 분절("MAID 1545", 도 7 참조)을 갖는 마우스, 사람 TCRβ 유전자좌에 동형접합성이고 2개의 남아 있는 마우스 V 분절("MAID 1716", 도 7 참조)을 포함하는 마우스, 및 사람 TCR α와 TCRβ 유전자좌 둘 다에 대해 동형접합성이고 2개의 남아 있는 마우스 V 분절("MAID 1767 1716")을 포함하는 TCRβ 유전자좌를 갖는 마우스로부터의 비장을 콜라게나제 D(Roche Bioscience)로 관류시키고, 적혈구를 ACK 용혈 완충액으로 용혈시킨 후 RPMI 배지에서 세척하였다.

[0180] 단일 WT, MAID 1540, 1767, 1545, 1716 및 1716 1767의 대표적인 동물로부터의 비장 세포를 유동 세포측정법으로 평가하였다. 간단히, 표준 방법을 사용하여 세포 현탁액을 제조하였다. 1×10⁶개의 세포를, 얼음상에서 30분 동안 항체의 적절한 각테일로 착색된 항-마우스 CD16/CD32(2.4G2, BD)와 함께 10분 동안 얼음상에서 항온처리하였다. 착색 후, 세포를 세척하고, 이어서 2% 포름알데하이드로 고정하였다. LSRII/CantoII/LSRFortessa

유동 세포측정기 상에서 데이터 획득을 수행하고 FlowJo로 분석하였다.

- [0181] 비장 세포의 착색 동안, 항-마우스 FITC-CD3 (17A2, BD)을 사용하였다. 도 9에서 입증된 바와 같이, 사람 TCR 분절이 존재하는 마우스는 유의한 수의 CD3+ T 세포를 생산할 수 있는 반면, TCR α 마우스 유전자좌가 결실된 마우스는 그러하지 않았다. TCR β 유전자좌가 결실된 마우스도 또한 CD3+ T 세포를 생산하였는데, 이는 남아 있는 3' 마우스 V 분절의 이용으로 인한 것으로 추정된다(이하 참조).
- [0182] **실시예 6: 사람화된 TCR α 및/또는 TCR β 유전자좌에 대해 동형접합성인 마우스에서의 흉선 T 세포 발달**
- [0183] 사람화된 TCR α 및/또는 TCR β 유전자좌에 대해 동형접합성인 마우스가 흉선에서 정상적인 T 세포 발달을 나타 내는지 결정하기 위해, 4개의 각 WT, 1767 HO, 1716 HO 및 1716 HO 1767 HO의 연령 일치 동물(7 내지 10주령) 을 유동 세포측정법에 사용하여 각종 발달 단계에서 T 세포의 생산을 평가할 뿐만 아니라, DN, DP, CD4 SP 및 CD8 SP T 세포 각각의 빈도 및 절대수를 평가하였다.
- [0184] 세포 유형 결정은 표 1에 요약된 바와 같은 CD4, CD8, CD44 및 CD25 세포 표면 마커의 존재에 근거하여 이루어 졌다. 세포 유형 지정과 흉선 세포에서의 세포 표면 마커의 발현 사이의 상관관계는 다음과 같다: 이중 음성 (DN) 세포(CD4- CD8-), 이중 양성(DP) 세포(CD4+ CD8+), CD4 단일 양성 세포(CD4+ CD8-), CD8 단일 양성 세포 (CD4- CD8+), 이중 음성 1/DN1 세포(CD4- CD8-, CD25- CD44+), 이중 음성 2/DN2 세포(CD4- CD8-, CD25+ CD44+), 이중 음성 3/DN3 세포(CD4- CD8-, CD25+ CD44-) 및 이중 음성 4/DN4 세포(CD4- CD8-, CD25- CD44-).
- [0185] 흉선 세포를 유동 세포측정법으로 평가하였다. 간단히, 표준 방법을 사용하여 세포 현탁액을 제조하였다. 실 시예 5에 기재된 바와 같이 유동 세포분석법을 수행하였다. 사용된 항체는 항-마우스 PE-CD44 (IM7, BioLegend), PeCy7-CD25 (PC61, BioLegend), APC-H7-CD8a (53-6.7, BD) 및 APC-CD4 (GK1.5, eBioscience)이었다.
- [0186] 도 10 및 도 11에 도시된 바와 같이, 사람화된 TCR α , TCR β , 및 TCR α 와 TCR β 둘 다에 대해 동형접합성인 마 우스는 DN1, DN2, DN3, DN4, DP, CD4 SP 및 CD8 SP T 세포를 생산할 수 있는데, 이는 상기 사람화된 유전자좌 로부터 생산된 T 세포가 흉선에서 T 세포를 발현시킬 수 있음을 나타낸다.
- [0187] **실시예 7: 사람화된 TCR α 및/또는 TCR β 유전자좌에 대해 동형접합성인 마우스에서의 비장 T 세포 분화**
- [0188] 사람화된 TCR α 및/또는 TCR β 유전자좌에 대해 동형접합성인 마우스가 말초(예를 들면, 비장)에서 정상적인 T 세포 분화를 나타내는지 결정하기 위해, 4개의 각 WT, 1767 HO, 1716 HO 및 1716 HO 1767 HO의 연령 일치 동물 (7 내지 10주령)을 유동 세포측정법에 사용하여 비장에서의 각종 T 세포 유형(CD3+, CD4+, CD8+, T_{naive}, T_{cm} 및 T_{eff/em})의 생산을 평가할 뿐만 아니라, 비장에서의 각 T 세포 유형의 절대수를 평가하였다.
- [0189] 세포 유형 결정은 CD19 (B 세포 마커), CD3 (T 세포 마커), CD4, CD8, CD44 및 CD62L (L-선택) 세포 표면 마커 의 존재에 근거하여 이루어졌다. 세포 유형 지정과 비장에서의 세포 표면 마커의 발현 사이의 상관관계는 다음 과 같다: T 세포(CD3+), CD4 T 세포(CD3+ CD4+ CD8-), CD8 T 세포(CD3+ CD4- CD8+), CD4 효과기/효과기 기억 T 세포(CD3+ CD4+ CD8- CD62L- CD44+), CD4 중심 기억 T 세포(CD3+ CD4+ CD8- CD62L+ CD44+), CD4 미접촉 T 세포 (CD3+ CD4+ CD8- CD62L+ CD44-), CD8 효과기/효과기 기억 T 세포(CD3+ CD4- CD8+ CD62L- CD44+), CD8 중심 기 억 T 세포(CD3+ CD4- CD8+ CD62L+ CD44+), CD8 미접촉 T 세포(CD3+ CD4- CD8+ CD62L+ CD44-).
- [0190] 비장 세포를 유동 세포측정법으로 평가하였다. 간단히, 표준 방법을 사용하여 세포 현탁액을 제조하였다. 실 시예 5에 기재된 바와 같이 유동 세포분석법을 수행하였다. 사용된 항체는 항-마우스 FITC-CD3 (17A2, BD), PE-CD44 (IM7, BioLegend), PerCP-Cy5.5-CD62L (Me1-14, BioLegend), APC-H7-CD8a (53-6.7, BD), APC-CD4 (GK1.5, eBioscience) 및 V450-CD19 (1D3, BD)이었다.
- [0191] 도 12 내지 도 14에 도시된 바와 같이, 사람화된 TCR α , TCR β , 및 TCR α 와 TCR β 둘 다에 대해 동형접합성인 마우스의 비장에서의 T 세포는 T 세포를 분화시킬 수 있었으며, CD4+ 및 CD8+ T 세포는 모두 존재하였다. 또한, 기억 T 세포는 시험된 마우스의 비장에서 검출되었다.
- [0192] **실시예 8: 사람화된 TCR 마우스에서의 사람 V 분절의 이용**
- [0193] 유동 세포측정법 및 TAQMAN™ 실시간 PCR을 사용하여, 사람화된 TCR β 유전자좌에 대해 동형접합성인 마우스 (1716 HO) 및 사람화된 TCR β 와 TCR α 유전자좌 둘 다에 대해 동형접합성인 마우스(1716 HO 1767 HO) 각각에서 사람 TCR β V 분절의 발현을 단백질 및 RNA 수준에 대하여 평가하였다.

[0194] 유동 세포측정법을 위해, 비장 T 세포를 준비하고 도 5에서 기재된 바와 같이 분석을 수행하였다. 유동 세포측정법을 위해, TCRβ 레퍼토리 키트(IOTEST®Beta Mark, Beckman Coulter)를 사용하였다. 상기 키트는 다수의 사람 TCRBV, 예를 들면, hTRBV-18, -19, -20, -25, -27, -28 및 -29에 특이적인 항-사람 항체를 함유한다.

[0195] 결과를 도 15a 및 도 15b에 요약한다. 도 15a(CD8 T 세포 중첩) 및 도 15b(CD4 T 세포 중첩)에 나타난 표는 1716 HO와 1716 HO 1767 HO 마우스 둘 다에서의 비장 T 세포가 다수의 사람 TCRβ V 분절을 이용하였음을 입증한다. 야생형 마우스를 음성 대조군으로서 사용하였다.

[0196] 실시간 PCR을 위해, 제조업자의 설명서에 따라 Microarrays Total RNA Isolation Kit (Ambion by Life Technologies)에 대한 MAGMAX™-96을 사용하여 비장 및 흉선으로부터 총 RNA를 정제하였다. MAGMAX™ TURBO™ DNase Buffer 및 TURBO DNase를 사용하여 상기에 열거된 MAGMAX 키트(Ambion by Life Technologies)로부터 게놈 DNA를 제거하고, SUPERSRIPT® VILO™ Master Mix(Invitrogen by Life Technologies)를 사용하여 mRNA(2.5ug 이하)를 cDNA에 역전사시켰다. cDNA를 2-5ng/mL로 희석하고, 제조업자의 지침서에 따라 표 4에 나타난 프라이머 및 Taqman MGB 프로브(Applied Biosystems) 또는 BHQ1/BHQ-Plus 프로브(Biosearch Technologies)를 사용하는 ABI 7900HT Sequence Detection System(Applied Biosystems)을 사용하여 cDNA 10-25ng을 TAQMAN® Gene Expression Master Mix(Applied Biosystems by Life Technologies)로 증폭시켰다. 각 유전자의 상대적 발현을 쥐과 TCRβ 불변 1(TRBC1) 대조군으로 표준화하였다.

표 4

실시간 PCR(TAQMAN®)에 의해 사람화된 TCR 마우스에서 TCRβ V 분절 및 불변 영역의 RNA 발현을 검출하기 위해 사용된 프라이머 및 프로브

(TAQMAN™)

TRBV	센스 프라이머 (5'-3')		안티센스 프라이머 (5'-3')		프로브(5'-3')	
	서열	서열 번호	서열	서열 번호	서열	서열 번호
hTRBV 18	CCGGCGTCATGC AGAA	28	GGGCTGCATCTCAGT CTTGC	29	FAM- CACCTGGTCAGG AGGAGG -MGB	30
hTRBV 19	GGAATCACTCAG TCCCCAAG	31	ATTCTGTTCACTCACTC AGGGTCA	32	FAM- TCAGAAAGGAAG GACAGAAT-MGB	33
hTRBV 20	CGAGCAAGGCGT CGAGAA	34	GGACAAGGTCAGGCT TGCA	35	FAM- ACAAGTTTCTCAT CAACC- MGB	36
hTRBV 24	TGTTACCCAGAC CCCAAGGA	37	TCTGAGAACATTCCA GCATAATCCT	38	FAM- TAGGATCACAAAG ACAGGAA - MGB	39
hTRBV 25	TCCCCTGACCCT GGAGTCT	40	TGCTGGCACAGAGGT ACTGAGA	41	FAM- CAGGCCCTCACAT AC- MGB	42
hTRBV 27	AAGCCCAAGTGA CCCAGAA	43	ATTCTGAGAACAAGT CACTGTAACTTC	44	FAM- CTCATCACAGTGA CTGGAA- MGB	45

[0197]

TRBV	센스 프라이머 (5'-3')		안티센스 프라이머 (5'-3')		프로브 (5'-3')	
	서열	서열 번호	서열	서열 번호	서열	서열 번호
hTRBV 28	GTGAAAGTAACC CAGAGCTCGAG	46	ATCCTGGACACATTC CAGAAAAAC	47	FAM- ATATCTAGTCAAA AGGACGGGA- MGB	48
hTRBV 29	TGTCATTGACAA GTTTCCCATCAG	49	TGCTGTCTTCAGGGC TCATG	50	FAM- TCAACTCTGACTG TGAGCA- MGB	51
mTRBC 1	AGCCGCCTGAGG GTCTCT	52	GCCACTTGTCTCCT CTGAAAG	53	FAM- TACCTTCTGGCAC AATCCTCGCA - BHQ	54

[0198]

[0199]

도 16a 및 도 16b에서 입증된 바와 같이, 사람화된 TCRβ 유전자좌에 대해 동형접합성인 마우스(1716 HO) 및 사람화된 TCRβ와 TCRα 유전자좌 둘 다에 대해 동형접합성인 마우스(1716 HO 1767 HO)는 흉선과 비장 둘 다에서 각종 사람 TCRβ 분절의 RNA 발현을 나타냈다. 마우스는 또한 마우스 TRBV-1 및 TRBV-31 분절의 RNA 발현을 나타냈으나(데이터를 나타내지 않음), 어떠한 마우스 TRBV-1 단백질도 유동 세포분석법에 의해 검출되지 않았다(데이터를 나타내지 않음).

[0200]

도 8f에서 입증된 바와 같이 마우스 TRBV-31 분절을 사람 TRBV-30로 대체하고, 본원에 개시된 바와 같이 MAID 6192 ES 세포로부터 마우스를 생산한다. 본원에 개시된 바와 같이 유동 세포분석법 및/또는 실시간 PCR에 의해 TRBV-30을 포함한 사람 Vβ 분절의 이용에 대해 생성된 동형접합성 동물의 비장 및 흉선을 시험한다.

[0201]

실시예 9: 23개의 사람 TCR Va 분절에 대해 동형접합성인 마우스에서의 T 세포 발달

[0202]

동형접합성 사람화된 TCRα 마우스는 8개의 사람 Va 분절 및 61개의 사람 Ja 분절을 포함하는 이전 실시예(1767 HO, 도 3 참조)를 특징으로 한다. 23개의 사람 Va 분절 및 61개의 사람 Ja 분절을 포함하는 동형접합성 사람화된 TCRα 마우스(1979 HO, 도 3 참조)에 대해 비장 CD3+ T 세포를 생산하고 흉선에서 T 세포 발현을 나타내는 능력을 시험하였다.

[0203]

이전 실시예에 개시된 바와 같이 적절한 항체를 사용하여 유동 세포측정법에 의해 실험 데이터를 획득하였다. 도 17에 도시된 바와 같이, 23개의 사람 Va 분절 및 61개의 사람 Ja 분절에 대해 동형접합성인 마우스는 유의한 다수의 비장 CD3+ T 세포를 생산하였고, 말초 CD3+ T 세포의 퍼센트(%)는 야생형 동물의 퍼센트에 필적하였다(도 19 참조).

[0204]

더욱이, 1979 HO 마우스에서의 흉선 세포는 T 세포를 발현할 수 있고 DN1, DN2, DN3, DN4, DP, CD4 SP 및 CD8 SP 단계에서 T 세포를 포함하였다(도 18 참조).

[0205]

실시예 10: 사람 TCRα와 TCRβ 가변 영역 분절 둘 다의 완전한 레퍼토리에 대해 동형접합성인 마우스에서의 T 세포 발달 및 분화

[0206]

사람 TCRα 가변 영역 분절(즉, 54개의 사람 Va 및 61개의 사람 Ja)의 완전한 레퍼토리에 대해 동형접합성이고 사람 TCRβ 가변 영역 분절(67개의 사람 Vβ, 2개의 사람 Dβ 및 14개의 사람 Jβ)의 완전한 레퍼토리에 대해 동형접합성인 마우스, "1771 HO 6192 HO"(도 3 및 도 7 참조)에 대해 정상적인 T 세포를 발현하는 흉선 세포를 생산하고 말초에서 정상적인 T 세포를 분화시키는 T 세포를 생산하고 사람 Va 및 Vβ 분절들의 완전한 레퍼토리를 이용하는 능력을 시험하였다.

[0207]

실시예 5 및 6에서 기재된 바와 같이 항-마우스 CD4, CD8, CD25 및 CD44 항체를 사용하여 흉선에서의 DN1, DN2, DN3, DN4, DP, CD4 SP 및 CD8 SP T 세포의 존재를 결정하기 위해 유동 세포측정법을 수행하였다. 또한, 말초에서의 CD3+ T 세포의 수를 결정하고 말초에서의 T 세포 분화(예를 들면, 말초에서의 효과기 및 기억 T 세포의 존재)를 평가하기 위해 유동 세포분석법을 수행하였다. 실시예 5 및 7에 기재된 바와 같이 항-마우스 CD3, CD19, CD4, CD8, CD44 및 CD62L을 사용하여 실험을 수행하였다.

[0208]

최종적으로, 1771 HO 6192 HO 마우스에서의 T 세포가 TCRβ 및 TCRA V 분절들의 완전한 레퍼토리를 이용하는지를 결정하기 위해 유량 세포분석법 및/또는 실시간 PCR을 수행하였다. 유량 세포분석법을 사용하는 단백질 발현의

경우, 항-사람 hTCRBV-특이적인 항체를 함유하는 TCR β 레퍼토리 키트(IOTEST $\text{\textcircled{R}}$ Beta Mark, Beckman Coulter)를 사용한다(도 8 참조). 실시간 PCR을 사용하는 RNA 발현의 경우, 제조업자의 지침서에 따라 및 실시예 8에 기재된 바와 같이 사람 TCR-V 프라이머 및 Taqman 프로브를 사용하여 비장 또는 흉선으로부터의 cDNA를 증폭시킨다.

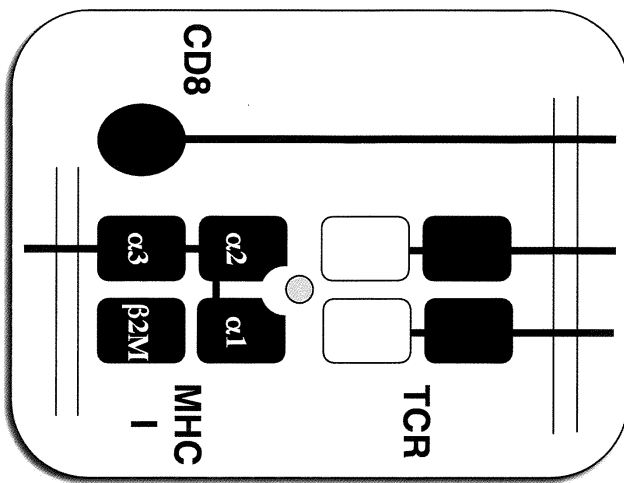
[0209] **등가범위**

[0210] 당업자들은 불과 통상적인 실험을 사용하여 본원에 개시된 본 발명의 특정 실시형태의 수많은 등가범위를 인식하거나 알아낼 수 있을 것이다. 이러한 등가범위는 첨부된 특허청구범위에 포함되는 것으로 의도된다.

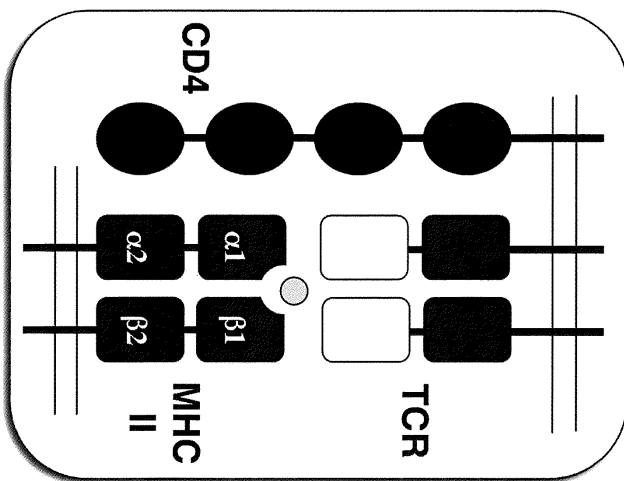
[0211] 본원을 통하여 인용된 모든 비특허 문헌, 특허원 및 특허의 전체 내용은 그 전체가 본원에 인용에 의해 포함된다.

도면

도면1

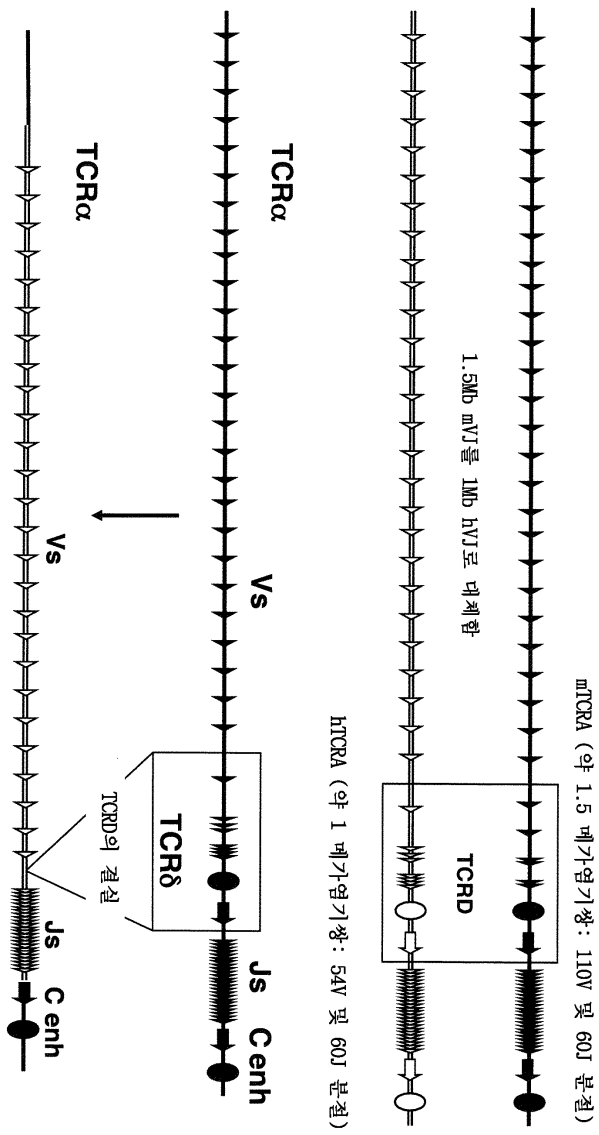


제 1 부류

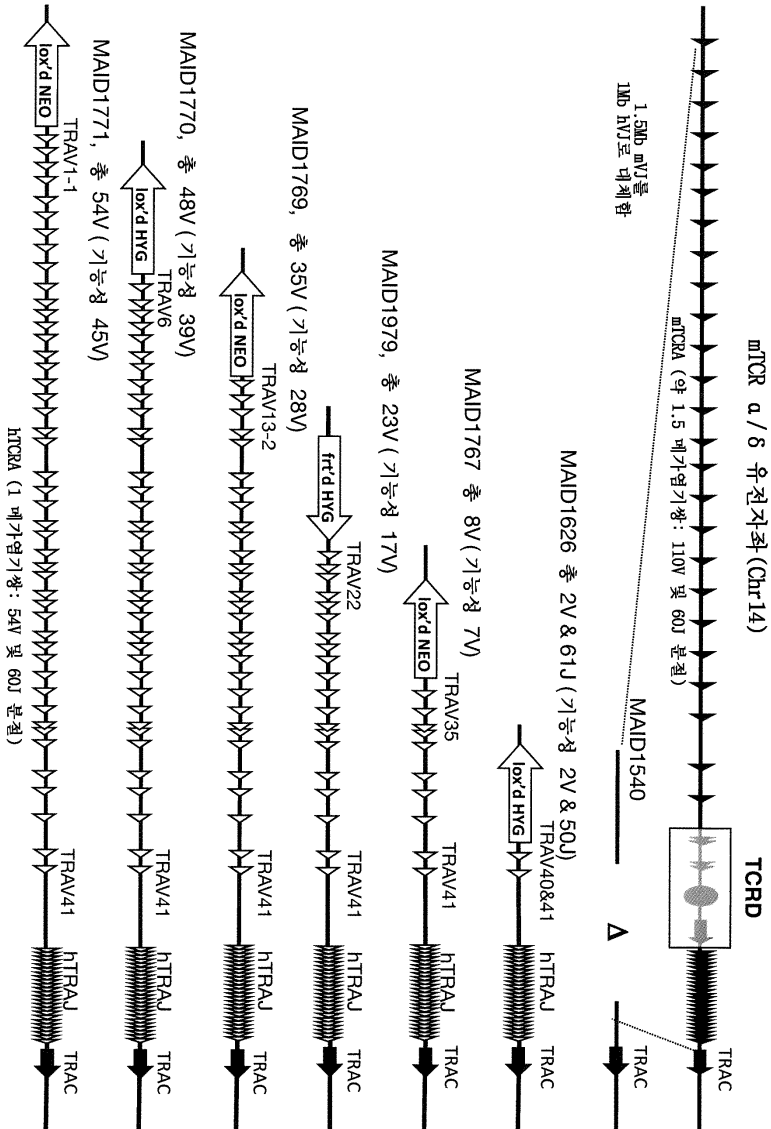


제 2 부류

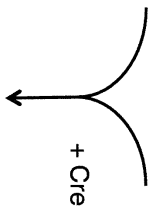
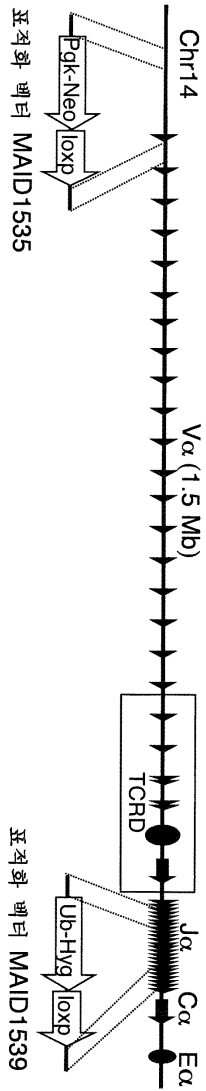
도면2



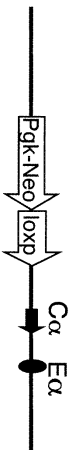
도면3



마우스 TOR α/δ 유전자좌

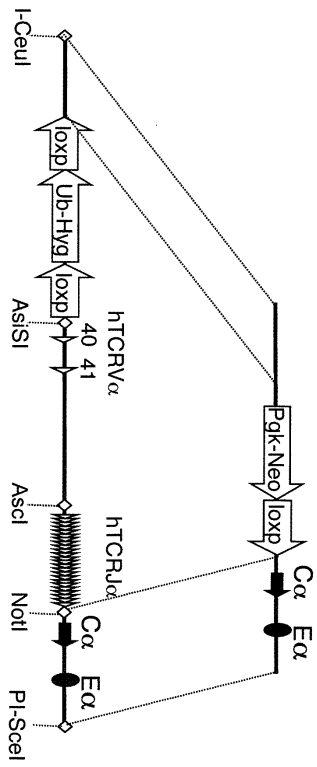


결핍된 마우스 TOR α/δ 유전자좌 (MAID 1540)

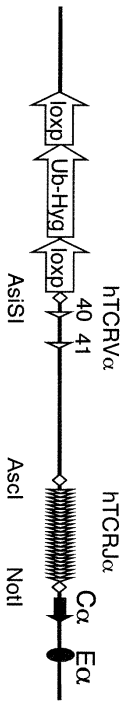


도면4a

결실된 마우스 TOR α/δ 유전자좌



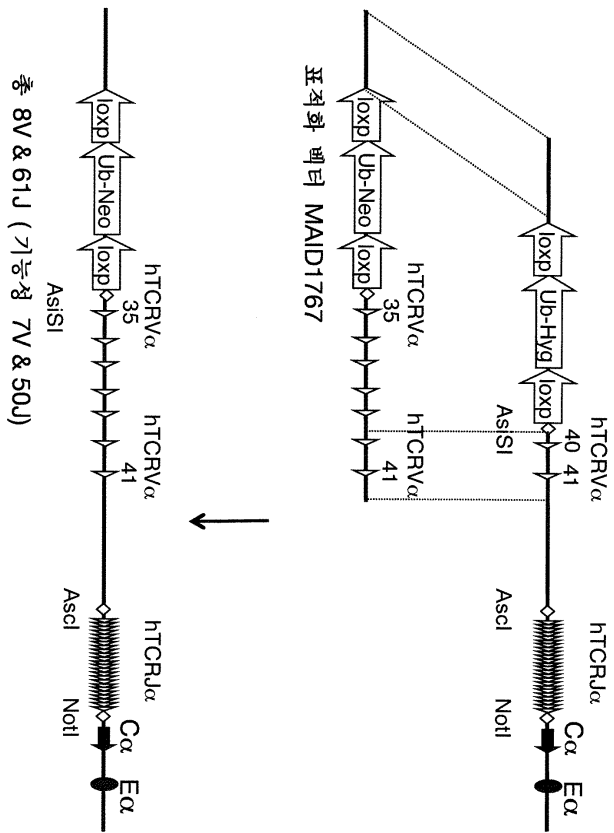
표적화 벡터 MAID1626



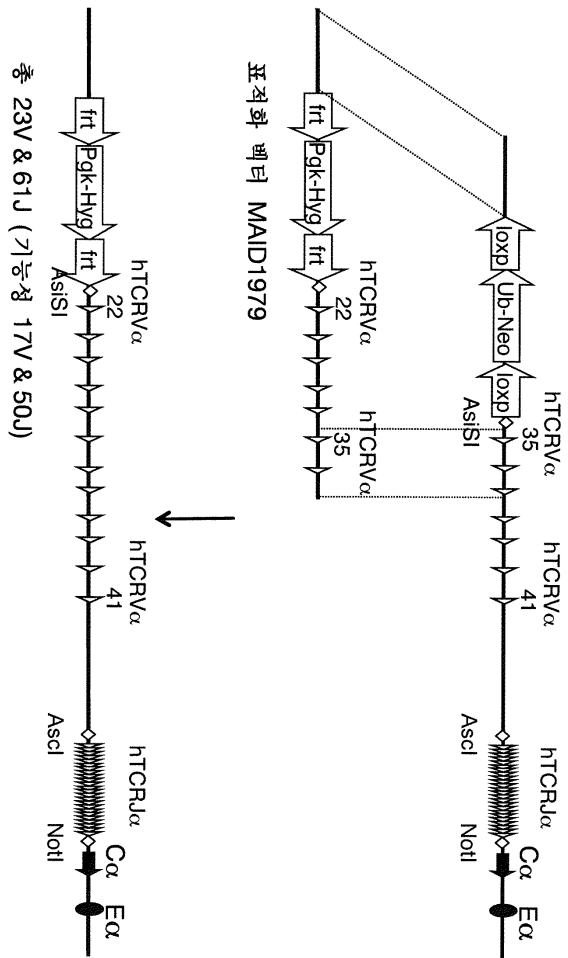
총 2V & 61J (기능형 2V & 50J)

도면4b

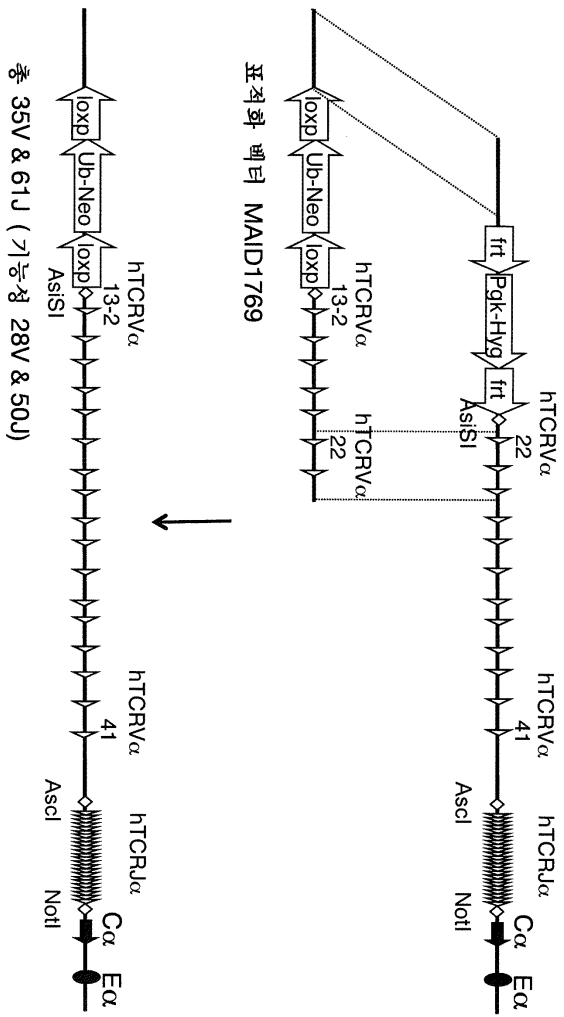
도면4c



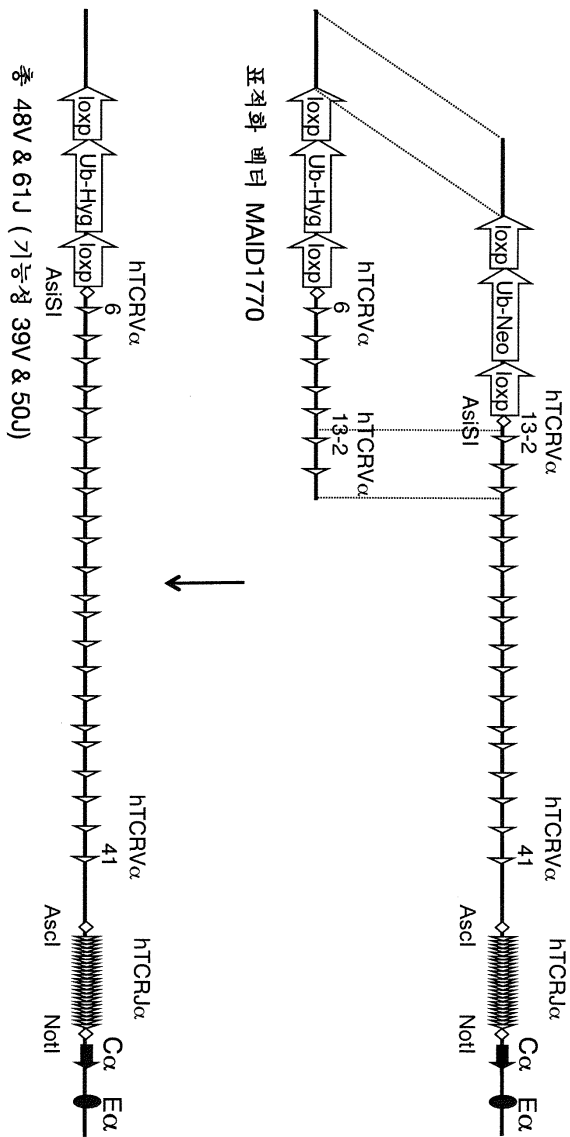
도면4d



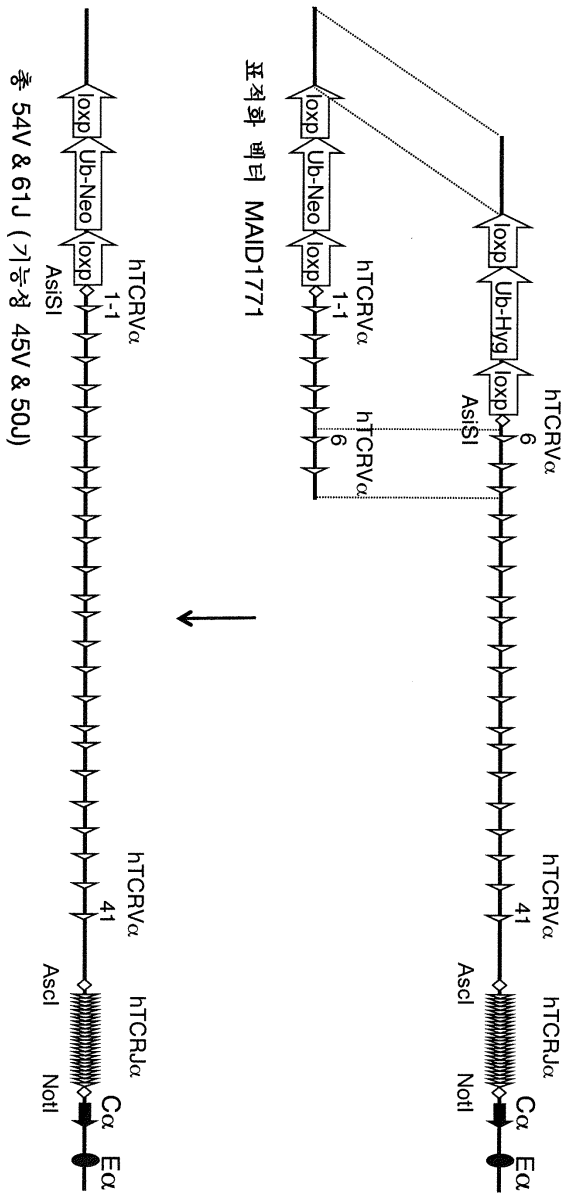
도면4e



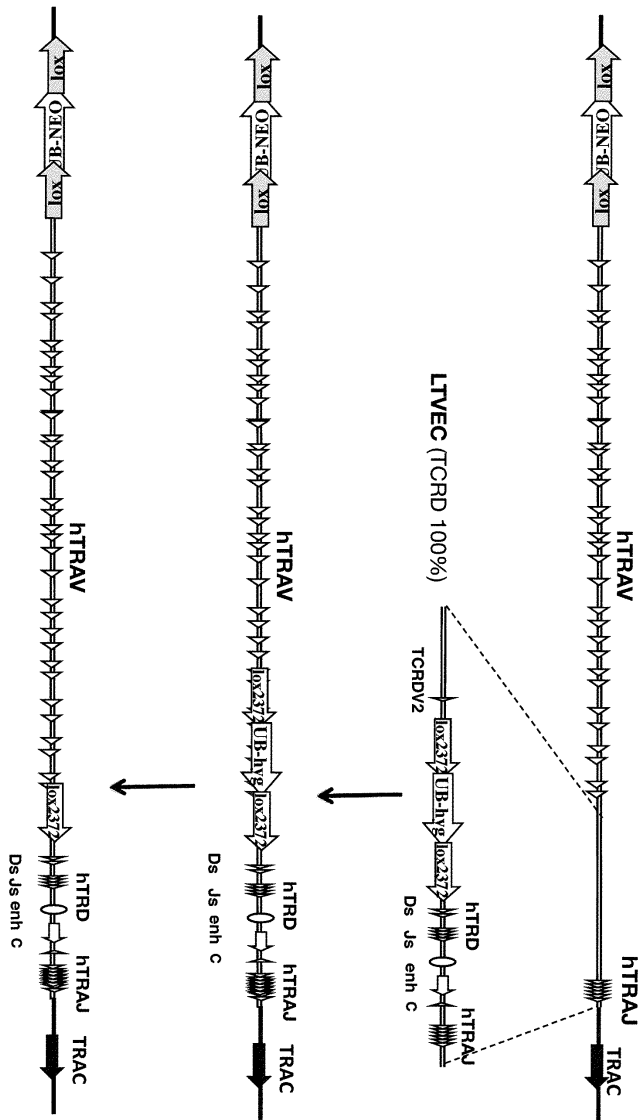
도면4f

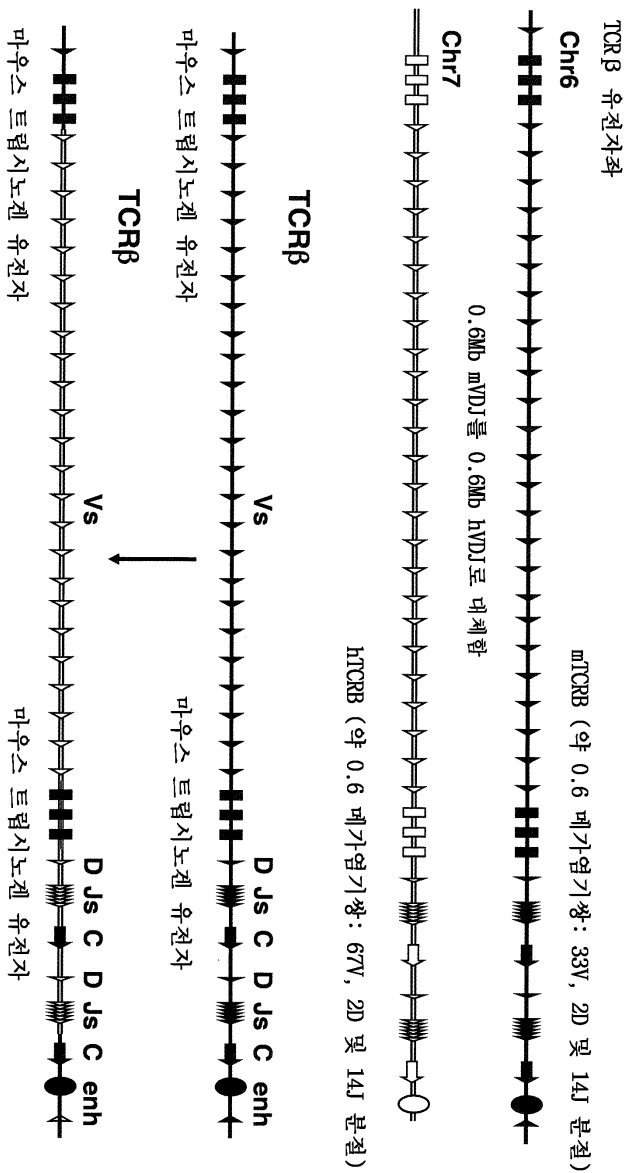


도면4g

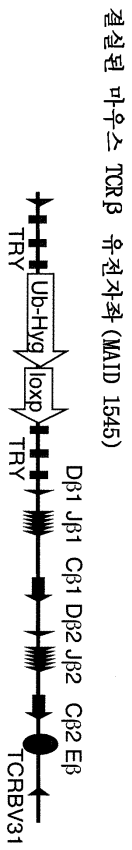
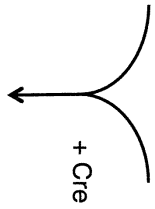
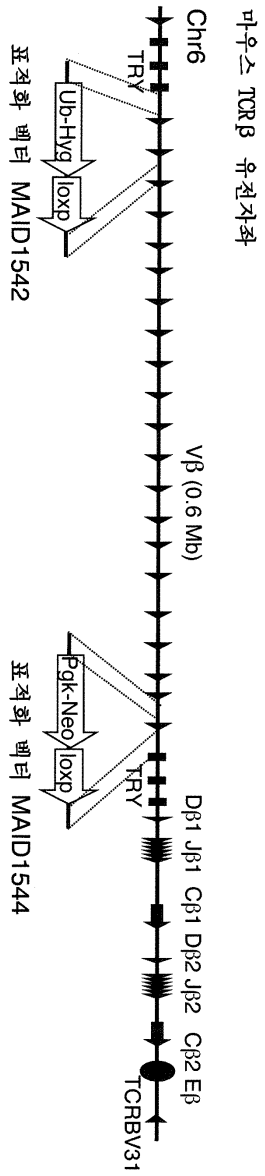


도면5

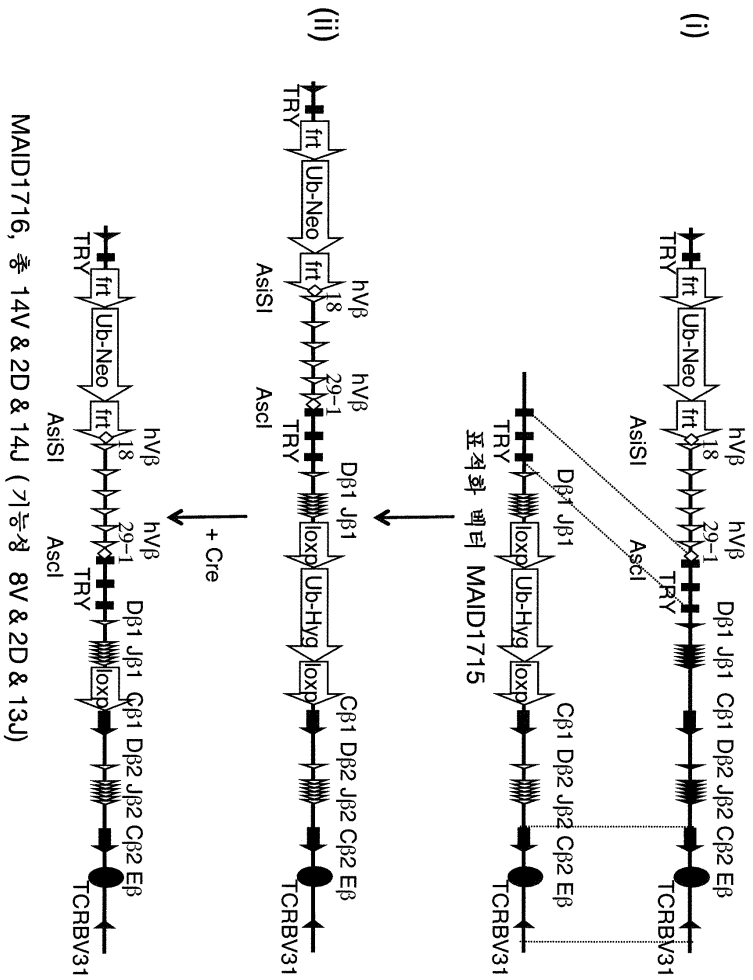




도면6

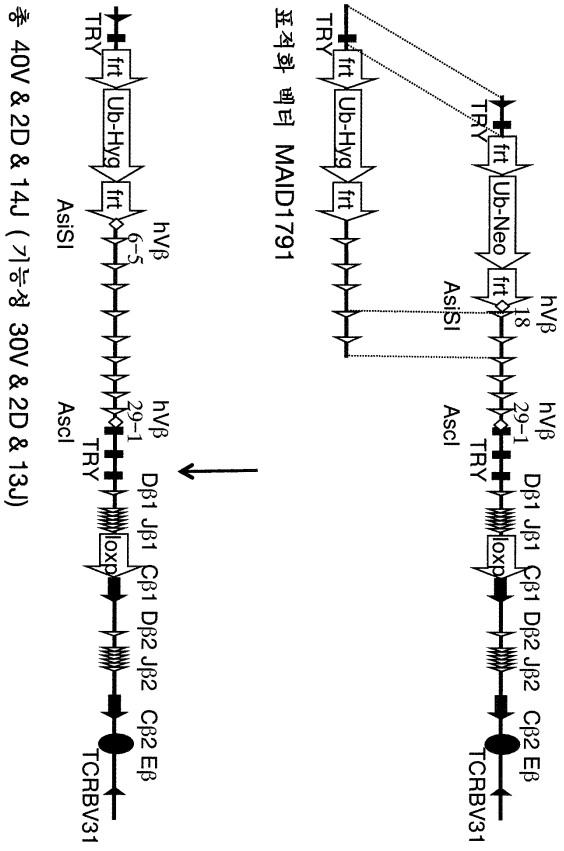


도면8a

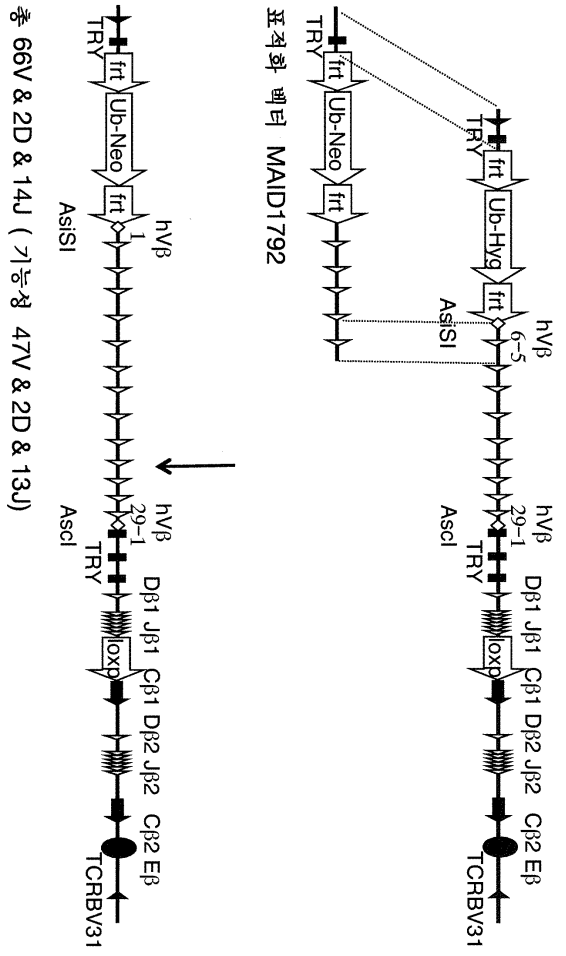


도면8c

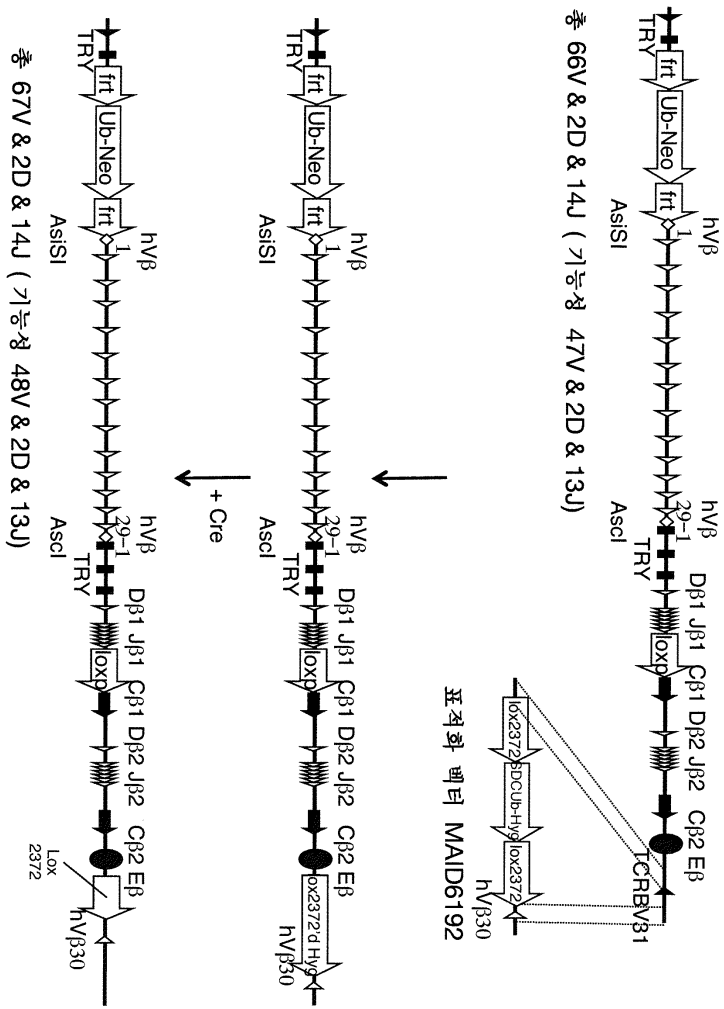
도면8d



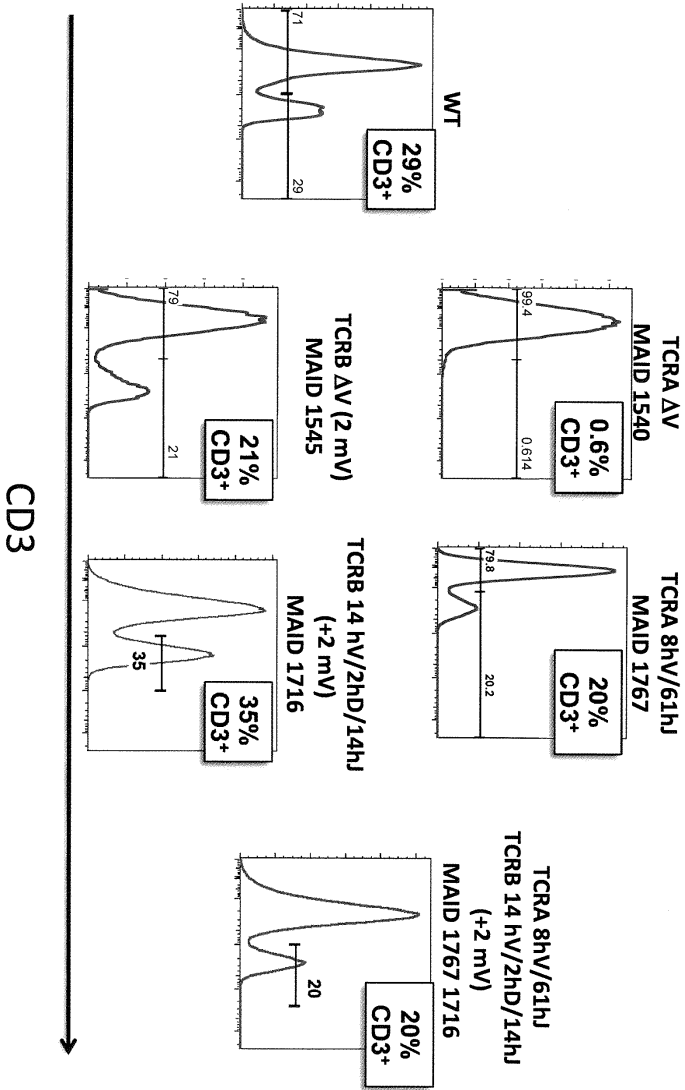
도면8e



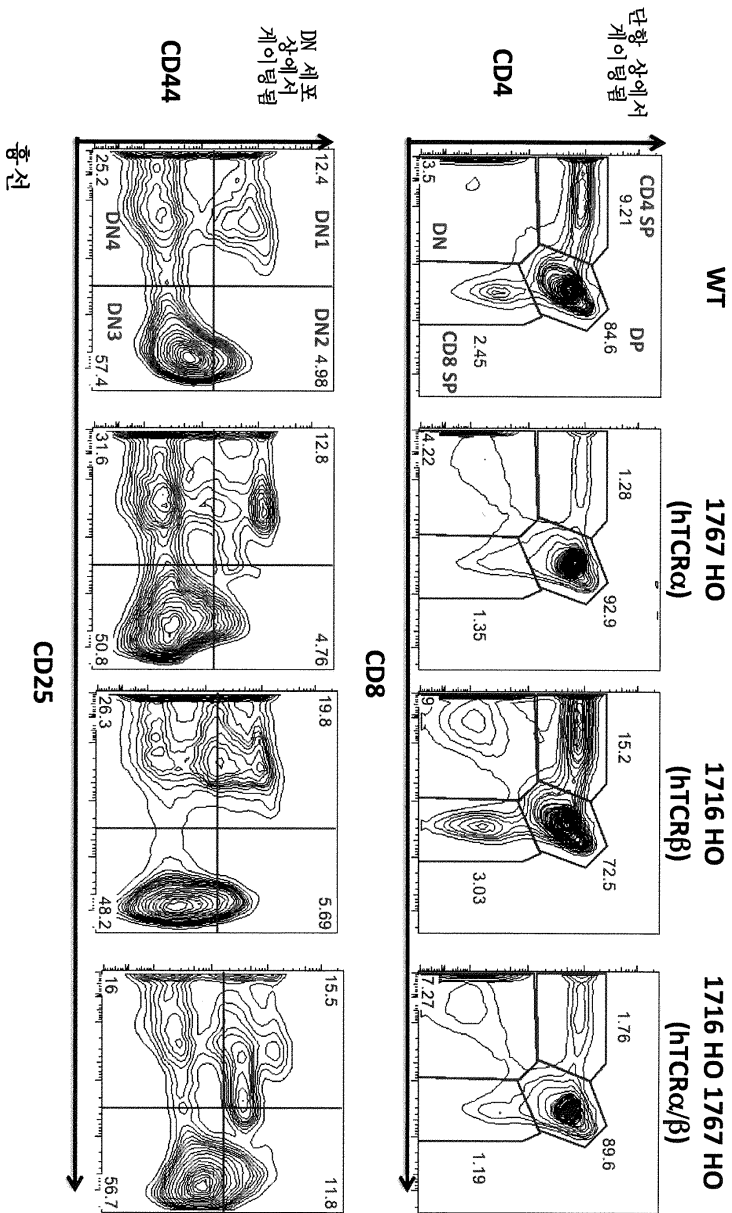
도면8f



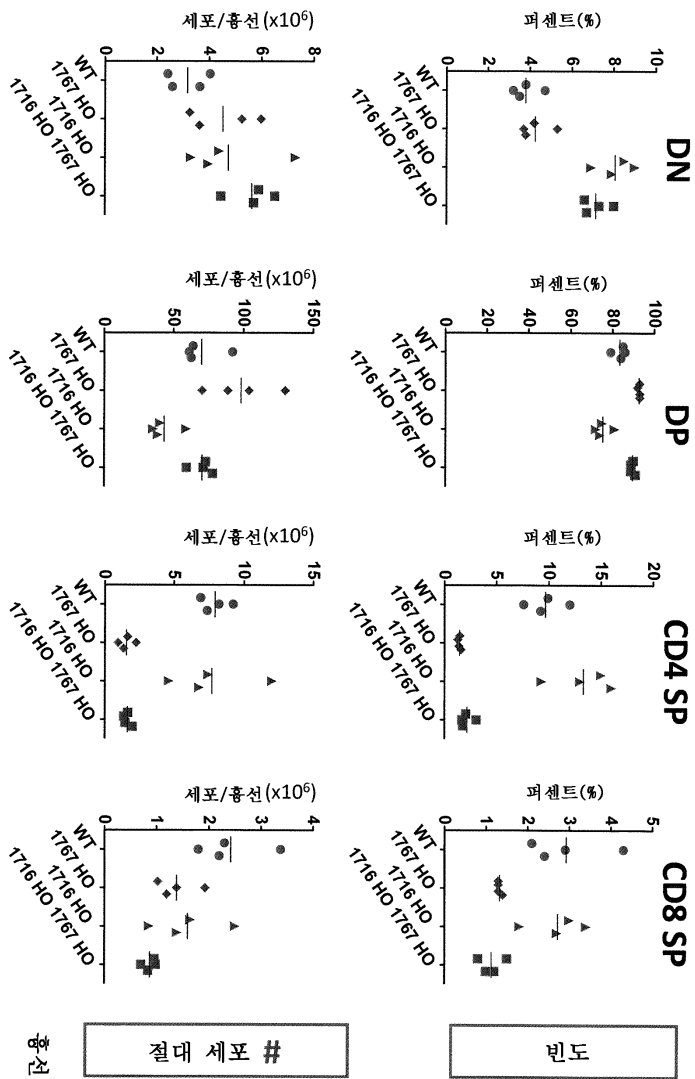
도면9



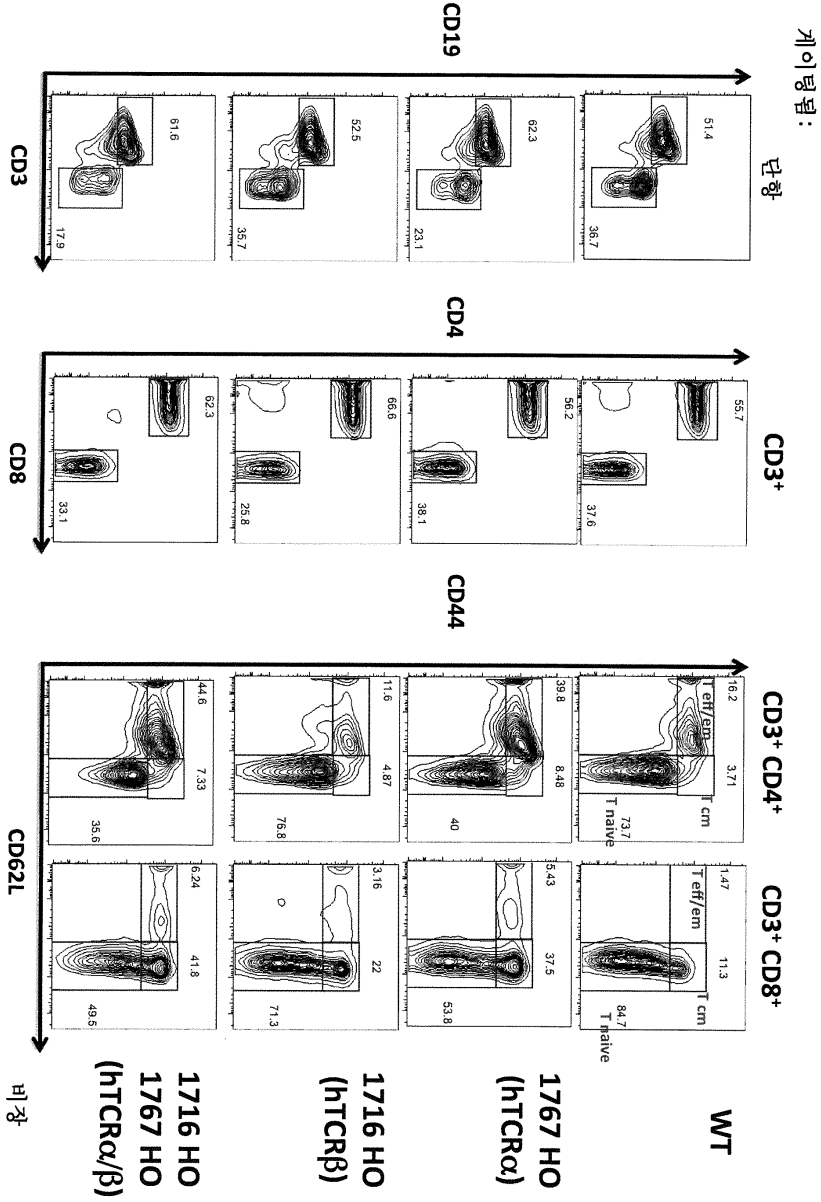
도면10



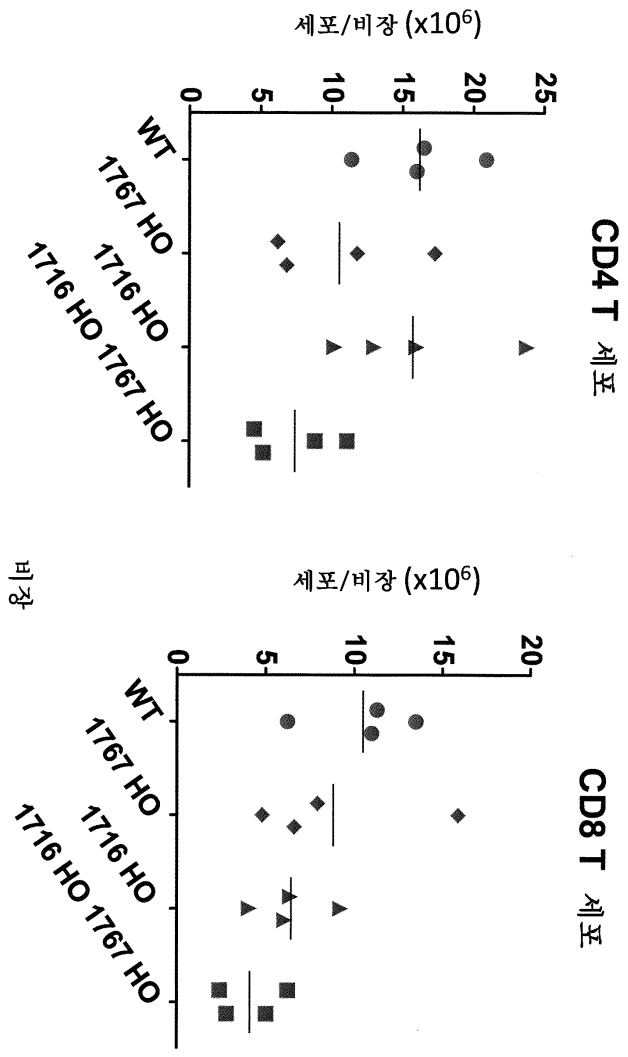
도면11



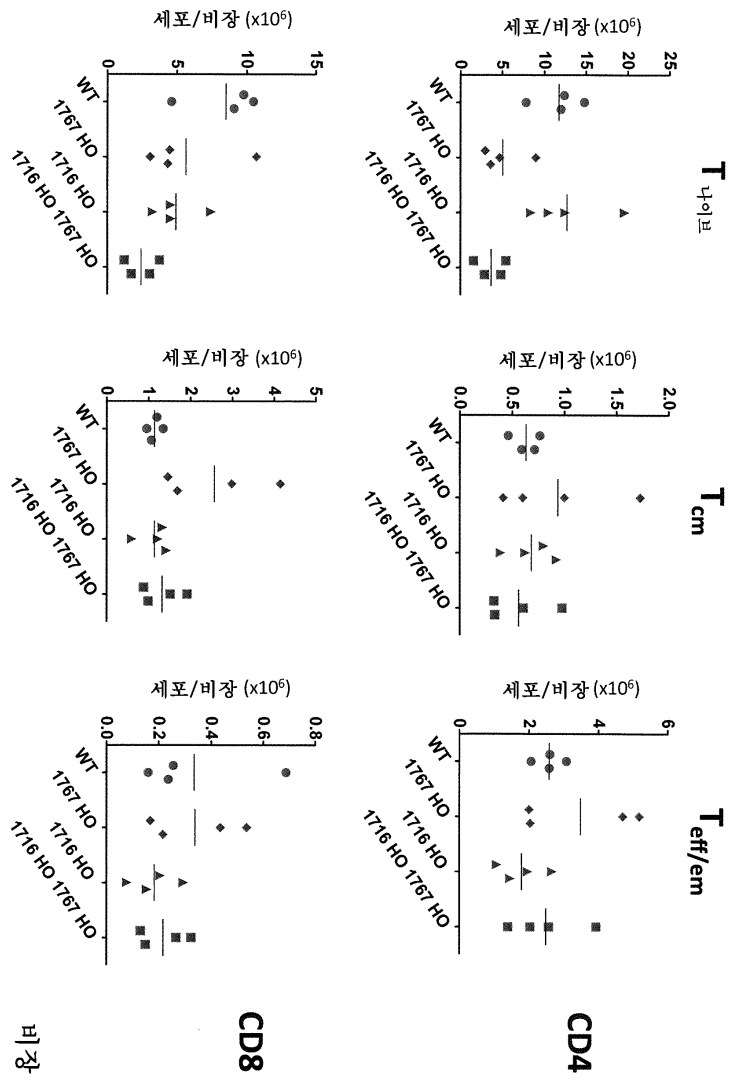
도면12



도면13



도면14



도면15a

hTRBV를 발현하는 CD8 T 세포의 퍼센트(%)

	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

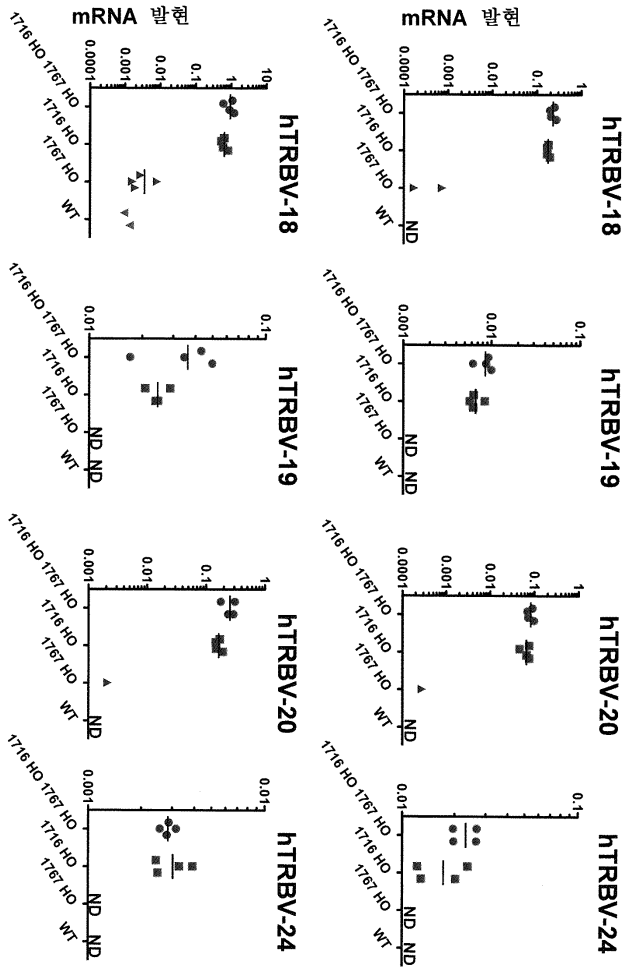
도면15b

hTRBV를 발현하는 CD4 T 세포의 퍼센트(%)

	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

도면16a

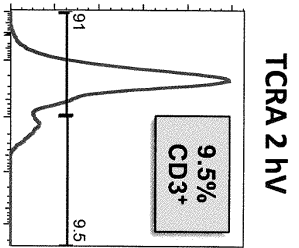
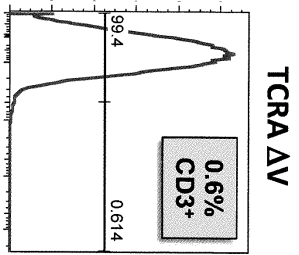
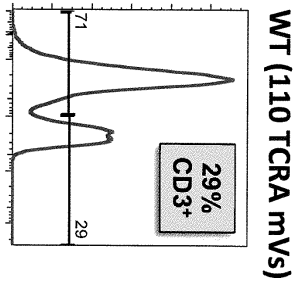
홍선



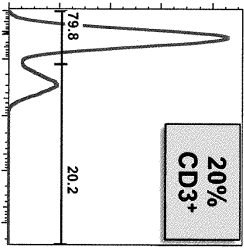
비장

전 비장 및 홍선, pTCRB 불변 1 (n = 4 마우스/그룹)에 대해 표준화된 mRNA
 ND = 미검출 (Ct ≥ 35)

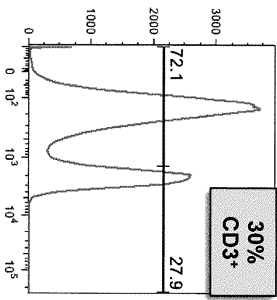
도면17



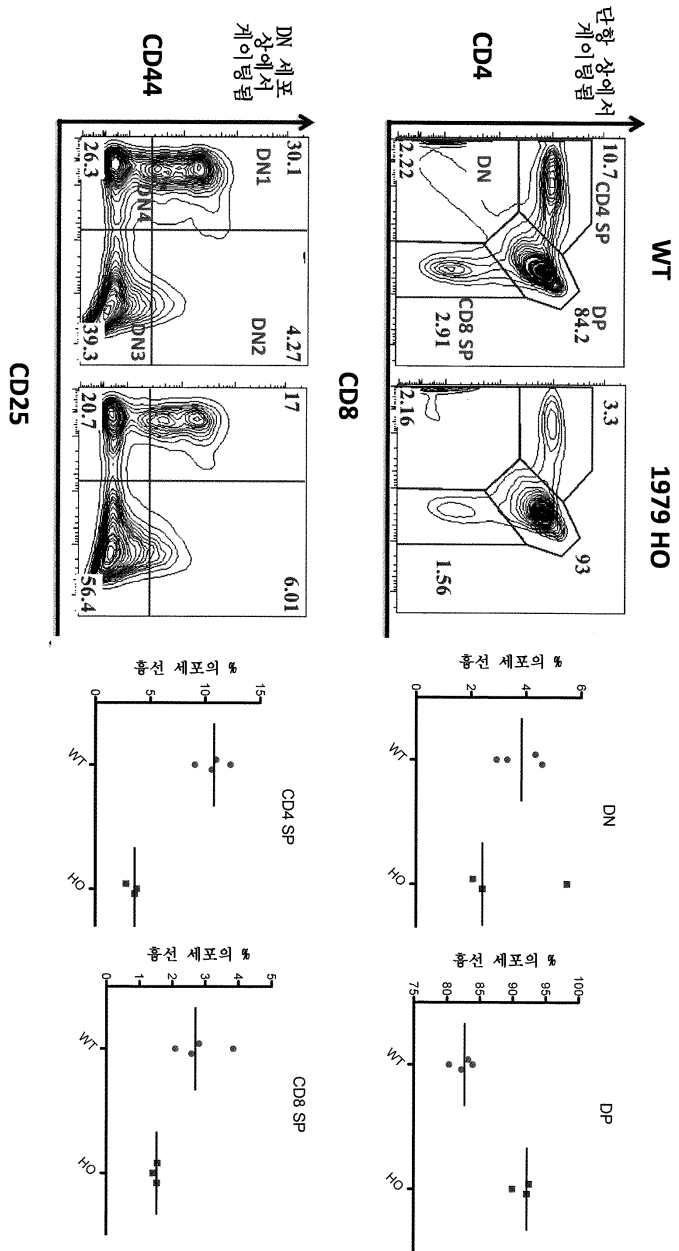
TCRA 8hv



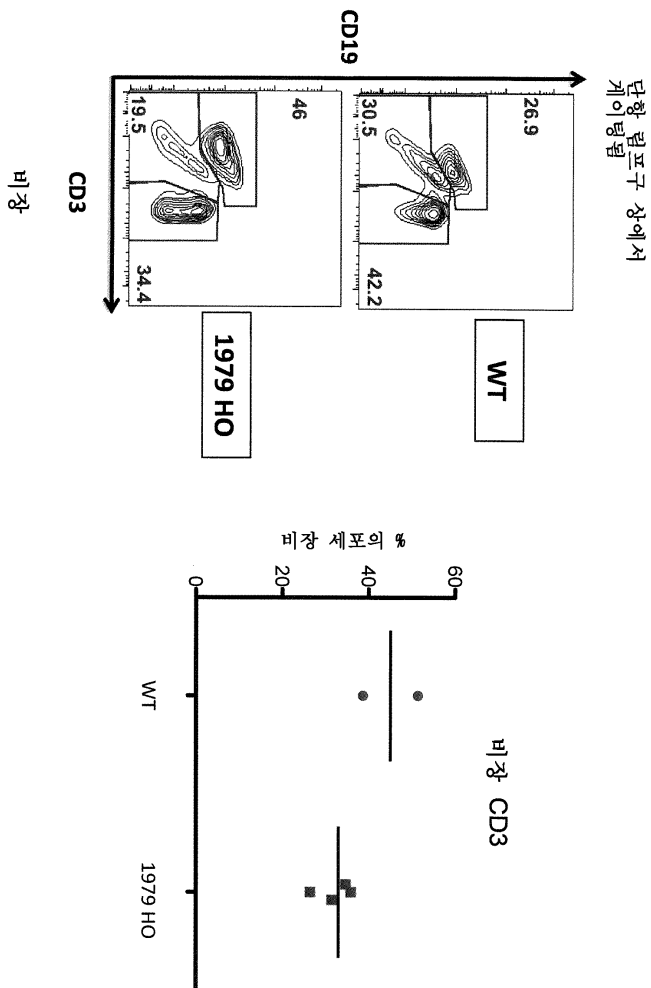
TCRA 23hv



도면18



도면19



서열목록

SEQUENCE LISTING

- <110> REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.
- <120> GENETICALLY MODIFIED T CELL RECEPTOR MICE
- <130> 1290A-WO
- <150> US 61/552,582
- <151> 2011-10-28
- <150> US 61/621,198
- <151> 2012-04-06
- <150> US 61/700,908
- <151> 2012-09-14
- <160> 54
- <170> Kopatent In 1.71

<210> 1

<211> 100

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 1

atggagtagt cagaacacac tcttcagaag ggactcctga tttcaaagg ggtaccgggc 60
 cccccctcga ggtcgacata acttcgtata gcatacatta 100

<210> 2

<211> 108

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 2

ggccatgcat ataacttctg atagcataca ttatacgaag ttataccggt gcgatcgcg 60
 gcttcctct tctaaccact aattcaaaaa ggattgtaag taatgttt 108

<210> 3

<211> 145

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 3

agacagacc ctaaaccct ccaaattaa agcggcaaag agataaggtt ggagctccac 60
 cgcggtggcg gccgccaccg cggaggagct cgaggtttcc ggtacttaac aacagagcac 120
 agatttagtg gtgagggact ctctc 145

<210> 4

<211> 100

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic
 <400> 4
 atggagtagt cagaacacac tttcagaag ggactcctga tttcaaaggg ggtaccgggc 60
 cccccctga ggtcgacata acttcgtata gcatacatta 100
 <210> 5
 <211> 109
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic
 <400> 5
 ggccatgcat ataacttctg atagcataca ttatacgaag ttataccggt gcgatcgctc 60
 aagcatgcaa gggtaacata tgttatgaga ttatattttc tttatctca 109
 <210> 6
 <211> 100
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic
 <400> 6
 atggagtagt cagaacacac tttcagaag ggactcctga tttcaaaggg ggtaccggg 60
 cccccctcg agaagttcct attccgaagt tcctattctc 100
 <210> 7
 <211> 108
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic
 <400> 7
 gttcctattc cgaagttcct attctctaga aagtatagga acttcctagg gcgatcgctc 60
 ctctccagge tcgaattagt attacagttg aggcacgttg tcttcccg 108
 <210> 8
 <211> 100
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<

220>

<223> Synthetic

<400> 8

atggagtagt cagaacacac tcttcagaag ggactcctga tttcaaagg ggtaccgggc 60
 cccccctcga ggtcgacata acttcgtata gcatacatta 100

<210> 9

<211> 108

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 9

ggccatgcat ataacttcgt atagcataca ttatacgaag ttataccggt gcgatcgccg 60
 cctccatttc ctccatagga aacatgaagt gaatggggct gtgtgtgt 108

<210> 10

<211> 100

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400

> 10

atggagtagt cagaacacac tcttcagaag ggactcctga tttcaaagg ggtaccgggc 60
 cccccctcga ggtcgacata acttcgtata gcatacatta 100

<210> 11

<211> 108

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 11

ggccatgcat ataacttcgt atagcataca ttatacgaag ttataccggt gcgatcgctg 60
 ggagcaggtt ccattattat aacaactttc tgaacacaag agggcagt 108

<210> 12

<211> 100

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 12

atggagtagt cagaacacac tcttcagaag ggactcctga tttcaaagg ggtaccgggc 60

ccccctcga ggtcgacata acttcgtata gcatacatta 100

<210> 13

<211> 108

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 13

ggccatgcat ataacttctg atagcataca ttatacgaag ttataccggt gcgatcgctt 60

taagtgagg aggcaggcaa taccctctt ccaccgatt ctcaatcc 108

<210> 14

<211> 100

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 14

gggggggtgg ggtggaggag gaggtacag catctctct ccttctctc tggtagcgaa 60

gttctattc cgaagttct attctctaga aagtatagga 100

<210> 15

<211> 108

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 15
gaagttccta ttctctagaa agtataggaa cttcctaggg tttcacggg gcgatcgcgt 60
gaatatacta aaaaccactt aattatataat ttgaaagggt ggatgtta 108

<210> 16
<211> 108
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic

<400> 16
ctctctccta cccagctcct ctcacacgag cctgaaggcc ctgccaaggt ggcgcgcctt 60
tcaaattggt gttgagttca aagtgggcaa cagaaaaggg ggtgtgag 108

<210> 17
<211> 130
<212>
> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic

<400> 17
aataaatagt aaatctctgt agaatcataa tgaggtctag acccccgggc tcgataacta 60
taacggtcct aaggtagcga aatggcgcgt aatcaagccc agctcttcat gctgcatttt 120
tatcttcttt 130

<210> 18
<211> 100
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic

<400> 18
ttgactcggg ggtgcctggg tttgactgca atgatcagtt gctgggaagg accgtataa 60
cttcgtataa tgtatgctat acgaagttat atgcatggcc 100

<210> 19
<211> 100

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic
 <400> 19
 ccggcgcgcc ataacttcgt ataatgtatg ctatacgaag ttatgtcgac ataagtaag 60
 acagagtcgt cccttcccat ctggaaccct ctacctttct 100
 <210> 20
 <211> 107
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic
 <400> 20
 gtgtatgaat cataaaagaa gagatattca agaaaaggat ggccacactg cggccgcaga 60
 ggtattcaag gaaaatgcag actcttcacg taagaggat gaggggc 107
 <210> 21
 <211> 100
 <212>
 > DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic
 <400> 21
 tccccggagt cggagggtgg accggagctg gaggagctgc cgcggtggcg gccgatgcca 60
 ttccattacc tctttctccg cacccgacat agataaagct 100
 <210> 22
 <211> 100
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic
 <400> 22
 gggggggtgg ggtggaggag gagggtacag catctctct ccttctctc tggtagcga 60
 gtctctatc cgaagttcct attctctaga aagtatagga 100

<210> 23

<211> 108

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 23

gaagttccta ttctctagaa agtataggaa cttcctaggg tttcaccggt gcgatcgca 60
agcaattaac tgcccctggt ccagttgcct cctctgataa tgcattgt 108

<210> 24

<211> 100

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 24

gggggggtgg ggtggaggag gagggtacag catctctct ccttcctctc tggtagcgaa 60
gttcctattc cgaagttcct attctctaga aagtagtagga 100

<210> 25

<211> 108

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 25

gaagttccta ttctctagaa agtataggaa cttcctaggg tttcaccggt gcgatcgcg 60
tatctagtag acttaattaa ggatcgatcc ggcgcgcaa tagtcatg 108

<210> 26

<211> 100

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 26
 gttttccaga cttcaacttg actatcagcc agaaattcag tggcaaacc ccaccagtc 60
 cctaagtgaa ggcccctggg gagtatggtt agggctcagg 100
 <210> 27
 <211> 100
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic
 <400> 27
 caccaccaa agaaagtgcc caggagaagg gcaaggagag agcagagcat agttcaagat 60

 ggtctttgtc taggcttgtc tactctgcac ttgtacttcc 100
 <210> 28
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic
 <400> 28
 ccggcgtcat gcagaa 16
 <210> 29
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic
 <400> 29
 gggctgcatc tcagtcttgc 20
 <210> 30
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic

<400> 30

cacctggtca ggaggagg

18

<210> 31

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 31

ggaatcactc agtccccaaa g

21

<210> 32

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 32

attctgttca caactcaggg tca

23

<210> 33

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 33

tcagaaagga aggacagaat

20

<210> 34

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 34

cgagcaaggc gtcgagaa	18
<210> 35	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Synthetic	
<400> 35	
ggacaaggtc aggcttgca	19
<210> 36	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Synthetic	
<400> 36	
acaagtttct catcaacc	18
<210> 37	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Synthetic	
<400> 37	
tgttaccag accccaagga	20
<210> 38	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Synthetic	
<400> 38	
tctgagaaca ttccagcata atcct	25
<210> 39	

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 39

taggatcaca aagacaggaa

20

<210> 40

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 40

tcccctgacc ctggagtct

19

<210> 41

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 41

tgctggcaca gaggtactga ga

22

<210> 42

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 42

caggccctca catac

15

<210> 43

<211> 19

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic
 <400> 43
 aagcccaagt gaccagaa 19
 <210> 44
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic
 <400> 44
 attctgagaa caagtcactg ttaacttc 28
 <210> 45
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic
 <400> 45

 ctcatcacag tgactggaa 19
 <210> 46
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic
 <400> 46
 gtgaaagtaa cccagagctc gag 23
 <210> 47
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic
 <400> 47
 atcctggaca cattccagaa aaac 24
 <210> 48
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic
 <400> 48

 atatctagtc aaaaggacgg ga 22
 <210> 49
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic
 <400> 49
 tgtcattgac aagtttccca tcag 24
 <210> 50
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic
 <400> 50
 tgctgtcttc agggctcatg 20
 <210> 51
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic

<400> 51

tcaactctga ctgtgagca

19

<210> 52

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 52

agccgcctga gggctctct

18

<210> 53

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 53

gccacttgtc ctctctgaa ag

22

<210> 54

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 54

taccttctgg cacaatcctc gca

23