



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 117384960 B

(45) 授权公告日 2024.03.12

(21) 申请号 202311667117.0

C07K 14/705 (2006.01)

(22) 申请日 2023.12.07

A01K 67/0278 (2024.01)

A61K 49/00 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 117384960 A

(56) 对比文件

CN 115011606 A, 2022.09.06

US 2012079611 A1, 2012.03.29

CN 113088537 A, 2021.07.09

US 2017042129 A1, 2017.02.16

WO 2006127900 A2, 2006.11.30

NP_005109.2, tumor necrosis factor

ligand superfamily member 15 isoform

VEGI-251 precursor [Homo sapiens]

.GenBank.2023, 第1-3页.

潘欣等. 内皮抑素-可溶性血管内皮细胞生长抑制因子融合基因重组腺病毒的包装与鉴定. 《世界华人消化杂志》. 2003, 第11卷(第06期), 第741-744页.

(43) 申请公布日 2024.01.12

(73) 专利权人 百奥赛图(北京)医药科技股份有限公司

地址 102600 北京市大兴区中关村科技园
区大兴生物医药产业基地宝参南街12
号院

(72) 发明人 李冲 张芝 张淑金

(74) 专利代理机构 北京领科知识产权代理事务所
(特殊普通合伙) 11690

专利代理师 徐丹丹

审查员 周凯燕

(51) Int. Cl.

C12N 15/85 (2006.01)

C12N 15/90 (2006.01)

C12N 15/12 (2006.01)

权利要求书2页 说明书31页

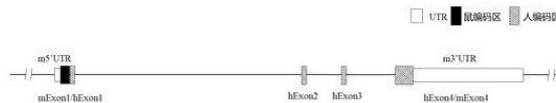
序列表(电子公布) 附图3页

(54) 发明名称

一种TL1A基因人源化非人动物及其构建方法和应用

(57) 摘要

本发明属于动物基因工程、基因遗传修饰和生物医药领域,具体地说,涉及一种TL1A基因人源化的非人动物及其构建方法和在生物医药领域的应用。所述的构建方法利用同源重组的方式将编码人TL1A蛋白的全部或部分核苷酸序列导入非人动物基因组中,获得的非人动物能正常表达人或人源化TL1A蛋白,可以作为人TL1A信号机理研究、肿瘤或炎症药物筛选的动物模型,对免疫靶点的新药研发具有重要的应用价值。



1. 一种TL1A基因人源化的非人动物模型的构建方法,其特征在于,所述的非人动物模型体内表达人源化TL1A蛋白,和/或,所述的非人动物模型基因组中包含人源化TL1A基因;所述的人源化TL1A基因编码所述的人源化TL1A蛋白;

所述的人源化TL1A蛋白包含人TL1A蛋白的胞外区的部分和非人动物内源TL1A蛋白的部分,和/或,所述的人源化TL1A基因包含人TL1A基因的部分和非人动物内源TL1A基因的部分;

所述的构建方法包括将人TL1A基因中编码人TL1A蛋白的胞外区的部分核苷酸序列导入非人动物内源TL1A基因座;

所述的人源化TL1A蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO:9所示;

所述的非人动物模型为小鼠;

所述的非人动物模型的内源TL1A蛋白表达降低或缺失。

2. 根据权利要求1所述的构建方法,其特征在于,导入的人TL1A基因的部分包含人TL1A基因1号外显子的部分、2号至3号外显子的全部和4号外显子的部分,其中,人TL1A基因的1号外显子的部分至少包含5bp的人TL1A基因的1号外显子,人TL1A基因的4号外显子的部分至少包含50bp的人TL1A基因的4号外显子。

3. 根据权利要求1所述的构建方法,其特征在于,导入的人TL1A基因的部分包含SEQ ID NO:7所示核苷酸序列。

4. 根据权利要求1所述的构建方法,其特征在于,所述的导入包括插入或替换。

5. 根据权利要求1所述的构建方法,其特征在于,所述的构建方法还包括将TL1A基因人源化的非人动物模型与其他基因修饰的非人动物模型交配、体外受精或直接进行基因编辑,并进行筛选,得到多基因修饰的非人动物模型;

其中,所述的其他基因包括IL23A、IL12B、TNFA、TNFR1、TNFR2、PD-1、PD-L1、CTLA4、4-1BB、CD3或LAG3中的至少一种。

6. 根据权利要求1所述的构建方法,其特征在于,所述的构建方法包括使用靶向载体进行TL1A基因人源化的非人动物模型的构建。

7. 根据权利要求6所述的构建方法,其特征在于,所述的靶向载体还包含5' 臂和/或3' 臂;

其中,所述的5' 臂包含如SEQ ID NO:3或5所述的核苷酸序列;

所述的3' 臂包含如SEQ ID NO:4或6所述的核苷酸序列。

8. 根据权利要求1所述的构建方法,其特征在于,所述的人源化TL1A基因转录的mRNA如SEQ ID NO:8所示。

9. 一种人源化TL1A蛋白,其特征在于,所述的人源化TL1A蛋白包含人TL1A蛋白的胞外区的部分,以及,非人动物内源TL1A蛋白的部分;

所述的人源化TL1A蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO:9所示;

所述的非人动物为小鼠。

10. 一种人源化TL1A基因,其特征在于,所述的人源化TL1A基因编码权利要求9所述的人源化TL1A蛋白。

11. 根据权利要求10所述的人源化TL1A基因,其特征在于,所述的人源化TL1A基因转录的mRNA如SEQ ID NO:8所示。

12. 一种细胞、组织或器官,其特征在於,所述的细胞、组织或器官表达权利要求9所述的人源化TL1A蛋白,或者,所述的细胞、组织或器官的基因组中包含权利要求10或11所述的人源化TL1A基因,或者,所述的细胞、组织或器官来源于权利要求1-8任一所述的构建方法获得的非人动物模型;

所述的细胞不能发育为动物个体。

13. 一种权利要求1-8任一所述的构建方法获得的非人动物模型的应用,其特征在於,所述的应用包括:

- A) 涉及人类细胞的免疫过程的产品开发中的应用;
- B) 作为药理学、免疫学、微生物学和医学研究的模型系统中的应用;
- C) 涉及生产和利用动物实验疾病模型的病原学研究,所述的应用为非疾病的诊断和治疗目的。

一种TL1A基因人源化非人动物及其构建方法和应用

技术领域

[0001] 本发明属于动物基因工程、基因遗传修饰和生物医药领域,具体地说,涉及一种TL1A基因人源化的非人动物及其构建方法和在生物医药领域的应用。

背景技术

[0002] TL1A又称TNFSF15,是肿瘤坏死因子(TNF)配体超家族成员,又称为血管生长抑制因子(VEGI),是主要由血管内皮细胞分泌的细胞因子。TNFSF15能够在促进VEGF的膜受体VEGFR1降解的同时上调游离形式的VEGFR1的表达,因此,能够将VEGF/VEGFR1引起的促血管新生信号转换成抑制血管新生信号。TNFSF15能够抑制VEGF引起的VEGFR2磷酸化,因此阻断VEGFR2介导血管通透性增加,这使得TNFSF15能被用于治疗病理性的血管通透性增加相关的疾病。同时,TNFSF15蛋白具有活化T细胞、促进炎症因子分泌等生理活性,在免疫调节及炎症性疾病中发挥重要作用。通过靶向该靶点抗体可治疗炎症相关疾病。

[0003] 然而,由于动物与人类在生理学及病理学方面存在差异,加上基因的复杂性,例如,TL1A的人鼠同源性仅为66%,如何能构建出“有效”的人源化动物模型用于新药研发仍是最大的挑战。

[0004] 鉴于TL1A在炎症免疫治疗领域的巨大应用价值和抗肿瘤治疗领域的潜在价值,为进一步探索其相关生物学特性,提高临床前期药效试验的有效性,提高研发成功率,使临床前期的试验更有效并使研发失败最小化,本领域急需开发TL1A相关信号通路的非人动物模型。此外,本方法得到的非人动物还可与其它基因人源化非人动物交配得到多基因人源化动物模型,用于筛选和评估针对该信号通路的人用药及联合用药的药效研究。本发明在学术和临床研究中具有广阔的应用前景。

发明内容

[0005] 本申请用人源正常或突变基因替换动物基因组的同源基因,可建立更接近人类生理或疾病特征的正常或突变基因动物模型。基因人源化动物不但本身具有重要应用价值,如通过基因人源化可改进和提升细胞或组织移植人源化动物模型,更重要的是,由于人类基因片段的插入,动物体内可表达或部分表达人源蛋白,可作为仅能识别人蛋白序列的药物的靶点,为在动物水平进行抗人抗体及其它药物的筛选提供了可能。

[0006] 本发明的第一方面,提供了一种TL1A基因人源化的非人动物的构建方法。

[0007] 优选的,所述的非人动物体内表达人或人源化TL1A蛋白,和/或,所述的非人动物基因组中包含人TL1A基因的部分,或,人源化TL1A基因。

[0008] 优选的,所述的非人动物的内源TL1A蛋白表达降低或缺失。

[0009] 优选的,所述的非人动物的基因组中包含人TL1A基因的部分,优选包含人TL1A基因的1号至4号外显子的全部或部分,进一步优选包含人TL1A基因的1号外显子、2号外显子、3号外显子或4号外显子中的一种或两种以上外显子的组合,更优选包含人TL1A基因的1号外显子的全部或部分、2号至3号外显子的全部和4号外显子的全部或部分,优选还包含1-2

号内含子和/或3-4号内含子,其中,人TL1A基因的1号外显子的部分至少包含5bp到237bp,例如5、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230或237bp连续核苷酸序列,优选的,所述的人TL1A基因的1号外显子的部分包含编码胞外区的全部或部分的核苷酸序列,例如连续5-30bp编码胞外区的核苷酸序列。人TL1A基因的4号外显子的部分至少包含50bp到6255bp,例如50、100、150、200、250、300、350、400、450、452、455、500、600、700、800、900、1000、2000、3000、4000、5000、6000、6100、6200或6255bp连续核苷酸序列,优选的,所述的人TL1A基因的4号外显子的部分包含4号外显子中编码区的核苷酸序列。

[0010] 在本发明的一个具体实施方式中,所述的非人动物基因组中包含的人TL1A基因的部分包含SEQ ID NO:7所示核苷酸序列;或者,包含与SEQ ID NO:7所示核苷酸序列同一性至少为70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或至少99%的核苷酸序列;或者,包含与SEQ ID NO:7所示核苷酸序列差异不超过10、9、8、7、6、5、4、3、2或不超过1个核苷酸的核苷酸序列;或者,包含与SEQ ID NO:7所示的,包括取代、缺失和/或插入一个或多个核苷酸的核苷酸序列。

[0011] 优选的,所述的非人动物的基因组中包含编码人或人源化TL1A蛋白的全部或部分的核苷酸序列,进一步优选包含编码人TL1A蛋白的胞外区、跨膜区和/或胞质区的全部或部分的核苷酸序列;进一步优选包含编码人TL1A蛋白的至少20个到251个,例如至少20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、191、192、193、194、195、200、210、220、230、240、250或251个连续氨基酸序列的核苷酸序列;更优选包含编码人TL1A蛋白的胞外区的全部或部分的核苷酸序列;更进一步优选包含编码人TL1A蛋白的至少20个到195个,例如至少20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、191、192、193、194或195个连续氨基酸序列的核苷酸序列;再优选包含编码N端去除0-10(例如0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10)个氨基酸的人TL1A蛋白胞外区的核苷酸序列。

[0012] 在本发明的一个具体实施方式中,所述的非人动物基因组中包含编码SEQ ID NO:2的第61-251、58-251或57-251位所示氨基酸序列的核苷酸序列;或者,包含与编码SEQ ID NO:2的第61-251、58-251或57-251位所示氨基酸序列的核苷酸序列同一性至少为70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或至少为99%的核苷酸序列;或者,包含与编码SEQ ID NO:2的第61-251、58-251或57-251位所示氨基酸序列的核苷酸序列差异不超过10、9、8、7、6、5、4、3、2或不超过1个核苷酸的核苷酸序列;或者,包含与编码SEQ ID NO:2的第61-251、58-251或57-251位所示氨基酸序列的核苷酸序列所示的,包括取代、缺失和/或插入一个或多个核苷酸的核苷酸序列。

[0013] 优选的,所述的非人动物的至少一个细胞的基因组中包含编码人或人源化TL1A蛋白的核苷酸序列、人TL1A基因的部分或人源化TL1A基因。

[0014] 优选的,编码人或人源化TL1A蛋白的核苷酸序列、人TL1A基因的部分或人源化TL1A基因的核苷酸序列可操作的连接到非人动物至少一条染色体中的内源TL1A基因座上的内源性调控元件。

[0015] 优选的,所述的非人动物通过靶向非人动物内源TL1A基因的靶向载体构建获得。

[0016] 优选的,所述的构建方法包括将供体核苷酸序列导入非人动物内源TL1A基因座上,所述的供体核苷酸序列包含下列组中任一种:

[0017] A) 人TL1A基因的部分, 优选包含人TL1A基因的1号至4号外显子的全部或部分, 进一步优选包含人TL1A基因的1号外显子、2号外显子、3号外显子或4号外显子中的一种或两种以上外显子的组合, 更优选包含人TL1A基因的1号外显子的全部或部分、2号至3号外显子的全部和4号外显子的全部或部分, 优选还包含1-2号内含子和/或3-4号内含子, 其中, 人TL1A基因的1号外显子的部分至少包含5bp到237bp, 例如5、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230或237bp连续核苷酸序列, 优选的, 所述的人TL1A基因的1号外显子的部分包含编码胞外区的全部或部分的核苷酸序列, 例如连续5-30bp编码胞外区的核苷酸序列; 人TL1A基因的4号外显子的部分至少包含50bp到6255bp, 例如50、100、150、200、250、300、350、400、450、452、455、500、600、700、800、900、1000、2000、3000、4000、5000、6000、6100、6200或6255bp连续核苷酸序列, 优选的, 所述的人TL1A基因的4号外显子的部分包含4号外显子中编码区的核苷酸序列; 更进一步优选包含SEQ ID NO:7所示核苷酸序列; 或者, 包含与SEQ ID NO:7所示核苷酸序列同一性至少为70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或至少99%的核苷酸序列; 或者, 包含与SEQ ID NO:7所示核苷酸序列差异不超过10、9、8、7、6、5、4、3、2或不超过1个核苷酸的核苷酸序列; 或者, 包含与SEQ ID NO:7所示的, 包括取代、缺失和/或插入一个或多个核苷酸的核苷酸序列;

[0018] B) 编码人TL1A蛋白的全部或部分的核苷酸序列, 优选包含编码人TL1A蛋白的胞外区、跨膜区和/或胞质区的全部或部分的核苷酸序列; 进一步优选包含编码人TL1A蛋白的至少20个到251个, 例如至少20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、191、192、193、194、195、200、210、220、230、240、250或251个连续氨基酸序列的核苷酸序列; 更优选包含编码人TL1A蛋白的胞外区的全部或部分的核苷酸序列; 更进一步优选包含编码人TL1A蛋白的至少20个到195个, 例如至少20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、191、192、193、194或195个连续氨基酸序列的核苷酸序列, 再优选包含编码N端去除0-10 (例如0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10) 个氨基酸的人TL1A蛋白胞外区的核苷酸序列; 再进一步优选包含编码SEQ ID NO:2的第61-251、58-251或57-251位所示氨基酸序列的核苷酸序列; 或者, 包含与编码SEQ ID NO:2的第61-251、58-251或57-251位所示氨基酸序列的核苷酸序列同一性至少为70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或至少为99%的核苷酸序列; 或者, 包含与编码SEQ ID NO:2的第61-251、58-251或57-251位所示氨基酸序列的核苷酸序列差异不超过10、9、8、7、6、5、4、3、2或不超过1个核苷酸的核苷酸序列; 或者, 包含与编码SEQ ID NO:2的第61-251、58-251或57-251位所示氨基酸序列的核苷酸序列所示的, 包括取代、缺失和/或插入一个或多个核苷酸的核苷酸序列;

[0019] C) 编码人源化TL1A蛋白的核苷酸序列; 或,

[0020] D) 人源化TL1A基因。

[0021] 优选的, 所述的导入包括插入或替换。

[0022] 其中, 所述的插入为在不删除核苷酸的前提下, 将目的片段置于相邻两个碱基之间, 其中, 目的片段例如人TL1A基因、人源化TL1A基因、编码人或人源化TL1A蛋白的核苷酸序列、人TL1A基因与非人动物内源TL1A基因拼接获得的核苷酸序列, 当然也可以是人TL1A基因的部分核苷酸序列。

[0023] 在本发明的一个具体实施方式中,导入非人动物内源TL1A基因座上的核苷酸序列还包含抗性基因,优选的,导入非人动物内源TL1A基因座上的核苷酸序列还包含抗性基因两侧的两个同向排列的Frt重组位点。

[0024] 在本发明的一个具体实施方式中,所述的抗性基因为新霉素磷酸转移酶编码基因Neo。

[0025] 优选的,在所述的非人动物的基因组中,包含人TL1A基因的部分和非人动物内源TL1A基因的部分,人TL1A基因的5'端与非人动物内源TL1A基因的部分连接的序列包括如SEQ ID NO:10所示核苷酸序列;或者,包含与SEQ ID NO:10所示核苷酸序列同一性至少为70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或至少99%的核苷酸序列。人TL1A基因的3'端与非人动物内源TL1A基因的部分连接的序列包括如SEQ ID NO:11所示核苷酸序列;或者,包含与SEQ ID NO:11所示核苷酸序列同一性至少为70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或至少99%的核苷酸序列。

[0026] 在本发明的一个具体实施方式中,导入非人动物内源TL1A基因座上的核苷酸序列还包含SEQ ID NO:12和/或13任一所示核苷酸序列;或者,包含与SEQ ID NO:12和/或13任一所示核苷酸序列同一性至少为70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或至少99%的核苷酸序列。

[0027] 优选的,导入非人动物内源TL1A基因座上的任一核苷酸序列可操作的连接到调控元件,进一步优选的,所述的调控元件为内源性调控元件或外源性调控元件。优选的,所述的调控元件包括但不限于启动子。

[0028] 优选的,内源性调控元件来源于非人动物内源TL1A基因,外源性调控元件来源于人TL1A基因。

[0029] 优选的,所述的构建方法包括修饰非人动物TL1A基因的编码框,将包含如上所述的人TL1A基因的核苷酸序列插入非人动物内源TL1A基因内源调控元件之后,其中,所述的修饰非人动物内源TL1A基因的编码框可以采用敲除非人动物内源TL1A基因的功能区或者采用插入一段序列,使得非人动物内源TL1A蛋白不表达或表达降低或表达的蛋白无功能。

[0030] 优选的,根据具体实施方式的需要,所述的插入还可能破坏非人动物内源TL1A基因的编码框或破坏插入序列之后的内源TL1A基因的编码框,随后进行插入操作,或者,所述的插入步骤既可以给内源TL1A基因造成移码突变又可以实现插入人源序列的步骤。

[0031] 优选的,所述的插入位点为非人动物内源TL1A基因的内源调控元件之后。

[0032] 在本发明的一个具体实施方式中,所述的构建方法包括将编码人或人源化TL1A蛋白的核苷酸序列、人或人源化TL1A基因的核苷酸序列,和/或,辅助序列插入非人动物内源TL1A基因内源调控元件之后,所述的辅助序列可以为具有终止功能的序列,使得TL1A基因人源化的动物模型体内表达人或人源化TL1A蛋白,而不表达非人动物内源TL1A蛋白。进一步优选的,所述的辅助序列可以为WPRE和/或STOP序列。

[0033] 其中,所述的替换包括相应位置的替换或不相应位置的替换。所述的相应位置的替换并不仅仅机械的代表人与非人动物内源TL1A基因碱基位点直接对应的替换,还包括相应功能区的替换。

[0034] 优选的,所述的导入非人动物内源TL1A基因座为替换非人动物相应区域,进一步优选替换非人动物基因组中编码非人动物内源TL1A蛋白的全部或部分的核苷酸序列,更优

选替换非人动物基因组中编码非人动物内源TL1A蛋白的胞外区的全部或部分的核苷酸序列。

[0035] 优选的,非人动物内源TL1A基因的1号至4号外显子的全部或部分被替换,进一步优选1号外显子的部分、2号至3号外显子的全部和4号外显子的部分被替换,优选1-2号内含子和/或3-4号内含子也被替换。

[0036] 优选的,非人动物基因组中编码SEQ ID NO:1所示氨基酸序列的核苷酸序列被替换,进一步优选编码SEQ ID NO:1第61-252、63-252或66-252位所示氨基酸序列的核苷酸序列被替换。

[0037] 在本发明的一个具体实施方式中,所述的构建方法包括将包含编码人TL1A蛋白胞外区、跨膜区和/或胞质区的全部或部分的核苷酸序列插入或替换编码非人动物内源TL1A蛋白胞外区、跨膜区和/或胞质区的全部或部分的核苷酸序列。

[0038] 在本发明的一个具体实施方式中,所述的构建方法包括将包含编码人TL1A蛋白胞外区的全部或部分的核苷酸序列插入或替换编码非人动物内源TL1A蛋白胞外区的全部或部分的核苷酸序列。

[0039] 在本发明的一个具体实施方式中,所述的构建方法包括将包含人TL1A基因的1号至4号外显子的全部或部分插入或替换非人动物内源TL1A基因的1号至4号外显子的全部或部分。

[0040] 在本发明的一个具体实施方式中,所述的构建方法包括将包含人TL1A基因的1号外显子的全部或部分、2号至3号外显子的全部和4号外显子的全部或部分(优选还包含1-2号内含子和/或3-4号内含子)插入或替换非人动物内源TL1A基因的1号外显子的全部或部分、2号至3号外显子的全部和4号外显子的全部或部分(优选还包含1-2号内含子和/或3-4号内含子)。

[0041] 在本发明的一个具体实施方式中,所述的构建方法包括将包含人TL1A基因的基因组DNA、cDNA序列或CDS序列插入或替换非人动物基因组中编码SEQ ID NO:1所示氨基酸的核苷酸序列。

[0042] 在本发明的一个具体实施方式中,所述的构建方法包括将包含编码SEQ ID NO:2所示氨基酸序列的核苷酸序列插入或替换非人动物基因组中编码SEQ ID NO:1所示氨基酸序列的核苷酸序列。

[0043] 在本发明的一个具体实施方式中,所述的构建方法包括将包含编码SEQ ID NO:2第61-251位所示氨基酸序列的核苷酸序列插入或替换非人动物基因组中编码SEQ ID NO:1第66-252位所示氨基酸序列的核苷酸序列。

[0044] 在本发明的一个具体实施方式中,所述的构建方法包括将包含SEQ ID NO:7所示核苷酸序列插入或替换非人动物基因组中编码SEQ ID NO:1第66-252位所示氨基酸序列的核苷酸序列。

[0045] 优选的,使用基因编辑技术进行非人动物的构建,所述的基因编辑技术包括利用胚胎干细胞的基因打靶技术、CRISPR/Cas9技术、锌指核酸酶技术、转录激活子样效应因子核酸酶技术、归巢核酸内切酶或其他分子生物学技术。

[0046] 优选的,所述的构建方法包括使用靶向非人动物内源TL1A基因的靶向载体或靶向非人动物内源TL1A基因的sgRNA进行非人动物的构建。

[0047] 在本发明的一个具体实施方式中,所述的构建方法包括将靶向非人动物内源TL1A基因的靶向载体导入非人动物细胞中(优选为胚胎干细胞),筛选出正确的阳性克隆细胞导入已分离好的囊胚中,培养该囊胚,然后将培养后的囊胚移植至雌性非人动物输卵管内,允许其发育,鉴定筛选获得TL1A基因人源化的非人动物。

[0048] 优选的,为提高重组效率,还可以使用靶向非人动物内源TL1A基因的靶向载体与靶向非人动物内源TL1A基因的sgRNA一起进行非人动物的构建。

[0049] 在本发明的一个具体实施方式中,所述的构建方法包括将靶向非人动物内源TL1A基因的靶向载体、靶向非人动物内源TL1A基因的sgRNA及Cas9导入非人动物细胞中,培养该细胞(优选为受精卵),然后将培养后的细胞移植至雌性非人动物输卵管内,允许其发育,鉴定筛选获得TL1A基因人源化的非人动物。

[0050] 根据本发明的一些实施例,所述的构建方法进一步包括将TL1A基因人源化的非人动物与其他基因修饰的非人动物交配、体外受精或直接进行基因编辑,并进行筛选,得到多基因修饰的非人动物。

[0051] 优选的,所述的其他基因包括但不限于IL23A、IL12B、TNFA、TNFR1、TNFR2、PD-1、PD-L1、CTLA4、4-1BB、CD3或LAG3中的至少一种。

[0052] 优选的,所述的非人动物还表达人或人源化的IL23A、IL12B、TNFA、TNFR1、TNFR2、PD-1、PD-L1、CTLA4、4-1BB、CD3或LAG3蛋白中的至少一种。

[0053] 优选的,所述的人TL1A基因的部分、人源化TL1A基因和/或所述的其他基因对于内源被修饰(优选替换)基因座为纯合的。

[0054] 优选的,所述的人TL1A基因的部分、人源化TL1A基因和/或所述的其他基因对于内源被修饰(优选替换)基因座为杂合的。

[0055] 优选的,所述的多基因修饰的非人动物的基因组中修饰的多个基因中每一个基因均对于内源被修饰(优选替换)基因座为纯合的。

[0056] 优选的,所述的多基因修饰的非人动物的基因组中修饰的多个基因中每一个基因均对于内源被修饰(优选替换)基因座为杂合的。

[0057] 优选的,所述的非人动物可以选自啮齿类动物、斑马鱼、猪、鸡、兔子、猴子等任何可以进行基因编辑制备基因人源化的非人动物。

[0058] 优选的,所述的非人动物为非人哺乳动物。进一步优选的,所述的非人哺乳动物为啮齿类动物。更进一步优选的,所述的啮齿类动物为大鼠或小鼠。

[0059] 优选的,所述的非人动物是免疫缺陷的非人哺乳动物。进一步优选的,所述的免疫缺陷的非人哺乳动物为免疫缺陷的啮齿类动物、免疫缺陷的猪、免疫缺陷的兔子或免疫缺陷的猴子。更进一步优选的,所述的免疫缺陷的啮齿类动物为免疫缺陷的小鼠或大鼠。再进一步优选的,所述免疫缺陷鼠是NOD-Prkdc^{scid}IL-2r γ ^{null}小鼠、NOD-Rag 1^{-/-}-IL2rg^{-/-}小鼠、Rag 2^{-/-}-IL2rg^{-/-}小鼠、NOD/SCID小鼠或者裸鼠。

[0060] 本发明的第二方面,提供了一种TL1A基因人源化的非人动物。

[0061] 优选的,所述的非人动物体内表达人或人源化TL1A蛋白,和/或,所述的非人动物基因组中包含人TL1A基因的部分,或,人源化TL1A基因。

[0062] 优选的,所述的非人动物的内源TL1A蛋白表达降低或缺失。

[0063] 优选的,所述的非人动物的基因组中包含人TL1A基因的部分,优选包含人TL1A基

因的1号至4号外显子的全部或部分,进一步优选包含人TL1A基因的1号外显子、2号外显子、3号外显子或4号外显子中的一种或两种以上外显子的组合,更优选包含人TL1A基因的1号外显子的全部或部分、2号至3号外显子的全部和4号外显子的全部或部分,优选还包含1-2号内含子和/或3-4号内含子,其中,人TL1A基因的1号外显子的部分至少包含5bp到237bp,例如5、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230或237bp连续核苷酸序列,优选的,所述的人TL1A基因的1号外显子的部分包含编码胞外区的全部或部分的核苷酸序列,例如连续5-30bp编码胞外区的核苷酸序列。人TL1A基因的4号外显子的部分至少包含50bp到6255bp,例如50、100、150、200、250、300、350、400、450、452、455、500、600、700、800、900、1000、2000、3000、4000、5000、6000、6100、6200或6255bp连续核苷酸序列,优选的,所述的人TL1A基因的4号外显子的部分包含4号外显子中编码区的核苷酸序列。

[0064] 在本发明的一个具体实施方式中,所述的非人动物基因组中包含的人TL1A基因的部分包含SEQ ID NO:7所示核苷酸序列;或者,包含与SEQ ID NO:7所示核苷酸序列同一性至少为70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或至少99%的核苷酸序列;或者,包含与SEQ ID NO:7所示核苷酸序列差异不超过10、9、8、7、6、5、4、3、2或不超过1个核苷酸的核苷酸序列;或者,包含与SEQ ID NO:7所示的,包括取代、缺失和/或插入一个或多个核苷酸的核苷酸序列。

[0065] 优选的,所述的非人动物的基因组中包含编码人或人源化TL1A蛋白的全部或部分的核苷酸序列,进一步优选包含编码人TL1A蛋白的胞外区、跨膜区和/或胞质区的全部或部分的核苷酸序列;进一步优选包含编码人TL1A蛋白的至少20个到251个,例如至少20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、191、192、193、194、195、200、210、220、230、240、250或251个连续氨基酸序列的核苷酸序列;更优选包含编码人TL1A蛋白的胞外区的全部或部分的核苷酸序列;更进一步优选包含编码人TL1A蛋白的至少20个到195个,例如至少20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、191、192、193、194或195个连续氨基酸序列的核苷酸序列;再优选包含编码N端去除0-10(例如0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10)个氨基酸的人TL1A蛋白胞外区的核苷酸序列。

[0066] 在本发明的一个具体实施方式中,所述的非人动物基因组中包含编码SEQ ID NO:2的第61-251、58-251或57-251位所示氨基酸序列的核苷酸序列;或者,包含与编码SEQ ID NO:2的第61-251、58-251或57-251位所示氨基酸序列的核苷酸序列同一性至少为70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或至少为99%的核苷酸序列;或者,包含与编码SEQ ID NO:2的第61-251、58-251或57-251位所示氨基酸序列的核苷酸序列差异不超过10、9、8、7、6、5、4、3、2或不超过1个核苷酸的核苷酸序列;或者,包含与编码SEQ ID NO:2的第61-251、58-251或57-251位所示氨基酸序列的核苷酸序列所示的,包括取代、缺失和/或插入一个或多个核苷酸的核苷酸序列

[0067] 优选的,所述的非人动物包括将供体核苷酸序列导入非人动物内源TL1A基因座上构建获得,所述的供体核苷酸序列包含下列组中任一种核苷酸序列:

[0068] A) 人TL1A基因的部分,优选包含人TL1A基因的1号至4号外显子的全部或部分,进一步优选包含人TL1A基因的1号外显子、2号外显子、3号外显子或4号外显子中的一种或两种以上外显子的组合,更优选包含人TL1A基因的1号外显子的全部或部分、2号至3号外显子

的全部和4号外显子的全部或部分,优选还包含1-2号内含子和/或3-4号内含子,其中,人TL1A基因的1号外显子的部分至少包含5bp到237bp,例如5、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230或237bp连续核苷酸序列,优选的,所述的人TL1A基因的1号外显子的部分包含编码胞外区的全部或部分的核苷酸序列,例如连续5-30bp编码胞外区的核苷酸序列;人TL1A基因的4号外显子的部分至少包含50bp到6255bp,例如50、100、150、200、250、300、350、400、450、452、455、500、600、700、800、900、1000、2000、3000、4000、5000、6000、6100、6200或6255bp连续核苷酸序列,优选的,所述的人TL1A基因的4号外显子的部分包含4号外显子中编码区的核苷酸序列;更进一步优选包含SEQ ID NO:7所示核苷酸序列;或者,包含与SEQ ID NO:7所示核苷酸序列同一性至少为70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或至少99%的核苷酸序列;或者,包含与SEQ ID NO:7所示核苷酸序列差异不超过10、9、8、7、6、5、4、3、2或不超过1个核苷酸的核苷酸序列;或者,包含与SEQ ID NO:7所示的,包括取代、缺失和/或插入一个或多个核苷酸的核苷酸序列;

[0069] B) 编码人TL1A蛋白的全部或部分的核苷酸序列,优选包含编码人TL1A蛋白的胞外区、跨膜区和/或胞质区的全部或部分的核苷酸序列;进一步优选包含编码人TL1A蛋白的至少20个到251个,例如至少20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、191、192、193、194、195、200、210、220、230、240、250或251个连续氨基酸序列的核苷酸序列;更优选包含编码人TL1A蛋白的胞外区的全部或部分的核苷酸序列;更进一步优选包含编码人TL1A蛋白的至少20个到195个,例如至少20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、191、192、193、194或195个连续氨基酸序列的核苷酸序列,再优选包含编码N端去除0-10(例如0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10)个氨基酸的人TL1A蛋白胞外区的核苷酸序列;再进一步优选包含编码SEQ ID NO:2的第61-251、58-251或57-251位所示氨基酸序列的核苷酸序列;或者,包含与编码SEQ ID NO:2的第61-251、58-251或57-251位所示氨基酸序列的核苷酸序列同一性至少为70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或至少为99%的核苷酸序列;或者,包含与编码SEQ ID NO:2的第61-251、58-251或57-251位所示氨基酸序列的核苷酸序列差异不超过10、9、8、7、6、5、4、3、2或不超过1个核苷酸的核苷酸序列;或者,包含与编码SEQ ID NO:2的第61-251、58-251或57-251位所示氨基酸序列的核苷酸序列所示的,包括取代、缺失和/或插入一个或多个核苷酸的核苷酸序列;

[0070] C) 编码人源化TL1A蛋白的核苷酸序列;或,

[0071] D) 人源化TL1A基因。

[0072] 优选的,所述的非人动物的至少一个细胞的基因组中包含编码人或人源化TL1A蛋白的核苷酸序列、人TL1A基因的部分或人源化TL1A基因。

[0073] 优选的,编码人或人源化TL1A蛋白的核苷酸序列、人TL1A基因的部分或人源化TL1A基因的核苷酸序列可操作的连接到非人动物至少一条染色体中的内源TL1A基因座上的内源性调控元件。

[0074] 优选的,所述的非人动物通过靶向非人动物内源TL1A基因的靶向载体构建获得。

[0075] 优选的,所述的非人动物通过上述的构建方法获得。

[0076] 优选的,在所述的非人动物的基因组中,包含人TL1A基因的部分和非人动物内源

TL1A基因的部分,人TL1A基因的5'端与非人动物TL1A基因的部分连接的序列包括如SEQ ID NO:10所示核苷酸序列;或者,包含与SEQ ID NO:10所示核苷酸序列同一性至少为70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或至少99%的核苷酸序列。人TL1A基因的3'端与非人动物TL1A基因的部分连接的序列包括如SEQ ID NO:11所示核苷酸序列;或者,包含与SEQ ID NO:11所示核苷酸序列同一性至少为70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或至少99%的核苷酸序列。

[0077] 在本发明的一个具体实施方式中,所述的非人动物的基因组上还包含SEQ ID NO:12和/或13任一所示核苷酸序列;或者,包含与SEQ ID NO:12和/或13任一所示核苷酸序列同一性至少为70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或至少99%的核苷酸序列。

[0078] 优选的,所述的非人动物进一步包含其他基因修饰,进一步优选的,所述的其他基因包括但不限于IL23A、IL12B、TNFA、TNFR1、TNFR2、PD-1、PD-L1、CTLA4、4-1BB、CD3或LAG3中的至少一种。

[0079] 优选的,所述的人TL1A基因的部分、人源化TL1A基因和/或所述的其他基因对于内源被修饰(优选替换)基因座为纯合的。

[0080] 优选的,所述的人TL1A基因的部分、人源化TL1A基因和/或所述的其他基因对于内源被修饰(优选替换)基因座为杂合的。

[0081] 优选的,所述的非人动物可以选自啮齿类动物、斑马鱼、猪、鸡、兔子、猴子等任何可以进行基因编辑制备基因人源化的非人动物。

[0082] 优选的,所述的非人动物为非人哺乳动物。进一步优选的,所述的非人哺乳动物为啮齿类动物。更进一步优选的,所述的啮齿类动物为大鼠或小鼠。

[0083] 优选的,所述的非人动物是免疫缺陷的非人哺乳动物。进一步优选的,所述的免疫缺陷的非人哺乳动物为免疫缺陷的啮齿类动物、免疫缺陷的猪、免疫缺陷的兔子或免疫缺陷的猴子。更进一步优选的,所述的免疫缺陷的啮齿类动物为免疫缺陷的小鼠或大鼠。再进一步优选的,所述免疫缺陷鼠是NOD-Prkdc^{scid}IL-2r γ ^{null}小鼠、NOD-Rag 1^{-/-}-IL2rg^{-/-}小鼠、Rag 2^{-/-}-IL2rg^{-/-}小鼠、NOD/SCID小鼠或者裸鼠。

[0084] 本发明的第三方面,提供了一种TL1A基因缺失的非人动物。

[0085] 优选的,所述的非人动物缺失TL1A基因的1号至4号外显子的全部或部分,进一步优选缺失1号外显子的全部或部分、2号至3号外显子的全部和4号外显子的全部或部分,更优选还缺失1-2号内含子和/或3-4号内含子。

[0086] 本发明的第四方面,提供了一种TL1A基因缺失的非人动物的构建方法。

[0087] 优选的,所述的构建方法包括采用靶向非人动物内源TL1A基因的靶向载体和/或靶向非人动物内源TL1A基因的sgRNA进行TL1A基因缺失的非人动物的构建。

[0088] 本发明的第五方面,提供了一种TL1A基因缺失的细胞。

[0089] 优选的,所述的细胞缺失TL1A基因的1号至4号外显子的全部或部分,进一步优选缺失1号外显子的全部或部分、2号至3号外显子的全部和4号外显子的全部或部分,更优选还缺失1-2号内含子和/或3-4号内含子。

[0090] 本发明的第六方面,提供了一种TL1A基因缺失的细胞的构建方法。

[0091] 优选的,所述的构建方法包括采用靶向非人动物内源TL1A基因的靶向载体和/或

靶向非人动物内源TL1A基因的sgRNA进行TL1A基因缺失的细胞的构建。

[0092] 本发明的第七方面,提供了一种多基因修饰的非人动物的构建方法,所述的构建方法包括:

[0093] 1) 提供上述任一所述的非人动物,或者,采用上述任一所述构建方法获得非人动物;

[0094] 2) 将步骤1)提供的非人动物与其他基因修饰的非人动物交配、体外受精或直接进行基因编辑,并进行筛选,得到多基因修饰的非人动物。

[0095] 优选的,所述的其他基因包括但不限于IL23A、IL12B、TNFA、TNFR1、TNFR2、PD-1、PD-L1、CTLA4、4-1BB、CD3或LAG3中的至少一种。

[0096] 优选的,所述的多基因修饰的非人动物为双基因人源化非人动物、三基因人源化非人动物、四基因人源化非人动物、五基因人源化非人动物、六基因人源化非人动物、七基因人源化非人动物、八基因人源化非人动物或九基因人源化非人动物。

[0097] 优选的,所述的多基因修饰的非人动物的基因组中修饰的多个基因中每一个基因均对于内源被修饰(优选替换)基因座为纯合的。

[0098] 优选的,所述的多基因修饰的非人动物的基因组中修饰的多个基因中每一个基因均对于内源被修饰(优选替换)基因座为杂合的。

[0099] 本发明的第八方面,提供了一种上述构建方法获得的TL1A基因人源化的非人动物或其子代,或,多基因修饰的非人动物或其子代。

[0100] 优选的,所述的非人动物可以选自啮齿类动物、斑马鱼、猪、鸡、兔子、猴子等任何可以进行基因编辑制备基因人源化的非人动物。

[0101] 优选的,所述的非人动物为非人哺乳动物。进一步优选的,所述的非人哺乳动物为啮齿类动物。更进一步优选的,所述的啮齿类动物为大鼠或小鼠。

[0102] 优选的,所述的非人动物是免疫缺陷的非人哺乳动物。进一步优选的,所述的免疫缺陷的非人哺乳动物为免疫缺陷的啮齿类动物、免疫缺陷的猪、免疫缺陷的兔子或免疫缺陷的猴子。更进一步优选的,所述的免疫缺陷的啮齿类动物为免疫缺陷的小鼠或大鼠。再进一步优选的,所述免疫缺陷鼠是NOD-Prkdc^{scid}IL-2r γ ^{null}小鼠、NOD-Rag 1^{-/-}-IL2rg^{-/-}小鼠、Rag 2^{-/-}-IL2rg^{-/-}小鼠、NOD/SCID小鼠或者裸鼠。

[0103] 本发明的第九方面,提供了一种动物模型,所述的动物模型来源于上述的非人动物或其子代,或者来源于上述构建方法获得的非人动物或其子代。

[0104] 优选的,所述的动物模型为荷瘤模型或炎症动物模型。

[0105] 本发明的第十方面,提供了一种荷瘤动物模型或炎症动物模型的制备方法,所述的制备方法包括构建上述TL1A基因人源化的非人动物或采用上述构建方法构建非人动物或其子代的步骤,优选还包括植入肿瘤细胞和/或导入炎症因子的步骤。

[0106] 本发明的第十一方面,提供了上述TL1A基因人源化的非人动物或其子代、多基因修饰的非人动物或其子代、上述构建方法获得的非人动物或其子代在制备动物模型中的应用。

[0107] 本发明的第十二方面,提供了一种人源化TL1A蛋白,所述的人源化TL1A蛋白包含人TL1A蛋白的全部或部分。

[0108] 优选的,所述的人源化TL1A蛋白包含人TL1A蛋白的胞外区、跨膜区和/或胞质区的

全部或部分。

[0109] 在本发明的一个具体实施方式中,所述的人源化TL1A蛋白包含人TL1A蛋白至少20个到251个,例如至少20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、191、192、193、194、195、200、210、220、230、240、250或251个连续氨基酸序列。

[0110] 进一步优选的,所述的人源化TL1A蛋白包含人TL1A蛋白的胞外区的全部或部分。

[0111] 在本发明的一个具体实施方式中,所述的人源化TL1A蛋白包含人TL1A蛋白的胞外区至少20个到195个,例如至少20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、191、192、193、194或195个连续氨基酸序列。

[0112] 在本发明的一个具体实施方式中,所述的人源化TL1A蛋白包含N端去除0-10(例如0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10)个氨基酸的人TL1A蛋白胞外区。

[0113] 在本发明的一个具体实施方式中,所述的人源化TL1A蛋白包含SEQ ID NO:2第61-251、58-251或57-251位所示氨基酸序列;或者,包含与SEQ ID NO:2第61-251、58-251或57-251位所示氨基酸序列同一性至少为70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或至少为99%的氨基酸序列。

[0114] 优选的,所述的人源化TL1A蛋白还包含非人动物内源TL1A蛋白的部分。

[0115] 进一步优选的,所述的人源化TL1A蛋白包含非人动物内源TL1A蛋白的胞质区的全部或部分。

[0116] 优选的,所述的非人动物内源TL1A蛋白的胞质区包含SEQ ID NO:1第1-39位所示氨基酸序列;或者,包含与SEQ ID NO:1第1-39位所示氨基酸序列同一性至少为70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或至少为99%的氨基酸序列。

[0117] 进一步优选的,所述的人源化TL1A蛋白包含非人动物内源TL1A蛋白的跨膜区的全部或部分。

[0118] 优选的,所述的非人动物内源TL1A蛋白的跨膜区包含SEQ ID NO:1第40-60位所示氨基酸序列;或者,包含与SEQ ID NO:1第40-60位所示氨基酸序列同一性至少为70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或至少为99%的氨基酸序列。

[0119] 进一步优选的,所述的人源化TL1A蛋白包含非人动物内源TL1A蛋白的胞外区的部分。

[0120] 优选的,所述的非人动物内源TL1A蛋白的胞外区的部分包含SEQ ID NO:1第61-65位所示氨基酸序列;或者,包含与SEQ ID NO:1第61-65位所示氨基酸序列同一性至少为70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或至少为99%的氨基酸序列。

[0121] 优选的,所述的人源化TL1A蛋白包含SEQ ID NO:1第1-65位所示氨基酸序列;或者,包含与SEQ ID NO:1第1-65位所示氨基酸序列同一性至少为70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或至少为99%的氨基酸序列。

[0122] 优选的,所述的人源化TL1A蛋白中,人TL1A蛋白的部分,和,非人动物TL1A蛋白的部分直接连接或通过接头连接,所述的接头优选为肽接头。

[0123] 在本发明的一个具体实施方式中,所述的人源化TL1A蛋白从N端到C端的顺序包含非人动物内源TL1A蛋白的胞质区的全部、跨膜区的全部、胞外区的部分,以及,人TL1A蛋白的胞外区的部分。

[0124] 在本发明的一个具体实施方式中,所述的人源化TL1A蛋白包含SEQ ID NO:1的第

1-65位所示氨基酸序列,以及,SEQ ID NO:2的第61-251位所示氨基酸序列。例如,从N端到C端的顺序包含SEQ ID NO:1的第1-65位所示氨基酸序列,以及,SEQ ID NO:2的第61-251位所示氨基酸序列。

[0125] 优选的,所述的人源化TL1A蛋白包含人TL1A基因编码的氨基酸序列的全部或部分。

[0126] 优选的,所述的人源化TL1A蛋白包含人TL1A基因的1号至4号外显子的全部或部分编码的氨基酸序列,进一步优选包含人TL1A基因的1号外显子、2号外显子、3号外显子、4号外显子中的一种或两种以上外显子的组合编码的氨基酸序列,更进一步优选包含人TL1A基因的1号外显子的部分、2号至4号外显子的全部编码的氨基酸序列,其中,人TL1A基因的1号外显子的部分至少包含5bp到237bp,例如5、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230或237bp连续核苷酸序列,优选的,所述的人TL1A基因的1号外显子的部分包含编码胞外区的全部或部分的核苷酸序列,例如连续5-30bp编码胞外区的核苷酸序列。

[0127] 在本发明的一个具体实施方式中,所述的人源化TL1A蛋白包含人或人源化TL1A胞外区,优选包含人或人源化TL1A跨膜区、进一步优选还包含人或人源化TL1A胞质区。

[0128] 优选的,所述的人源化TL1A胞外区包含人TL1A蛋白的胞外区的全部或部分,优选包含至少20个到195个,例如至少20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、191、192、193、194或195个连续氨基酸序列的人TL1A蛋白的胞外区,进一步优选包含191个连续氨基酸的人TL1A蛋白的胞外区,更优选包含SEQ ID NO:2的第61-251、58-251或57-251位所示氨基酸序列;或者,包含与SEQ ID NO:2第61-251、58-251或57-251位所示氨基酸序列同一性至少为70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或至少99%的氨基酸序列;或者,包含与SEQ ID NO:2第61-251、58-251或57-251位所示氨基酸序列差异不超过10、9、8、7、6、5、4、3、2或不超过1个氨基酸的氨基酸序列;或者,包含与SEQ ID NO:2第61-251、58-251或57-251位所示的,包括取代、缺失和/或插入一个或多个氨基酸残基的氨基酸序列。

[0129] 进一步优选的,所述的人源化TL1A胞外区还包含非人动物内源TL1A蛋白的胞外区的全部或部分,优选包含至少1个到192个,例如1、5、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190或192个连续氨基酸序列的非人动物TL1A蛋白的胞外区,进一步优选包含5个连续氨基酸的非人动物内源TL1A蛋白的胞外区;更进一步优选包括1号外显子编码的胞外区的部分。更优选包含SEQ ID NO:1第61-65位所示氨基酸序列;或者,包含与SEQ ID NO:1第61-65位所示氨基酸序列同一性至少为70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或至少99%的氨基酸序列;或者,包含与SEQ ID NO:1第61-65位所示氨基酸序列差异不超过10、9、8、7、6、5、4、3、2或不超过1个氨基酸的氨基酸序列;或者,包含与SEQ ID NO:1第61-65位所示的,包括取代、缺失和/或插入一个或多个氨基酸残基的氨基酸序列。

[0130] 在本发明的一个具体实施方式中,所述的人源化TL1A胞外区包含191个连续氨基酸的人TL1A蛋白的胞外区,以及,5个连续氨基酸的非人动物内源TL1A蛋白的胞外区;优选的,所述的人源化TL1A胞外区包含SEQ ID NO:2第61-251位所示氨基酸序列和SEQ ID NO:1第61-65位所示氨基酸序列;其中,人TL1A蛋白的胞外区的部分(SEQ ID NO:2第61-251位)

和非人动物内源TL1A蛋白的胞外区的部分(SEQ ID NO:1第61-65位)直接连接或通过接头连接,所述的接头优选为肽接头。

[0131] 优选的,所述的人源化TL1A跨膜区包含人TL1A蛋白的跨膜区的全部或部分,优选包含人TL1A蛋白的跨膜区至少1个到21个,例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20或21个连续氨基酸序列的人TL1A蛋白的跨膜区,进一步优选包含SEQ ID NO:2第36-56位所示氨基酸序列;或者,包含与SEQ ID NO:2第36-56位所示氨基酸序列同一性至少为70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或至少99%的氨基酸序列;或者,包含与SEQ ID NO:2第36-56位所示氨基酸序列差异不超过10、9、8、7、6、5、4、3、2或不超过1个氨基酸的氨基酸序列;或者,包含与SEQ ID NO:2第36-56位所示的,包括取代、缺失和/或插入一个或多个氨基酸残基的氨基酸序列。

[0132] 优选的,所述的人源化TL1A胞质区包含人TL1A蛋白的胞质区的全部或部分,优选包含人TL1A蛋白的胞质区至少1个到35个,例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34或35个连续氨基酸序列的人TL1A蛋白的胞质区,进一步优选包含SEQ ID NO:2第1-35位所示氨基酸序列;或者,包含与SEQ ID NO:2第1-35位所示氨基酸序列同一性至少为70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或至少99%的氨基酸序列;或者,包含与SEQ ID NO:2第1-35位所示氨基酸序列差异不超过10、9、8、7、6、5、4、3、2或不超过1个氨基酸的氨基酸序列;或者,包含与SEQ ID NO:2第1-35位所示的,包括取代、缺失和/或插入一个或多个氨基酸残基的氨基酸序列。

[0133] 优选的,所述的人源化TL1A蛋白包含下列组中的任一种:

[0134] 1) 人或人源化TL1A胞外区、非人动物内源TL1A蛋白的跨膜区,和,非人动物内源TL1A蛋白的胞质区;

[0135] 2) 非人动物内源TL1A蛋白的胞外区、人或人源化TL1A跨膜区,和,非人动物内源TL1A蛋白的胞质区;

[0136] 3) 非人动物内源TL1A蛋白的胞外区、非人动物内源TL1A蛋白的跨膜区,和,人或人源化TL1A胞质区;

[0137] 4) 人或人源化TL1A胞外区、人或人源化TL1A跨膜区,和,非人动物内源TL1A蛋白的胞质区;

[0138] 5) 人或人源化TL1A胞外区、非人动物内源TL1A蛋白的跨膜区,和,人或人源化TL1A胞质区;

[0139] 6) 非人动物内源TL1A蛋白的胞外区、人或人源化TL1A跨膜区,和,人或人源化TL1A胞质区;

[0140] 7) 人或人源化TL1A胞外区、人或人源化TL1A跨膜区,和,人或人源化TL1A胞质区。

[0141] 在本发明的一个具体实施方式中,所述的人源化TL1A蛋白包括非人动物内源TL1A蛋白的胞质区(优选为SEQ ID NO:1第1-39位)、非人动物内源TL1A蛋白的跨膜区(优选为SEQ ID NO:1第40-60位)、非人动物内源TL1A蛋白的胞外区的部分(优选为SEQ ID NO:1第61-65位),以及,人TL1A蛋白的胞外区的部分(优选为SEQ ID NO:2第61-251位)。

[0142] 在本发明的一个具体实施方式中,所述的人源化TL1A蛋白包括非人动物内源TL1A蛋白(优选为SEQ ID NO:1)的66-252位氨基酸序列被替换获得的人源化TL1A蛋白,优选的,

所述的替换包括用人TL1A蛋白的胞外区的全部或部分替换,进一步优选的,所述的替换包括用人TL1A蛋白(优选为SEQ ID NO:2)的第61-251位氨基酸序列。

[0143] 在本发明的一个具体实施方式中,所述的人源化TL1A蛋白的氨基酸序列包含下列组中的任一种:

[0144] (A) SEQ ID NO:9的全部或部分;

[0145] (B) 与SEQ ID NO:9的氨基酸序列同一性至少为70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或至少99%的氨基酸序列;

[0146] (C) 与SEQ ID NO:9的氨基酸序列差异不超过10、9、8、7、6、5、4、3、2或不超过1个氨基酸的氨基酸序列;或,

[0147] (D) 与SEQ ID NO:9所示的,包括取代、缺失和/或插入一个或多个氨基酸残基的氨基酸序列。

[0148] 优选的,所述的非人动物可以选自啮齿类动物、斑马鱼、猪、鸡、兔子、猴子等任何可以进行基因编辑制备基因人源化的非人动物。

[0149] 优选的,所述的非人动物为非人哺乳动物。进一步优选的,所述的非人哺乳动物为啮齿类动物。更进一步优选的,所述的啮齿类动物为大鼠或小鼠。

[0150] 优选的,所述的非人动物是免疫缺陷的非人哺乳动物。进一步优选的,所述的免疫缺陷的非人哺乳动物为免疫缺陷的啮齿类动物、免疫缺陷的猪、免疫缺陷的兔子或免疫缺陷的猴子。更进一步优选的,所述的免疫缺陷的啮齿类动物为免疫缺陷的小鼠或大鼠。再进一步优选的,所述免疫缺陷鼠是NOD-Prkdc^{scid}IL-2r γ ^{null}小鼠、NOD-Rag 1^{-/-}-IL2rg^{-/-}小鼠、Rag 2^{-/-}-IL2rg^{-/-}小鼠、NOD/SCID小鼠或者裸鼠。

[0151] 优选的,所述的人源化TL1A蛋白包含至少20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、191、192、193、194或195个氨基酸组成的序列与人TL1A蛋白的相应氨基酸序列相同,进一步优选的,所述的至少20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、191、192、193、194或195个氨基酸组成的序列来源于人TL1A蛋白的胞外区。

[0152] 在本发明的一个具体实施方式中,所述的人源化TL1A蛋白包含至少191个氨基酸组成的序列与人TL1A蛋白的相应氨基酸序列相同。

[0153] 本发明的第十三方面,提供了一种编码上述第十二方面所述的人源化TL1A蛋白的核酸。

[0154] 本发明的第十四方面,提供了一种人源化TL1A基因,所述的人源化TL1A基因编码上述第十二方面所述的人源化TL1A蛋白。

[0155] 本发明的第十五方面,提供了一种人源化TL1A基因,所述的人源化TL1A基因包含人TL1A基因的部分。

[0156] 优选的,所述的人源化TL1A基因包含人TL1A基因的1号至4号外显子的全部或部分,进一步优选包含人TL1A基因的1号外显子、2号外显子、3号外显子或4号外显子中的一种或两种以上外显子的组合,更进一步优选包含人TL1A基因的1号外显子的全部或部分、2号至3号外显子的全部和4号外显子的全部或部分,优选还包含1-2号内含子和/或3-4号内含子,其中,人TL1A基因的1号外显子的部分至少包含5bp到237bp,例如5、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230或237bp连

续核苷酸序列,优选的,所述的人TL1A基因的1号外显子的部分包含编码胞外区的全部或部分的核苷酸序列,例如连续5-30bp编码胞外区的核苷酸序列。人TL1A基因的4号外显子的部分至少包含50bp到6255bp,例如50、100、150、200、250、300、350、400、450、452、455、500、600、700、800、900、1000、2000、3000、4000、5000、6000、6100、6200或6255bp连续核苷酸序列,优选的,所述的人TL1A基因的4号外显子的部分包含4号外显子中编码区的核苷酸序列。

[0157] 在本发明的一个具体实施方式中,所述的人源化TL1A基因中包含的人TL1A基因的部分包含SEQ ID NO:7所示核苷酸序列;或者,包含与SEQ ID NO:7所示核苷酸序列同一性至少为70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或至少99%的核苷酸序列;或者,包含与SEQ ID NO:7所示核苷酸序列差异不超过10、9、8、7、6、5、4、3、2或不超过1个核苷酸的核苷酸序列;或者,包含与SEQ ID NO:7所示的,包括取代、缺失和/或插入一个或多个核苷酸的核苷酸序列。

[0158] 优选的,所述的人源化TL1A基因中,包含人TL1A基因的部分和非人动物内源TL1A基因的部分,人TL1A基因的部分的5'端与非人动物内源TL1A基因的部分连接的序列包括如SEQ ID NO:10所示核苷酸序列;或者,包含与SEQ ID NO:10所示核苷酸序列同一性至少为70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或至少99%的核苷酸序列。人TL1A基因的部分的3'端与非人动物内源TL1A基因的部分连接的序列包括如SEQ ID NO:11所示核苷酸序列;或者,包含与SEQ ID NO:11所示核苷酸序列同一性至少为70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或至少99%的核苷酸序列。

[0159] 在本发明的一个具体实施方式中,所述的人源化TL1A基因中还包含SEQ ID NO:12和/或13任一所示核苷酸序列;或者,包含与SEQ ID NO:12和/或13任一所示核苷酸序列同一性至少为70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或至少99%的核苷酸序列。

[0160] 优选的,所述的人源化TL1A基因还包含非人动物内源TL1A基因的部分,进一步优选的,所述的非人动物内源TL1A基因的部分包含非人动物内源TL1A基因的1号至4号外显子的全部或部分,更优选包含非人动物内源TL1A基因的1号外显子的部分和/或4号外显子的部分,其中,非人动物内源TL1A基因的1号外显子的部分至少包含5' UTR和/或编码非人动物内源TL1A蛋白的胞质区的全部、跨膜区的全部和/或胞外区的部分的核苷酸序列;非人动物内源TL1A基因的4号外显子的部分至少包含3' UTR。

[0161] 在本发明的一个具体实施方式中,所述的人源化TL1A基因从5'端到3'端依次包含非人动物内源TL1A基因的部分(优选包含非人动物内源TL1A基因的1号外显子的部分)、人TL1A基因的部分(优选包含人TL1A基因的1号外显子的全部或部分、2号至3号外显子的全部和4号外显子的全部或部分,优选还包含1-2号内含子和/或3-4号内含子)、非人动物TL1A基因的部分(优选为非人动物TL1A基因4号外显子的部分)。

[0162] 在本发明的一个具体实施方式中,所述的人源化TL1A基因从5'端到3'端依次包含非人动物内源TL1A基因的部分(优选包含非人动物内源TL1A基因的1号外显子的部分)、SEQ ID NO:7或编码SEQ ID NO:2第61-251位所示氨基酸序列的核苷酸序列、非人动物TL1A基因的3' UTR。

[0163] 在本发明的一个具体实施方式中,所述的人源化TL1A基因还包含抗性基因,优选的,所述的人源化TL1A基因还包含抗性基因两侧的两个同向排列的Frt重组位点。

[0164] 在本发明的一个具体实施方式中,所述的抗性基因为新霉素磷酸转移酶编码基因 Neo。

[0165] 优选的,所述的人源化TL1A基因包含编码人TL1A蛋白的全部或部分的核苷酸序列,进一步优选包含编码人TL1A蛋白胞外区、跨膜区和/或胞质区的全部或部分的核苷酸序列,更进一步优选包含编码人TL1A蛋白胞外区的全部或部分的核苷酸序列,再进一步优选包含编码人TL1A蛋白胞外区至少20到195个,例如至少20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、191、192、193、194或195个连续氨基酸序列的核苷酸序列。更进一步优选包含编码N端去除0-10(例如0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10)个氨基酸的人TL1A蛋白胞外区的核苷酸序列。

[0166] 在本发明的一个具体实施方式中,所述的人源化TL1A基因包含编码SEQ ID NO:2的第61-251、58-251或57-251位所示氨基酸序列的核苷酸序列;或者,包含与编码SEQ ID NO:2的第61-251、58-251或57-251位所示氨基酸序列的核苷酸序列同一性至少为70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或至少为99%的核苷酸序列。

[0167] 优选的,所述的人源化TL1A基因包含编码非人动物内源TL1A蛋白的全部或部分的核苷酸序列,进一步优选内包含编码非人动物内源TL1A蛋白的全部胞质区、全部跨膜区和部分胞外区的核苷酸序列,其中,非人动物内源TL1A蛋白胞外区的部分至少包含N端0-10(例如0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10)个连续氨基酸的非人动物内源TL1A蛋白胞外区,优选包含SEQ ID NO:1第61-65位所示氨基酸序列,或,包含与SEQ ID NO:1第61-65位所示氨基酸序列同一性为70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或至少为99%的氨基酸序列。

[0168] 在本发明的一个具体实施方式中,所述的人源化TL1A基因包含编码SEQ ID NO:1的第1-39、40-60、61-65或1-65位所示氨基酸序列的核苷酸序列;或者,包含与编码SEQ ID NO:1的第1-39、40-60、61-65或1-65位所示氨基酸序列的核苷酸序列同一性至少为70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或至少为99%的核苷酸序列。

[0169] 优选的,所述的人源化TL1A基因在非人动物体内通过调控元件进行调控,进一步优选的,所述的调控元件为内源调控元件或者外源调控元件。

[0170] 优选的,所述的调控元件为启动子。

[0171] 优选的,所述的人源化TL1A基因包含非人动物内源TL1A基因的5' UTR和/或3' UTR。

[0172] 优选的,所述的非人动物可以选自啮齿类动物、斑马鱼、猪、鸡、兔子、猴子等任何可以进行基因编辑制备基因人源化的非人动物。

[0173] 优选的,所述的非人动物为非人哺乳动物。进一步优选的,所述的非人哺乳动物为啮齿类动物。更进一步优选的,所述的啮齿类动物为大鼠或小鼠。

[0174] 优选的,所述的非人动物是免疫缺陷的非人哺乳动物。进一步优选的,所述的免疫缺陷的非人哺乳动物为免疫缺陷的啮齿类动物、免疫缺陷的猪、免疫缺陷的兔子或免疫缺陷的猴子。更进一步优选的,所述的免疫缺陷的啮齿类动物为免疫缺陷的小鼠或大鼠。再进一步优选的,所述免疫缺陷鼠是NOD-Prkdc^{scid}IL-2r γ ^{null}小鼠、NOD-Rag 1^{-/-}-IL2rg^{-/-}小鼠、Rag 2^{-/-}-IL2rg^{-/-}小鼠、NOD/SCID小鼠或者裸鼠。

[0175] 在本发明的一个具体实施方式中,所述的人源化TL1A基因转录的mRNA包含下列组中的任一种:

[0176] (A) SEQ ID NO:8所示核苷酸序列的全部或部分;

[0177] (B) 与SEQ ID NO:8所示核苷酸序列同一性至少为70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或至少99%的核苷酸序列;

[0178] (C) 与SEQ ID NO:8所示的核苷酸序列差异不超过10、9、8、7、6、5、4、3、2或不超过1个核苷酸的核苷酸序列;或,

[0179] (D) 与SEQ ID NO:8所示的核苷酸序列所示的,包括取代、缺失和/或插入一个或多个核苷酸的核苷酸序列。

[0180] 优选的,所述的人源化TL1A基因还包括特异性诱导物或阻遏物。进一步优选的,所述的特异性诱导物或阻遏物可以为常规可以诱导或阻遏的物质。在本发明的一个具体实施方式中,所述的特异性诱导物选自四环素系统(Tet-Off System/Tet-On System)或他莫昔芬系统(Tamoxifen System)。

[0181] 本发明的第十六方面,提供了一种靶向非人动物内源TL1A基因的靶向载体,所述的靶向载体包含供体核苷酸序列。

[0182] 所述的供体核苷酸序列包含下列组中的任一种:

[0183] A) 人TL1A基因的部分,优选包含人TL1A基因的1号至4号外显子的全部或部分,进一步优选包含人TL1A基因的1号外显子、2号外显子、3号外显子或4号外显子中的一种或两种以上外显子的组合,更优选包含人TL1A基因的1号外显子的全部或部分、2号至3号外显子的全部和4号外显子的全部或部分,优选还包含1-2号内含子和/或3-4号内含子,其中,人TL1A基因的1号外显子的部分至少包含5bp到237bp,例如5、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230或237bp连续核苷酸序列,优选的,所述的人TL1A基因的1号外显子的部分包含编码胞外区的全部或部分的核苷酸序列,例如连续5-30bp编码胞外区的核苷酸序列;人TL1A基因的4号外显子的部分至少包含50bp到6255bp,例如50、100、150、200、250、300、350、400、450、452、455、500、600、700、800、900、1000、2000、3000、4000、5000、6000、6100、6200或6255bp连续核苷酸序列,优选的,所述的人TL1A基因的4号外显子的部分包含4号外显子中编码区的核苷酸序列;更进一步优选包含SEQ ID NO:7所示核苷酸序列;或者,包含与SEQ ID NO:7所示核苷酸序列同一性至少为70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或至少99%的核苷酸序列;或者,包含与SEQ ID NO:7所示核苷酸序列差异不超过10、9、8、7、6、5、4、3、2或不超过1个核苷酸的核苷酸序列;或者,包含与SEQ ID NO:7所示的,包括取代、缺失和/或插入一个或多个核苷酸的核苷酸序列;

[0184] B) 编码人TL1A蛋白的全部或部分的核苷酸序列,优选包含编码人TL1A蛋白的胞外区、跨膜区和/或胞质区的全部或部分的核苷酸序列;进一步优选包含编码人TL1A蛋白的至少20个到251个,例如至少20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、191、192、193、194、195、200、210、220、230、240、250或251个连续氨基酸序列的核苷酸序列;更优选包含编码人TL1A蛋白的胞外区的全部或部分的核苷酸序列;更进一步优选包含编码人TL1A蛋白的至少20个到195个,例如至少20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、191、192、193、194或195个连续氨基酸序列的核苷酸序列,再优选包含编码N端去除0-10(例如0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10)个氨基酸的人TL1A蛋白胞外区的核苷酸序列;再进一步优选包含编码SEQ ID NO:2的第61-251、58-251

或57-251位所示氨基酸序列的核苷酸序列;或者,包含与编码SEQ ID NO:2的第61-251、58-251或57-251位所示氨基酸序列的核苷酸序列同一性至少为70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或至少为99%的核苷酸序列;或者,包含与编码SEQ ID NO:2的第61-251、58-251或57-251位所示氨基酸序列的核苷酸序列差异不超过10、9、8、7、6、5、4、3、2或不超过1个核苷酸的核苷酸序列;或者,包含与编码SEQ ID NO:2的第61-251、58-251或57-251位所示氨基酸序列的核苷酸序列所示的,包括取代、缺失和/或插入一个或多个核苷酸的核苷酸序列;

[0185] C) 编码人源化TL1A蛋白的核苷酸序列;或,

[0186] D) 人源化TL1A基因。

[0187] 在本发明的一个具体实施方式中,所述的靶向载体中包含SEQ ID NO:10和/或11任一所示核苷酸序列;或者,包含与SEQ ID NO:10和/或11任一所示核苷酸序列同一性至少为70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或至少99%的核苷酸序列。

[0188] 在本发明的一个具体实施方式中,所述的靶向载体中包含SEQ ID NO:12和/或13任一所示核苷酸序列;或者,包含与SEQ ID NO:12和/或13任一所示核苷酸序列同一性至少为70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或至少99%的核苷酸序列。

[0189] 在本发明的一个具体实施方式中,所述的靶向载体中还包含抗性基因,优选的,所述的靶向载体中还包含抗性基因两侧的两个同向排列的Frt重组位点。

[0190] 在本发明的一个具体实施方式中,所述的抗性基因为新霉素磷酸转移酶编码基因Neo。

[0191] 优选的,所述的靶向载体还包含5' 臂和/或3' 臂。

[0192] 其中,所述的5' 臂(或5' 同源臂)为待改变的转换区5' 端同源的DNA片段。其选自非人动物内源TL1A基因基因组DNA的100-10000个长度的核苷酸;优选的,所述的5' 臂与NCBI登录号NC_000070.7至少具有90%同源性的核苷酸;进一步优选的,所述的5' 臂包含如SEQ ID NO:3或5所述的核苷酸序列,或者,包含与SEQ ID NO:3或5所述的核苷酸序列同一性至少为70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或至少为99%的核苷酸序列。

[0193] 所述的3' 臂(或3' 同源臂)为待改变的转换区3' 端同源的DNA片段。其选自非人动物内源TL1A基因基因组DNA的100-10000个长度的核苷酸;优选的,所述的3' 臂与NCBI登录号NC_000070.7至少具有90%同源性的核苷酸;进一步优选的,所述的3' 臂包含如SEQ ID NO:4或6所述的核苷酸序列,或者,包含与SEQ ID NO:4或6所述的核苷酸序列同一性至少为70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或至少为99%的核苷酸序列。

[0194] 优选的,所述的待改变的转换区位于非人动物内源TL1A基因的1号至4号外显子上。

[0195] 优选的,所述的非人动物可以选自啮齿类动物、斑马鱼、猪、鸡、兔子、猴子等任何可以进行基因编辑制备基因人源化的非人动物。

[0196] 优选的,所述的非人动物为非人哺乳动物。进一步优选的,所述的非人哺乳动物为啮齿类动物。更进一步优选的,所述的啮齿类动物为大鼠或小鼠。

[0197] 优选的,所述的非人动物是免疫缺陷的非人哺乳动物。进一步优选的,所述的免疫缺陷的非人哺乳动物为免疫缺陷的啮齿类动物、免疫缺陷的猪、免疫缺陷的兔子或免疫缺

陷的猴子。更进一步优选的,所述的免疫缺陷的啮齿类动物为免疫缺陷的小鼠或大鼠。再进一步优选的,所述免疫缺陷鼠是NOD-Prkdc^{scid}IL-2r γ ^{null}小鼠、NOD-Rag 1^{-/-}-IL2rg^{-/-}小鼠、Rag 2^{-/-}-IL2rg^{-/-}小鼠、NOD/SCID小鼠或者裸鼠。

[0198] 本发明的第十七方面,提供了一种靶向非人动物内源TL1A基因的sgRNA。

[0199] 优选的,所述的靶向非人动物内源TL1A基因的sgRNA的靶位点位于非人动物内源TL1A基因的1-2号内含子和/或4号外显子上。

[0200] 优选的,所述的靶向非人动物内源TL1A基因的sgRNA的靶位点包含SEQ ID NO:14和/或15。

[0201] 本发明的第十八方面,提供了一种编码上述靶向非人动物内源TL1A基因的sgRNA的DNA分子。

[0202] 优选的,所述的DNA分子的双链为sgRNA的上下游序列,或者加入酶切位点后的正向寡核苷酸或反向寡核苷酸。

[0203] 本发明的一个具体实施方式中,所述的DNA分子双链的核苷酸序列包含SEQ IN NO:16和SEQ IN NO:18,SEQ IN NO:17和SEQ IN NO:19,SEQ IN NO:20和SEQ IN NO:22,SEQ IN NO:21和SEQ IN NO:23。

[0204] 本发明的第十九方面,提供了一种包含上述靶向非人动物内源TL1A基因的sgRNA载体。

[0205] 本发明的第二十方面,提供了一种包含上述靶向非人动物内源TL1A基因的靶向载体、上述靶向非人动物内源TL1A基因的sgRNA、上述DNA分子和/或上述载体的细胞。

[0206] 本发明的第二十一方面,提供了一种上述靶向非人动物内源TL1A基因的靶向载体、上述靶向非人动物内源TL1A基因的sgRNA、上述DNA分子、上述载体和/或上述细胞在TL1A基因修饰中的应用。

[0207] 优选的,所述的应用包括但不限于敲除、插入或替换。

[0208] 本发明的第二十二方面,提供了一种TL1A基因人源化的细胞,所述的细胞表达人TL1A蛋白或上述的人源化TL1A蛋白,和/或,所述的细胞的基因组中包含人TL1A基因的部分或上述的核酸或上述的人源化TL1A基因。

[0209] 优选的,所述的细胞还包含其他基因修饰,进一步优选的,所述的其他基因包括但不限于IL23A、IL12B、TNFA、TNFR1、TNFR2、PD-1、PD-L1、CTLA4、4-1BB、CD3或LAG3中的至少一种。

[0210] 优选的,根据具体实施方式的需要,所述的细胞可以发育成动物个体,或者,所述的细胞不能发育为动物个体。

[0211] 本发明的第二十三方面,提供了一种TL1A基因人源化的细胞的制备方法,所述的制备方法包括将包含下列组中的任一种核苷酸序列导入细胞:

[0212] A) 人TL1A基因的部分,优选包含人TL1A基因的1号至4号外显子的全部或部分,进一步优选包含人TL1A基因的1号外显子、2号外显子、3号外显子或4号外显子中的一种或两种以上外显子的组合,更优选包含人TL1A基因的1号外显子的全部或部分、2号至3号外显子的全部和4号外显子的全部或部分,优选还包含1-2号内含子和/或3-4号内含子,其中,人TL1A基因的1号外显子的部分至少包含5bp到237bp,例如5、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230或237bp连续核苷酸序列,

优选的,所述的人TL1A基因的1号外显子的部分包含编码胞外区的全部或部分的核苷酸序列,例如连续5-30bp编码胞外区的核苷酸序列;人TL1A基因的4号外显子的部分至少包含50bp到6255bp,例如50、100、150、200、250、300、350、400、450、452、455、500、600、700、800、900、1000、2000、3000、4000、5000、6000、6100、6200或6255bp连续核苷酸序列,优选的,所述的人TL1A基因的4号外显子的部分包含4号外显子中编码区的核苷酸序列;更进一步优选包含SEQ ID NO:7所示核苷酸序列;或者,包含与SEQ ID NO:7所示核苷酸序列同一性至少为70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或至少99%的核苷酸序列;或者,包含与SEQ ID NO:7所示核苷酸序列差异不超过10、9、8、7、6、5、4、3、2或不超过1个核苷酸的核苷酸序列;或者,包含与SEQ ID NO:7所示的,包括取代、缺失和/或插入一个或多个核苷酸的核苷酸序列;

[0213] B) 编码人TL1A蛋白的全部或部分的核苷酸序列,优选包含编码人TL1A蛋白的胞外区、跨膜区和/或胞质区的全部或部分的核苷酸序列;进一步优选包含编码人TL1A蛋白的至少20个到251个,例如至少20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、191、192、193、194、195、200、210、220、230、240、250或251个连续氨基酸序列的核苷酸序列;更优选包含编码人TL1A蛋白的胞外区的全部或部分的核苷酸序列;更进一步优选包含编码人TL1A蛋白的至少20个到195个,例如至少20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、191、192、193、194或195个连续氨基酸序列的核苷酸序列,再优选包含编码N端去除0-10(例如0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10)个氨基酸的人TL1A蛋白胞外区的核苷酸序列;再进一步优选包含编码SEQ ID NO:2的第61-251、58-251或57-251位所示氨基酸序列的核苷酸序列;或者,包含与编码SEQ ID NO:2的第61-251、58-251或57-251位所示氨基酸序列的核苷酸序列同一性至少为70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或至少为99%的核苷酸序列;或者,包含与编码SEQ ID NO:2的第61-251、58-251或57-251位所示氨基酸序列的核苷酸序列差异不超过10、9、8、7、6、5、4、3、2或不超过1个核苷酸的核苷酸序列;或者,包含与编码SEQ ID NO:2的第61-251、58-251或57-251位所示氨基酸序列的核苷酸序列所示的,包括取代、缺失和/或插入一个或多个核苷酸的核苷酸序列;

[0214] C) 编码人源化TL1A蛋白的核苷酸序列;或,

[0215] D) 人源化TL1A基因。

[0216] 优选的,使用上述靶向非人动物内源TL1A基因的靶向载体进行TL1A基因人源化的细胞的制备。

[0217] 本发明的第二十四方面,提供了一种细胞、组织或器官,所述的细胞、组织或器官表达人TL1A蛋白或上述的人源化TL1A蛋白,或者,所述的细胞、组织或器官的基因组中包含人TL1A基因的部分或上述的人源化TL1A基因,或者,所述的细胞、组织或器官来源于上述任一所述的非人动物或其子代或上述任一所述的构建方法获得的非人动物或其子代或上述的动物模型。

[0218] 本发明的第二十五方面,提供了一种荷瘤后的瘤组织,所述的瘤组织表达人TL1A蛋白或上述的人源化TL1A蛋白,或者,所述的瘤组织的基因组中包含人TL1A基因的部分或上述的人源化TL1A基因,或者,所述的瘤组织来源于上述任一所述的非人动物或其子代或上述任一所述的构建方法获得的非人动物或其子代或上述的动物模型。

- [0219] 本发明的第二十六方面,提供了一种TL1A基因人源化的非人动物基因组。
- [0220] 优选的,所述的基因中包含人或人源化TL1A基因的全部或部分,和/或,包含编码人或人源化TL1A蛋白的核苷酸序列的全部或部分。
- [0221] 优选的,所述的人源化TL1A基因为上述的人源化TL1A基因。
- [0222] 优选的,所述的人源化TL1A蛋白为上述的人源化TL1A蛋白。
- [0223] 优选的,所述的基因组中,包含在非人动物内源TL1A基因座处用人TL1A基因的基因组片段(优选包含人TL1A基因的1号至4号外显子的全部或部分,进一步优选包含1号外显子的部分、2号至3号外显子的全部和4号外显子的部分,优选还包含1-2号内含子和/或3-4号内含子)置换非人动物内源TL1A基因的基因组片段以形成经修饰的TL1A基因。
- [0224] 优选的,所述的被置换的非人动物内源TL1A基因的基因组片段包含非人动物内源TL1A基因的1号至4号外显子的全部或部分,进一步优选包含1号外显子的部分、2号至3号外显子的全部和4号外显子的部分,优选还包含1-2号内含子和/或3-4号内含子。
- [0225] 优选的,所述的经修饰的TL1A基因编码人源化TL1A蛋白。
- [0226] 优选的,所述的经修饰的TL1A基因的表达受非人动物内源调控元件的调控。
- [0227] 优选的,所述的基因组中包含人源化的内源TL1A基因座,在该基因座中,内源TL1A基因座的片段已被缺失并替换为对应的人TL1A序列。
- [0228] 优选的,所述的人源化的TL1A基因座包含内源TL1A启动子,其中,人TL1A序列可操作的连接到内源TL1A启动子。
- [0229] 优选的,内源TL1A基因座的1号至4号外显子的全部或部分(优选包含1号外显子的部分、2号至3号外显子的全部和4号外显子的部分,优选还包括1-2号内含子和/或3-4号内含子)已被缺失并被替换为对应的人TL1A序列。
- [0230] 在本发明的一个具体实施方式中,内源TL1A基因座的编码胞外区的全部或部分的核苷酸序列已被缺失并被替换为对应的人TL1A序列。
- [0231] 在本发明的一个具体实施方式中,内源TL1A基因座的编码跨膜区、胞质区、3' UTR和/或5' UTR的核苷酸序列尚未被缺失并尚未被替换为对应的人TL1A序列。
- [0232] 优选的,所述的非人动物可以选自啮齿类动物、斑马鱼、猪、鸡、兔子、猴子等任何可以进行基因编辑制备基因人源化的非人动物。
- [0233] 优选的,所述的非人动物为非人哺乳动物。进一步优选的,所述的非人哺乳动物为啮齿类动物。更进一步优选的,所述的啮齿类动物为大鼠或小鼠。
- [0234] 优选的,所述的非人动物是免疫缺陷的非人哺乳动物。进一步优选的,所述的免疫缺陷的非人哺乳动物为免疫缺陷的啮齿类动物、免疫缺陷的猪、免疫缺陷的兔子或免疫缺陷的猴子。更进一步优选的,所述的免疫缺陷的啮齿类动物为免疫缺陷的小鼠或大鼠。再进一步优选的,所述免疫缺陷鼠是NOD-Prkdc^{scid}IL-2r γ ^{null}小鼠、NOD-Rag 1^{-/-}-IL2rg^{-/-}小鼠、Rag 2^{-/-}-IL2rg^{-/-}小鼠、NOD/SCID小鼠或者裸鼠。
- [0235] 本发明的第二十七方面,提供了一种上述人源化TL1A蛋白,或者,上述的人源化TL1A基因,或者,上述的细胞,或者,上述的非人动物或其子代,或者,上述的构建方法获得的非人动物或其子代,或者,上述的细胞、组织或器官,或者上述的瘤组织的应用,其特征在于,所述的应用包括:
- [0236] A) 涉及人类细胞的与TL1A相关的免疫过程的产品开发中的应用;

- [0237] B) 作为药理学、免疫学、微生物学和医学研究的与TL1A相关的模型系统中的应用;
- [0238] C) 涉及生产和利用动物实验疾病模型用于与TL1A相关的病原学研究和/或用于开发诊断策略和/或用于开发治疗策略中的应用;
- [0239] D) 在体内研究人TL1A信号通路调节剂的筛选、药效检测、评估疗效、验证或评价中的应用;或者,
- [0240] E) 研究TL1A基因功能,研究针对人TL1A靶位点的药物、药效,研究与TL1A相关的免疫相关疾病药物以及抗肿瘤药物方面的应用。
- [0241] 根据具体实施方式的需要,所述的应用可以为疾病的诊断或治疗目的,也可以为非疾病的诊断或治疗目的。
- [0242] 本发明的第二十八方面,提供了来源于上述的非人动物或其子代、上述构建方法获得的非人动物或其子代或上述的动物模型在筛选人TL1A特异性调节剂中的应用。
- [0243] 本发明的第二十九方面,提供了一种人TL1A特异性调节剂的筛选方法,所述的筛选方法包括向植入肿瘤细胞的个体施加调节剂,检测对肿瘤的抑制性,其中,所述的个体选自上述的非人动物或其子代、上述构建方法获得的非人动物或其子代或上述的动物模型。
- [0244] 优选的,所述的调节剂选自CAR-T、药物。进一步优选的,所述的药物包括靶向药物,更优选的,所述的靶向药物为抗原结合蛋白,所述的抗原结合蛋白为抗体。
- [0245] 优选的,所述的调节剂为单抗或双特异性抗体或两种及两种以上药物的联合使用。
- [0246] 优选的,所述检测包括测定肿瘤的大小和/或增殖速率。
- [0247] 优选的,所述检测的方法包括游标卡尺测量、流式细胞检测和/或动物活体成像检测。
- [0248] 优选的,所述的检测包括评估个体体重、脂肪量、活化途径、神经保护活性或代谢变化,所述的代谢变化包括食物消耗或水消耗的变化。
- [0249] 优选的,所述的肿瘤细胞来源于人或非人动物。
- [0250] 优选的,所述人TL1A特异性调节剂的筛选方法可以为治疗目的或非治疗目的。该方法用来筛选或评价药物,对候选药物的药效进行检测和比较,以确定哪些候选药物可以作为药物,哪些不能作为药物,或者,比较不同药物的药效敏感程度,即治疗效果不是必然的,只是一种可能性。
- [0251] 本发明的第三十方面,提供了一种人用药物筛选方法,或,干预方案的评价方法,所述的筛选方法或评价方法包括向个体植入肿瘤细胞后给予候选药物,或,施加干预方案,对给予候选药物,或,施加干预方案后的个体进行药效检测和/或比较,或,检测和评价肿瘤抑制效果;其中,所述的个体选自上述的非人动物或其子代、上述构建方法获得的非人动物或其子代或上述的动物模型。
- [0252] 优选的,所述的干预方案选自CAR-T、药物治疗。进一步优选的,所述的药物包括靶向药物,更优选的,所述的靶向药物为抗原结合蛋白,所述的抗原结合蛋白为抗体。
- [0253] 优选的,所述的肿瘤细胞来源于人或非人动物。
- [0254] 优选的,所述的候选药物为单抗或双特异性抗体或两种及两种以上药物的联合使用。
- [0255] 优选的,所述检测包括测定肿瘤的大小和/或增殖速率。

[0256] 优选的,所述检测的方法包括游标卡尺测量、流式细胞检测和/或动物活体成像检测。

[0257] 优选的,所述的检测包括评估个体体重、脂肪量、活化途径、神经保护活性或代谢变化,所述的代谢变化包括食物消耗或水消耗的变化。

[0258] 优选的,所述人用药物的筛选方法可以为治疗目的或非治疗目的。该方法用来筛选或评价药物,对候选药物的药效进行检测和比较,以确定哪些候选药物可以作为药物,哪些不能作为药物,或者,比较不同药物的药效敏感程度,即治疗效果不是必然的,只是一种可能性。同样的,干预方案的评价方法也可以为治疗目的或非治疗目的,其只是对于干预方案的检测和评价,以确定该干预方案是否有治疗效果,即治疗效果不是必然的,只是一种可能性。

[0259] 本发明的第三十一方面,提供了一种来源于上述的非人动物或其子代、上述的构建方法获得的非人动物或其子代或上述的动物模型在制备人TL1A特异性调节剂中的用途。

[0260] 本发明的第三十二方面,提供了一种来源于上述的非人动物或其子代、上述的构建方法获得的非人动物或其子代或上述的动物模型在制备治疗肿瘤或炎症的药物中的用途。

[0261] 本发明所述的“炎症”包括急性炎症,也包括慢性炎症。具体的,包括但不限于变质性炎症、渗出性炎症(浆液性炎、纤维素性炎、化脓性炎、出血性炎、坏死性炎、卡他性炎)、增生性炎症、特异性炎症(结核、梅毒、麻疯、淋巴肉芽肿等),优选的,所述的炎症包括炎性肠病,优选的,所述的炎性肠病包括结肠炎(例如溃疡性结肠炎)、克罗恩病等等。

[0262] 本发明所述的“肿瘤”包括但不限于淋巴瘤、非小细胞肺癌、白血病、卵巢癌、鼻咽癌、乳腺癌、子宫内膜癌、结肠癌、直肠癌、胃癌、膀胱癌、肺癌、支气管癌、骨癌、前列腺癌、胰腺癌、肝和胆管癌、食管癌、肾癌、甲状腺癌、头颈部癌、睾丸癌、胶质母细胞瘤、星形细胞瘤、黑色素瘤、骨髓增生异常综合征、以及肉瘤。其中,所述的白血病选自急性淋巴细胞性(成淋巴细胞性)白血病、急性骨髓性白血病、髓性白血病、慢性淋巴细胞性白血病、多发性骨髓瘤、浆细胞白血病、以及慢性骨髓性白血病;所述淋巴瘤选自霍奇金淋巴瘤和非霍奇金淋巴瘤,包括B细胞淋巴瘤、弥漫性大B细胞淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、套细胞淋巴瘤、边缘区B细胞淋巴瘤、T细胞淋巴瘤、和瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症;所述肉瘤选自骨肉瘤、尤文肉瘤、平滑肌肉瘤、滑膜肉瘤、软组织肉瘤、血管肉瘤、脂肪肉瘤、纤维肉瘤、横纹肌肉瘤、以及软骨肉瘤。

[0263] 本发明所述的TL1A基因人源化的非人动物,其体内可正常表达人或人源化TL1A蛋白,可用于针对人TL1A靶位点的药物筛选、药效评估或用于炎症或肿瘤治疗,可以加快新药的研发过程、节约时间和成本,对于研究TL1A蛋白功能及相关疾病药物筛选提供了有效的保障。

[0264] 本发明所述的“全部或部分”,“全部”为整体,“部分”为整体中的局部,或者组成整体的个体。

[0265] 本发明所述的“人源化TL1A蛋白”,包含来源于人TL1A蛋白的部分和非人动物的部分。例如,所述的“人TL1A蛋白”同人TL1A蛋白的全部,即其氨基酸序列与人TL1A蛋白的全长氨基酸序列一致。所述的“人TL1A蛋白的部分”,为连续或间隔的5-251个氨基酸序列与人TL1A蛋白的氨基酸序列一致,优选为连续或间隔的10-195或10-191个,例如连续5、10、20、

30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、191、192、193、194、195、200、210、220、230、240、250或251个氨基酸序列与人TL1A蛋白的氨基酸序列一致。所述的“非人动物的部分”优选为非人动物内源TL1A蛋白的部分。

[0266] 本发明所述的“非人动物内源TL1A蛋白的部分”，为连续或间隔1-252个氨基酸序列与非人动物内源TL1A蛋白的氨基酸序列一致，优选为连续或间隔的1-65个或1-60个，例如1、5、10、20、30、40、50、60、65、70、74、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250或252个氨基酸序列与非人动物TL1A蛋白的氨基酸序列一致。

[0267] 本发明所述的“人源化TL1A基因”，包含来源于人TL1A基因的部分和非人动物的部分，例如，所述的“人TL1A基因”同人TL1A基因的全部，即其核苷酸序列与人TL1A基因的全长核苷酸序列一致。所述的“人TL1A基因的部分”，为连续或间隔的20-21405bp核苷酸序列与人TL1A基因的核苷酸序列一致，优选为50-15378bp或50-6583bp或50-573bp，例如20、50、100、200、300、400、500、550、573、600、700、800、900、1000、2000、3000、4000、5000、6000、6500、6583、7000、8000、9000、10000、11000、12000、13000、14000、15000、15378、16000、17000、18000、19000、20000、21000或21405bp核苷酸序列与人TL1A基因的核苷酸序列一致。所述的“非人动物的部分”包括非人动物内源TL1A基因的部分。

[0268] 本发明所述的“非人动物内源TL1A基因的部分”包含非人动物内源TL1A基因1号外显子的部分和/或4号外显子的部分，优选的，非人动物内源TL1A基因1号外显子的部分至少包含5-251bp，优选为20-224bp，例如连续5、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、224、230、240、250或251bp与非人动物内源TL1A基因1号外显子一致。优选的，非人动物内源TL1A基因4号外显子的部分至少包含非编码区的核苷酸序列。

[0269] 本发明所述的“基因座”广义上讲代表基因在染色体上所占的位置，狭义上讲代表某一基因上的一段DNA片段，即可以是一个基因也可以是一个基因的一部分。例如所述的“TL1A基因座”表示TL1A基因1号至4号外显子上的任选一段的DNA片段。在本发明的一个具体实施方式中，被替换的非人动物内源TL1A基因座可以是非人动物内源TL1A基因1号至4号外显子上任选一段的DNA片段。

[0270] 本发明所述的“外显子的部分”表示连续或间隔几个、几十个或几百个核苷酸序列与全部的外显子核苷酸序列一致，例如人TL1A基因的1号外显子的部分，包含连续或间隔的5-237 bp，优选为5-30bp，例如5、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230或237bp核苷酸序列与人TL1A基因的1号外显子核苷酸序列一致。

[0271] 本发明所述的“xx号至xxx号外显子”或“xx号至xxx号外显子的全部”包含外显子及外显子之间的内含子的核苷酸序列，例如“2号至3号外显子的全部”包含2号外显子，2-3号内含子和3号外显子的全部核苷酸序列。

[0272] 本发明所述的“x-xx号内含子”表示x号外显子和xx号外显子之间的内含子，例如“1-2号内含子”表示1号外显子和2号外显子之间的内含子。

[0273] 本发明所述的“两种以上”包括但不限于两种、三种、四种、五种、六种、七种或八种或更多等。

[0274] 本发明所述的“治疗”表示减缓、中断、阻止、控制、停止、减轻、或逆转一种体征、症状、失调、病症、或疾病的进展或严重性,但不一定涉及所有疾病相关体征、症状、病症、或失调的完全消除,且是指在疾病已开始发展后改善疾病或病理状态的体征、症状等等的治疗干预。

[0275] 本发明所述的“细胞”可以为受精卵细胞或者体细胞,所述体细胞优选包括但不限于脐静脉内皮细胞(HUVECs)、单核细胞、巨噬细胞、树突状细胞(DC)、T细胞、软骨细胞和滑膜成纤维细胞等等。因此,根据细胞来源的不同,本申请所述的细胞一部分可以发育为动物个体,一部分不能发育为动物个体。

[0276] 本发明所述的“包含”或“包括”是开放式的描述,含有所描述的指定成分或步骤,以及不会实质上影响的其他指定成分或步骤。然而在用于描述蛋白质或核酸的序列时,所述蛋白质或核酸可以是由所述序列组成,或者在所述蛋白质或核酸的一端或两端可以具有额外的氨基酸或核苷酸,但仍然具有本发明所述的活性。

[0277] 本发明所述的“同源性”,是指在使用氨基酸序列或核苷酸序列的方面,本领域技术人员在保证与已知序列相似结构或功能的前提下,可以根据实际需要对序列进行调整,使使用序列与现有技术获得的序列相比,具有(包括但不限于)1%,2%,3%,4%,5%,6%,7%,8%,9%,10%,11%,12%,13%,14%,15%,16%,17%,18%,19%,20%,21%,22%,23%,24%,25%,26%,27%,28%,29%,30%,31%,32%,33%,34%,35%,36%,37%,38%,39%,40%,41%,42%,43%,44%,45%,46%,47%,48%,49%,50%,51%,52%,53%,54%,55%,56%,57%,58%,59%,60%,70%,80%,81%,82%,83%,84%,85%,86%,87%,88%,89%,90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%,99%,99.1%,99.2%,99.3%,99.4%,99.5%,99.6%,99.7%,99.8%,99.9%的同一性。

[0278] 本领域的技术人员能够确定并比较序列元件或同一性程度,以区分另外的小鼠和人序列。

[0279] 除非特别说明,本发明的实践将采取细胞生物学、细胞培养、分子生物学、转基因生物学、微生物学、重组DNA和免疫学的传统技术。这些技术在以下文献中进行了详细的解释。例如:Molecular Cloning A Laboratory Manual,2ndEd.,ed. By Sambrook, FritschandManiatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press:1989);DNA Cloning, Volumes I and II (D.N.Glovered.,1985);Oligonucleotide Synthesis (M.J.Gaited., 1984);Mullisetal. U.S. Pat.No.4,683,195;Nucleic Acid Hybridization (B.D.Hames&S.J.Higginseds.1984);Transcription And Translation (B.D.Hames& S.J.Higginseds.1984);Culture Of Animal Cells (R.I.Freshney,AlanR.Liss,Inc., 1987);Immobilized Cells And Enzymes (IRL Press,1986);B.Perbal,A Practical Guide To Molecular Cloning(1984);the series,Methods In ENZYMOLOGY (J.Abelson and M.Simon,eds.-in-chief,Academic Press,Inc.,New York),specifically,Vols. 154 and 155 (Wuetal.eds.) and Vol.185,"Gene Expression Technology" (D.Goeddel,ed.);Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells (J.H.Miller and M.P.Caloseds.,1987,Cold Spring Harbor Laboratory);Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology (Mayer and Walker,eds.,Academic Press,London, 1987);Handbook Of Experimental Immunology,Volumes V (D.M.Weir and C.C.Blackwell,eds.,1986);and Manipulating the Mouse Embryo,(Cold Spring

Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1986)。

[0280] 在一个方面,所述非人动物是哺乳动物。优选的,所述非人动物是小型哺乳动物,例如跳鼠科。在一个实施方式中,所述非人动物是啮齿动物。在一个实施方式中,所述啮齿动物选自小鼠、大鼠和仓鼠。在一个实施方式中,所述啮齿动物选自鼠家族。在一个实施方式中,所述基因修饰的动物来自选自丽仓鼠科(例如小鼠样仓鼠)、仓鼠科(例如仓鼠、新世界大鼠和小鼠、田鼠)、鼠总科(真小鼠和大鼠、沙鼠、刺毛鼠、冠毛大鼠)、马岛鼠科(登山小鼠、岩小鼠、有尾大鼠、马达加斯加大鼠和小鼠)、刺睡鼠科(例如多刺睡鼠)和鼯形鼠科(例如摩尔大鼠、竹大鼠和鼯鼠)家族。在一个特定实施方式中,所述基因修饰的啮齿动物选自真小鼠或大鼠(鼠总科)、沙鼠、刺毛鼠和冠毛大鼠。在一个实施方式中,所述基因修饰的小鼠来自鼠科家族成员。在一个实施方式中,所述动物是啮齿动物。在一个特定实施方式中,所述啮齿动物选自小鼠和大鼠。在一个实施方式中,所述非人动物是小鼠。

[0281] 在一个特定实施方式中,所述非人动物是啮齿动物,其为选自BALB/c、A、A/He、A/J、A/WySN、AKR、AKR/A、AKR/J、AKR/N、TA1、TA2、RF、SWR、C3H、C57BR、SjL、C57L、DBA/2、KM、NIH、ICR、CFW、FACA、C57BL/A、C57BL/An、C57BL/GrFa、C57BL/KaLwN、C57BL/6、C57BL/6J、C57BL/6ByJ、C57BL/6NJ、C57BL/10、C57BL/10ScSn、C57BL/10Cr和C57BL/01a的C57BL、C58、CBA/Br、CBA/Ca、CBA/J、CBA/st、CBA/H品系的小鼠及NOD、NOD/SCID、NOD-Prkdc^{scid}IL-2rg^{null}背景的小鼠。

[0282] 本发明有益的技术效果在于:

[0283] 利用基因编辑技术,用人源正常或突变基因替换动物基因组的同源基因,建立更接近人类生理或疾病特征的基因人源化动物模型,使其体内表达人源蛋白,作为仅能识别人蛋白序列的药物的靶点,为在动物水平进行抗人抗体及其它药物的筛选提供了可能。

[0284] 利用基因人源化动物模型建立各种疾病模型,可以进行抗人抗体药物的药理药效评价。

[0285] 以上只是概括了本发明的一些方面,不是也不应该认为是在任何方面限制本发明。

[0286] 本说明书提到的所有专利和出版物都是通过参考文献作为整体而引入本发明的。本领域的技术人员应认识到,对本发明可作某些改变并不偏离本发明的构思或范围。下面的实施例进一步详细说明本发明,不能认为是限制本发明或本发明所说明的具体方法的范围。

附图说明

[0287] 以下,结合附图来详细说明本发明的实施例,其中:

[0288] 图1:小鼠TL1A基因座和人TL1A基因座对比示意图(非按比例);

[0289] 图2:小鼠TL1A基因座人源化改造示意图(非按比例);

[0290] 图3:TL1A基因打靶策略及靶向载体V1设计示意图(非按比例);

[0291] 图4:TL1A基因人源化小鼠FRT重组过程示意图(非按比例);

[0292] 图5:TL1A基因打靶策略及靶向载体V2设计示意图(非按比例);

[0293] 图6:F1代小鼠PCR检测结果,其中WT为野生型对照,M为Marker,H₂O为水对照;

[0294] 图7:F1代小鼠Southern blot检测结果,其中WT为野生型对照;

[0295] 图8:TL1A基因人源化纯合子小鼠骨髓树突细胞可溶性TL1A检测结果,其中+/+为野生型小鼠,H/H为TL1A基因人源化纯合子小鼠。

具体实施方式

[0296] 下面结合具体实施例来进一步描述本发明,本发明的优点和特点将会随着描述而更为清楚。但这些实施例仅是范例性的,并不对本发明的范围构成任何限制。本领域技术人员应该理解的是,在不偏离本发明的精神和范围下可以对本发明技术方案的细节和形式进行修改或替换,但这些修改和替换均落入本发明的保护范围内。

[0297] 在下述每一实施例中,设备和材料是从以下所指出的几家公司获得:

[0298] C57BL/6小鼠购自中国食品药品检定研究院国家啮齿类实验动物种子中心;

[0299] AseI、BamHI酶购自NEB,货号分别为:R0526S和R3136S;

[0300] Purified anti-mouse CD16/32 Antibody购自Biolegend,货号为:101302;

[0301] Zombie NIR™ Fixable Viability Kit购自Biolegend,货号为:423106;

[0302] BV480 Rat Anti-Mouse CD31 Antibody购自Biolegend,货号为:565629;

[0303] TL1A Monoclonal Antibody (Tandysla), PerCP-eFluor 710, eBioscience™ 购自Invitrogen,货号为:46-7911-82;

[0304] Polyclonal Rabbit anti-Human TNFSF15 / TL1A / VEGI Antibody (PE, aa148-175, IF, WB) LS-C241951购自LSBio,货号为:LS-C241951-200;

[0305] Mouse IgG1 kappa Isotype Control (P3.6.2.8.1), PerCP-eFluor 710, eBioscience™ 购自Invitrogen,货号为:46-4714-80;

[0306] Polyclonal Rabbit IgG Isotype Control Antibody (RPE) LS-C149377购自LSBio,货号为:LS-C149377;

[0307] Human TL1A/TNFSF15 DuoSet ELISA购自R&D,货号为:DY1319-05。

[0308] 实施例1 TL1A基因人源化小鼠

[0309] 小鼠TL1A基因(NCBI Gene ID:326623,Primary source:MGI:2180140,UniProt ID:Q5UBV8,位于4号染色体NC_000070.7的第63642837至63663296位,基于转录本NM_177371.4及其编码蛋白NP_796345.4(SEQ ID NO:1))和人TL1A基因(NCBI Gene ID:9966,Primary source:HGNC: 11931,UniProt ID:095150,位于9号染色体NC_000009.12的第114784635至114806039位,基于转录本NM_005118.4及其编码蛋白NP_005109.2(SEQ ID NO:2))对比示意图如图1所示。

[0310] 为了达到本发明的目的,可在小鼠内源TL1A基因座引入编码人TL1A蛋白的核苷酸序列,使得该小鼠表达人或人源化TL1A蛋白。具体来说,用基因编辑技术,在小鼠TL1A基因调节元件的控制下,用包含人TL1A基因的1号外显子部分序列至4号外显子部分序列约15.4kb替换小鼠1号外显子的部分序列至4号外显子的部分序列约15.2kb,得到人源化TL1A基因座示意图如图2所示,实现对小鼠TL1A基因的人源化改造。

[0311] 根据图2进一步设计如图3所示的打靶策略,图中显示了V1靶向载体上含有小鼠TL1A基因上游和下游的同源臂序列,以及包含人TL1A基因的A片段。其中,上游5'同源臂序列(SEQ ID NO:3)与NCBI登录号为NC_000070.7的第63663073至63667349位核苷酸序列相同,下游3'同源臂序列(SEQ ID NO:4)与NCBI登录号为NC_000070.7的第63643878至

63647828位核苷酸序列相同。人TL1A片段的核苷酸序列(SEQ ID NO:7)与NCBI登录号为NC_000009.12的第114790455至114805832位核苷酸序列相同;人的TL1A片段序列上游与小鼠的连接设计为:5'-TCCCATCCTCGCAGGACTTAGCACCTCCTAATGGCTGGCCAGCTCCGGGCCAGGGAGAGGCCTGTGTGCAGTTCCAGGTAAGCCACATGGCACTCTGACCT-3'(SEQ ID NO:10),其中序列“TCCGG”中的最后一个“G”是小鼠的最后一个核苷酸,序列“GCCCA”中的“G”是人序列的第一个核苷酸。人的TL1A片段序列下游与小鼠的连接设计为:5'-ATCTCTTTGGTGGATTACACAAAAGAAGATAAAACCTTCTTTGGAGCCTTCTTACTATAAGGAGGAGAAAACCATCATTCCAAGGGGCTCCCCTGCCTCTACTTTCCA-3'(SEQ ID NO:11),其中序列“TACTA”中的最后一个“A”是人的最后一个核苷酸,序列“TAAGG”中的“T”是小鼠序列的第一个核苷酸。

[0312] 靶向载体上还包括用于阳性克隆筛选的抗性基因,即新霉素磷酸转移酶编码序列Neo,并在抗性基因的两侧装上两个同向排列的位点特异性重组系统Frt重组位点,组成Neo盒(Neo cassette)。其中Neo盒5'端与人基因的连接设计为:5'-TCCATACTATCACCAGTTGGCCAACTTTCCAAGTCTAGTGCAGAAATCCAAGAAGTTCCTATTCTCTAGAAAGTATAGGAACCTCAGGTCTGAAGAGGAG-3'(SEQ ID NO:12),其中序列“TCCAA”中的最后一个“A”是人的最后一个核苷酸,序列“GAAGT”中的第一个“G”是Neo盒的第一个核苷酸;Neo盒3'端与人基因的连接设计为:5'-T TGC GGAACCTTCGAAGTTCCTATTCTCTAGAAAGTATAGGAACCTTCGGCACCTCACACCTAGAGTTCCTATACCTCTGAGACTCCAGAGGAAAGAACAAGACAGTGCAGAAG-3'(SEQ ID NO:13),其中序列“ACTTC”中的最后一个“C”是Neo盒的最后一个核苷酸,序列“GGCAC”中的第一个“G”是人的第一个核苷酸。改造后的人源化TL1A基因转录的mRNA序列如SEQ ID NO:8所示,表达的人源化TL1A蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO:9所示。

[0313] 靶向载体构建可采用常规方法进行,如酶切连接等。构建好的靶向载体通过酶切进行初步验证后,再送测序公司进行测序验证。将测序验证正确的靶向载体电穿孔转染入C57BL/6小鼠的胚胎干细胞中,利用阳性克隆筛选标记基因对得到的细胞进行筛选,筛选出正确的阳性克隆细胞。将筛选出的正确阳性克隆细胞(黑色鼠)按照本领域已知的技术导入已分离好的囊胚中(白色鼠),得到的嵌合囊胚转移至培养液中短暂培养后移植至受体母鼠(白色鼠)的输卵管,可生产F0代嵌合体鼠(黑白相间)。将F0代嵌合体鼠与野生型鼠回交获得F1代鼠,再将F1代杂合小鼠互相交配即可获得F2代纯合子鼠。还可将阳性鼠与F1p工具鼠交配去除阳性克隆筛选标记基因(该过程示意图见图4)后,再通过互相交配即可得到TL1A基因人源化纯合子小鼠。

[0314] 此外还可采用CRISPR/Cas9系统进行基因编辑,进一步设计如图5所示的打靶策略,图中显示了靶向载体V2上含有小鼠TL1A基因上游和下游的同源臂序列,以及人的TL1A片段,构建之后的人源化TL1A基因座示意图如图2所示。其中,上游5'同源臂序列(SEQ ID NO:5)与NCBI登录号为NC_000070.7的第63663073至63664140位核苷酸序列相同,下游3'同源臂序列(SEQ ID NO:6)与NCBI登录号为NC_000070.7的第63645928至63647828位核苷酸序列相同。人TL1A片段的核苷酸序列(SEQ ID NO:7)与NCBI登录号为NC_000009.12的第114790455至114805832位核苷酸序列相同。改造后的人源化TL1A基因转录的mRNA序列如SEQ ID NO:8所示,表达的人源化TL1A蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO:9所示。

[0315] 靶向载体构建可采用常规方法进行,如酶切连接、直接合成等。构建好的靶向载体通过酶切进行初步验证后,再送测序公司进行测序验证。将测序验证正确的靶向载体用于

后续实验。

[0316] 靶序列决定了sgRNA的靶向特异性和诱导Cas9切割目的基因的效率。因此,高效特异的靶序列选择和设计是构建sgRNA表达载体的前提。设计并合成识别靶位点的sgRNA序列,示例性sgRNA在TL1A基因上的靶序列如下:

[0317] sgRNA1靶位点(SEQ ID NO:14):5'-ACAAAGCAAATACAGACCGGGG-3';

[0318] sgRNA2靶位点(SEQ ID NO:15):5'-AGCCTGCCCCGCTACTAACAGGG-3';

[0319] 利用UCA试剂盒检测sgRNA的活性,确定其可介导高效切割效率后,在其5'端及互补链上分别加上酶切位点得到正向寡核苷酸和反向寡核苷酸序列如表1所示,退火后将退火产物连接至pT7-sgRNA质粒(质粒先用BbsI线性化),获得表达载体pT7-TL1A-1和pT7-TL1A-2。

[0320] 表1 sgRNA1和sgRNA2序列表

sgRNA1 序列	
SEQ ID NO: 16	上游: 5'-ACAAAGCAAATACAGACCGG-3'
SEQ ID NO: 17 (正向寡核苷酸)	上游: 5'-TAGGACAAAGCAAATACAGACCGG-3'
SEQ ID NO: 18	下游: 5'-CCGGTCTGTATTTGCTTTGT-3'
SEQ ID NO: 19 (反向寡核苷酸)	下游: 5'-AAACCCGGTCTGTATTTGCTTTGT-3'
sgRNA2 序列	
SEQ ID NO: 20	上游: 5'-AGCCTGCCCCGCTACTAAC-3'
SEQ ID NO: 21 (正向寡核苷酸)	上游: 5'-TAGGAGCCTGCCCCGCTACTAAC-3'
SEQ ID NO: 22	下游: 5'-TGTTAGTAGGCGGGCAGGCT-3'
SEQ ID NO: 23 (反向寡核苷酸)	下游: 5'-AAACTGTTAGTAGGCGGGCAGGCT-3'

[0322] pT7-sgRNA载体由质粒合成公司合成含有T7启动子及sgRNA scaffold的片段DNA (SEQ ID NO:24)并依次通过酶切(EcoRI及BamHI)连接至骨架载体(来源Takara,货号3299)上,经专业测序公司测序验证,结果表明获得了目的质粒。取小鼠的原核期受精卵,例如C57BL/6小鼠,利用显微注射仪将pT7-TL1A-1和pT7-TL1A-2质粒的体外转录产物(使用Ambion体外转录试剂盒,按照说明书方法进行转录)、靶向载体与Cas9 mRNA预混好后注射至小鼠受精卵细胞质或细胞核中。按照《小鼠胚胎操作实验手册(第三版)》(安德拉斯·纳吉,化学工业出版社,2006)中的方法进行受精卵的显微注射,注射后的受精卵转移至培养液中短暂培养,然后移植至受体母鼠的输卵管中发育,将获得的小鼠(F0代)通过杂交和自交,扩大种群数量,建立稳定的TL1A基因人源化小鼠品系。

[0323] 表2 F1代基因型PCR检测引物序列及重组片段大小

引物	序列编号	引物序列(5'-3')	重组片段大小
L-GT-F	SEQ ID NO: 25	GGGAGGAAGAAGGGAAATGAAAGAG	Mut: 6537bp
L-GT-R	SEQ ID NO: 26	AGGCAGACAACATAGTGATTAGGAG	
R-GT-F	SEQ ID NO: 27	CCCACCAACCATGTATAATAGTCCA	Mut: 5975bp
R-GT-R	SEQ ID NO: 28	GCCCTTGACACAAAGCTTGGGTTT	

[0325] 可利用PCR技术筛选F1代阳性小鼠,使用表2所示引物进行检测,示例性结果如图6所示,编号为F1-01至F1-04的4只小鼠为阳性小鼠。将F1鉴定为阳性的TL1A基因人源化小鼠再进行Southern blot检测(分别用AseI或BamHI消化细胞DNA并使用2个探针进行杂交,探针及目的片段长度如表3所示),确认是否存在随机插入。示例性结果如图7所示,结合PCR和测序结果,编号为F1-01至F1-03的3只小鼠均无随机插入。这表明使用本方法能构建出可稳

定传代且无随机插入的TL1A基因人源化小鼠。

[0326] 表3具体探针及目的片段的长度

	限制性内切酶	探针	野生型片段大小	重组序列片段大小
[0327]	AseI	5' Probe	10.8kb	7.8 kb
	BamHI	A Probe	-	18.2 kb

[0328] 5' Probe-F (SEQ ID NO:29) :5' -CATAATTCAAATGCCCTTCAGTGGG-3' ,

[0329] 5' Probe-R (SEQ ID NO:30) :5' -CTGACTTGGCTTGGCTCTTTCTGTGTC-3' ;

[0330] A Probe -F (SEQ ID NO:31) :5' -TTCAGCTCTGTCAATATCAAGG-3' ,

[0331] A Probe -R (SEQ ID NO:32) :5' -GGCCAACAGCTTGACAACAGC-3' ;

[0332] 可以通过RT-PCR检测TL1A基因人源化小鼠体内mRNA的表达情况,具体来说,分别选取7周龄雌性C57BL/6小鼠(+/+)和本实施例制备的7周龄雌性TL1A基因人源化纯合子(H/H)各1只,脱颈安乐死后取肺组织,使用下表4所示的引物序列进行RT-PCR检测,检测结果表明,在野生型C57BL/6小鼠体内仅检测到小鼠TL1A mRNA,未检测到人TL1A mRNA;在TL1A基因人源化纯合子小鼠体内仅检测到人TL1A mRNA。

[0333] 表4 RT-PCR引物序列及目的片段大小

	引物名称	序列名称	序列(5'-3')	片段大小
	M-F	SEQ ID NO: 33	CTTCGGGCCATAACAGAAGAGA	386bp
	M-R	SEQ ID NO: 34	GACTTGGACCCTGTTAGTAGGC	
[0334]	H-F	SEQ ID NO: 35	TAGAGCAGACGGAGATAAGCCA	281bp
	H-R	SEQ ID NO: 36	TGATGACCACAGTGATGGAGTC	
	GAPDH-F	SEQ ID NO: 37	TCACCATCTTCCAGGAGCGAGA	479bp
	GAPDH-R	SEQ ID NO: 38	GAAGGCCATGCCAGTGAGCTT	

[0335] 通过流式细胞术确认小鼠体内人源化TL1A蛋白(chiTL1A)表达情况。具体来说,选取7周龄雄性野生型C57BL/6小鼠(+/+)和7周龄雄性TL1A基因人源化纯合子小鼠(H/H)各1只,脱颈安乐死后取肺组织。使用Purified anti-mouse CD16/32 Antibody、Zombie NIR™ Fixable Viability Kit、BV480 Rat Anti-Mouse CD31 Antibody、Mouse IgG1 kappa Isotype Control (P3.6.2.8.1), PerCP-eFluor 710 , eBioscience™、Polyclonal Rabbit IgG Isotype Control Antibody (RPE)以及人鼠交叉抗体Polyclonal Rabbit anti-Human TNFSF15 / TL1A / VEG1 Antibody (PE, aa148-175, IF, WB) LS-C241951和TL1A Monoclonal Antibody (Tandys1a), PerCP-eFluor 710, eBioscience™ 进行检测,确认在C57BL/6小鼠和TL1A基因人源化纯合子小鼠中均检测TL1A蛋白表达(结果未展示)。结合上述RT-PCR结果,说明改造后的TL1A基因人源化纯合子小鼠体内可正常表达人源化TL1A蛋白。

[0336] 此外,为了进一步确定TL1A基因人源化纯合子小鼠体内可溶性TL1A的表达情况。分别选取6周龄雄性野生型C57BL/6小鼠(+/+)和6周龄雄性TL1A基因人源化纯合子小鼠(H/H)各3只,取骨髓,分离骨髓来源的树突状细胞,加入1μg/mL 的LPS刺激24h,收集上清液并使用特异性人TL1A ELISA试剂盒Human TL1A/TNFSF15 DuoSet ELISA检测可溶性TL1A的水平。检测结果(见图8)表明,可溶性人TL1A仅在TL1A基因人源化纯合子小鼠中检测到,证明改造后的TL1A基因人源化纯合子小鼠体内功能正常。

[0337] 实施例2 药效模型

[0338] 利用实施例1所述方法制得的TL1A人源化小鼠可以用于评估靶向人TL1A的调节剂的药效。例如,取TL1A人源化纯合子小鼠,随机分为空白组、对照组或治疗组,对照组和治疗组施用100ml 2%~3%硫酸葡聚糖(DSS)进行结肠炎造模,空白组施用等体积的饮用水。待造模成功后,治疗组随机选择靶向人TL1A的药物,对照组注射等体积的生理盐水。定期测量小鼠体重和粪便硬度,通过比较小鼠体重、粪便硬度、便血情况和结肠HE病理评分即可有效评估化合物的体内安全性和体内药效。

[0339] 实施例3 双基因或多基因人源化鼠的制备

[0340] 利用本方法或制得的TL1A基因人源化小鼠还可以制备多人源化小鼠模型。例如,前述实施例1中,显微注射使用的胚胎干细胞可选择来源于含有IL23A、IL12B、TNFA、TNFR1、TNFR2、PD-1、PD-L1、CTLA4、4-1BB、CD3、LAG3等基因修饰的小鼠,或者,也可在人源化TL1A小鼠的基础上,利用分离小鼠ES胚胎干细胞和基因重组打靶技术,获得双人源化或多人源化小鼠模型。也可将本方法得到TL1A小鼠纯合子或杂合子与其它基因修饰小鼠交配,对其后代进行筛选,根据孟德尔遗传规律,可有一定机率得到人源化TL1A基因与其他基因修饰的多基因小鼠,再将杂合子相互交配可以得到双基因或多基因修饰的纯合子。

[0341] 以上详细描述了本发明的优选实施方式,但是,本发明并不限于上述实施方式中的具体细节,在本发明的技术构思范围内,可以对本发明的技术方案进行多种简单变型,这些简单变型均属于本发明的保护范围。

[0342] 另外需要说明的是,在上述具体实施方式中所描述的各个具体技术特征,在不矛盾的情况下,可以通过任何合适的方式进行组合,为了避免不必要的重复,本发明对各种可能的组合方式不再另行说明。

[0343] 此外,本发明的各种不同的实施方式之间也可以进行任意组合,只要其不违背本发明的思想,其同样应当视为本发明所公开的内容。

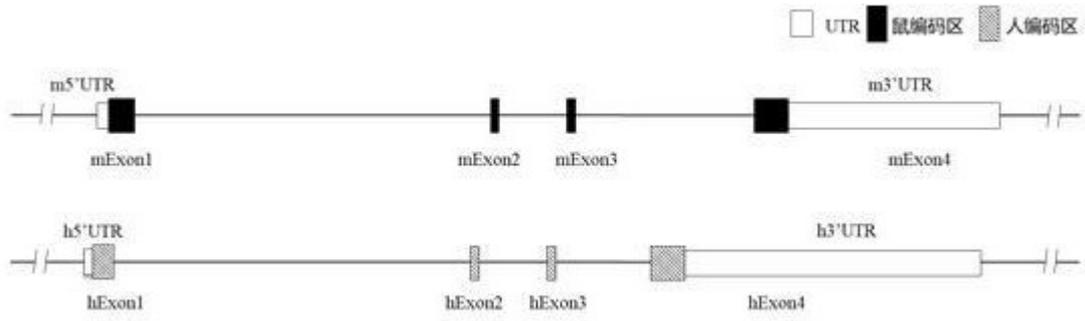


图 1

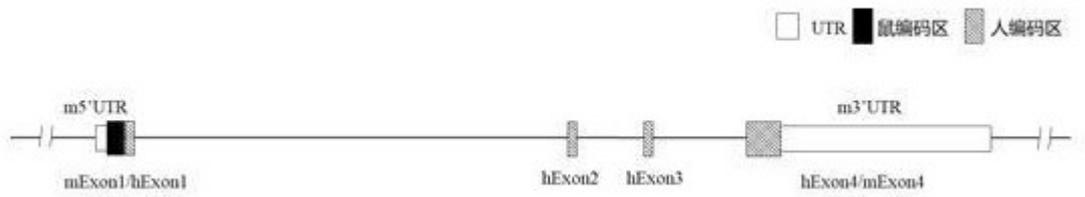


图 2

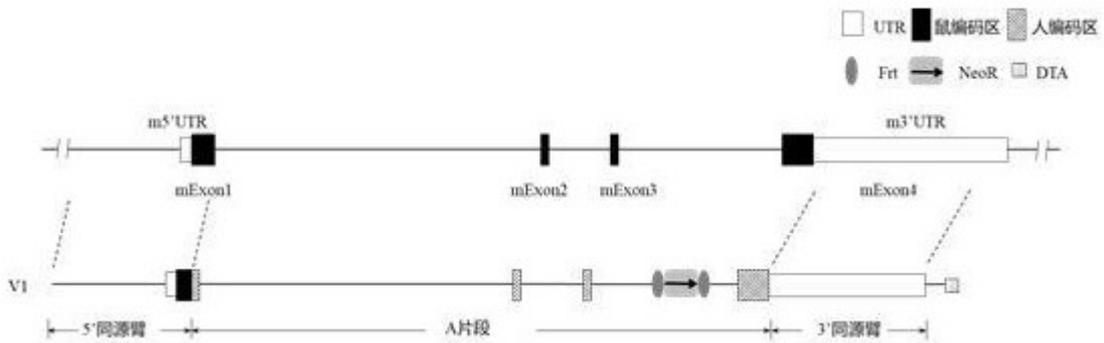


图 3

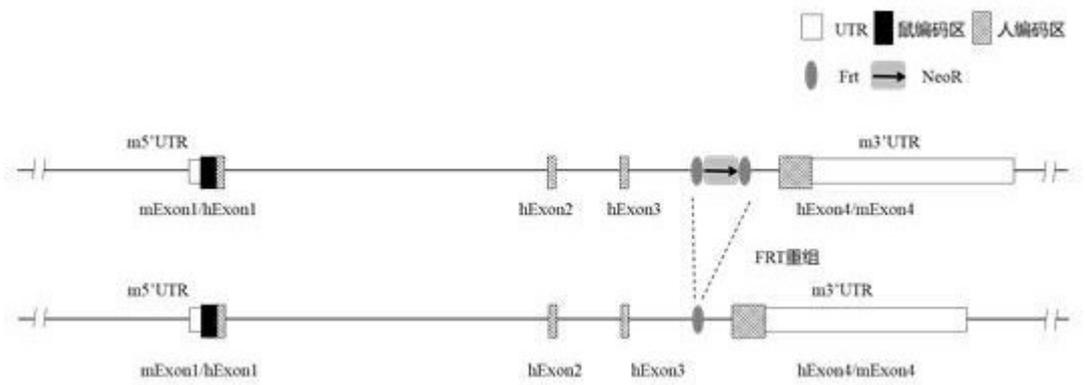


图 4

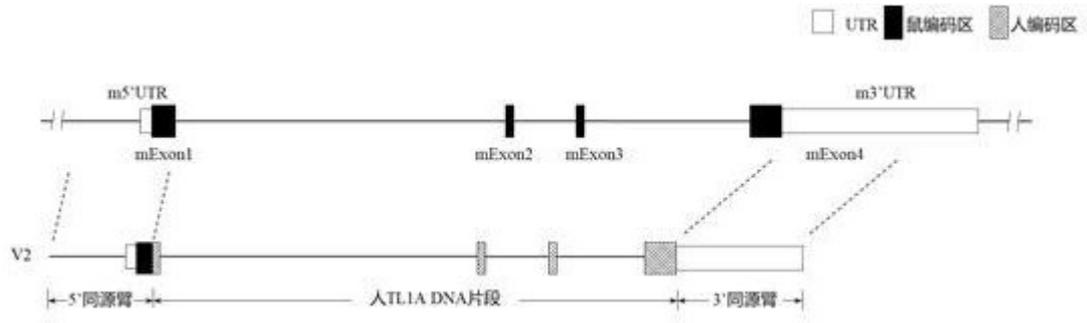


图 5

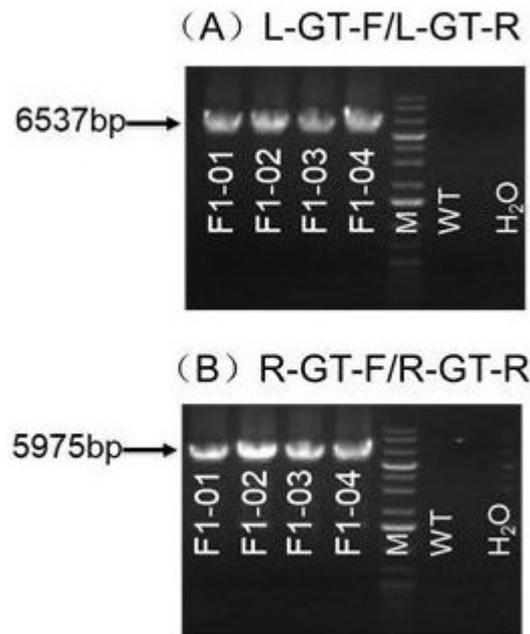


图 6

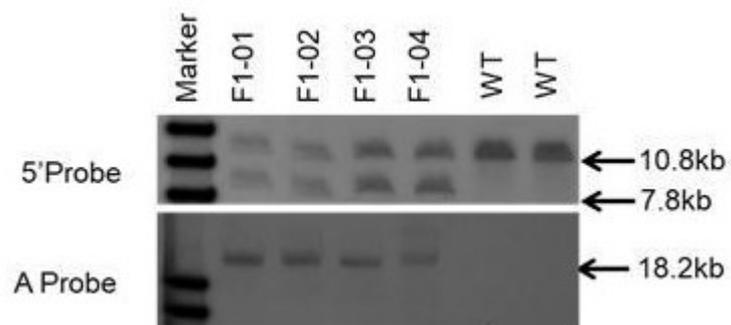


图 7

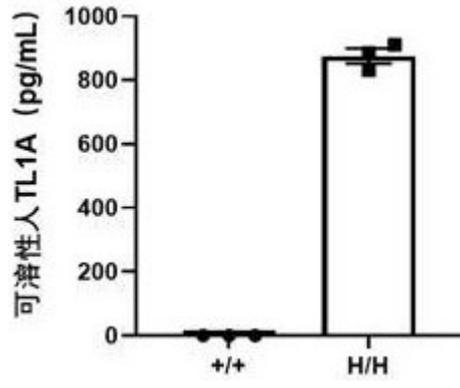


图 8