



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 107105633 B

(45) 授权公告日 2021.02.12

(21) 申请号 201580063680.4

(22) 申请日 2015.11.23

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 107105633 A

(43) 申请公布日 2017.08.29

(30) 优先权数据  
62/083,653 2014.11.24 US  
62/106,999 2015.01.23 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日  
2017.05.24

(86) PCT国际申请的申请数据  
PCT/US2015/062229 2015.11.23

(87) PCT国际申请的公布数据  
W02016/085889 EN 2016.06.02

(73) 专利权人 瑞泽恩制药公司

地址 美国纽约

(72) 发明人 K·L·奥尔森 E·史密斯  
K-M·V·莱 A·J·墨菲  
G·瑟斯顿 D·郭

(74) 专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所  
有限公司 11038

代理人 罗菊华

(51) Int.Cl.  
C07K 14/725 (2006.01)  
A01K 67/027 (2006.01)  
G01N 33/50 (2006.01)

审查员 李杨青

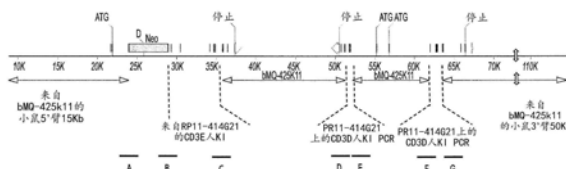
权利要求书4页 说明书28页 附图15页

(54) 发明名称

表达人源化CD3复合物的非人类动物

(57) 摘要

本发明提供了表达人源化CD3蛋白的非人类动物。本发明还提供了经遗传修饰以在其基因组中包含人源化CD3蛋白的非人类动物,例如啮齿动物。另外,本发明提供了制备此类非人类动物的方法和组合物以及使用所述非人类动物的方法。



1. 一种经遗传修饰的啮齿动物基因组,其中:  
    在内源性CD3 $\epsilon$ 基因座包含编码包含人CD3 $\epsilon$ 的细胞外结构域的功能性嵌合人/啮齿动物CD3 $\epsilon$ 蛋白的核酸序列;  
    在内源性CD3 $\delta$ 基因座包含编码包含人CD3 $\delta$ 的细胞外结构域的功能性嵌合人/啮齿动物CD3 $\delta$ 蛋白的核酸序列;并且  
    在内源性CD3 $\gamma$ 基因座包含编码包含人CD3 $\gamma$ 的细胞外结构域的功能性嵌合人/啮齿动物CD3 $\gamma$ 蛋白的核酸序列;  
    其中所述基因组编码内源性T-细胞受体;并且  
    其中所述啮齿动物基因组是大鼠基因组或小鼠基因组。
2. 根据权利要求1所述的遗传修饰的啮齿动物基因组,其中所述内源性CD3 $\epsilon$ 、CD3 $\delta$ 和CD3 $\gamma$ 基因座各自缺乏编码内源性啮齿动物CD3 $\epsilon$ 、CD3 $\delta$ 和CD3 $\gamma$ 蛋白的功能性细胞外结构域的序列。
3. 根据权利要求1所述的遗传修饰的啮齿动物基因组,其中所述功能性嵌合人/啮齿动物CD3 $\epsilon$ 蛋白包含SEQ ID NO:33的序列,所述功能性嵌合人/啮齿动物CD3 $\delta$ 蛋白包含SEQ ID NO:34的序列,和所述功能性嵌合人/啮齿动物CD3 $\gamma$ 蛋白包含SEQ ID NO:35的序列。
4. 根据权利要求1所述的遗传修饰的啮齿动物基因组,其中所述啮齿动物基因组为大鼠基因组。
5. 根据权利要求1所述的遗传修饰的啮齿动物基因组,其中所述编码功能性嵌合人/啮齿动物CD3 $\epsilon$ 蛋白的核酸序列取代了编码内源性啮齿动物CD3 $\epsilon$ 蛋白的基因组核酸序列;所述编码功能性嵌合人/啮齿动物CD3 $\delta$ 蛋白的核酸序列取代了编码内源性啮齿动物CD3 $\delta$ 蛋白的基因组核酸序列;以及所述编码功能性嵌合人/啮齿动物CD3 $\gamma$ 蛋白的核酸序列取代了编码内源性啮齿动物CD3 $\gamma$ 蛋白的基因组核酸序列。
6. 根据权利要求1-5中任一项所述的遗传修饰的啮齿动物基因组,其对于所述经修饰的内源性CD3基因座是杂合的。
7. 根据权利要求1-5中任一项所述的遗传修饰的啮齿动物基因组,其对于所述经修饰的内源性CD3基因座是纯合的。
8. 一种遗传修饰的小鼠基因组,其中:  
    在内源性小鼠CD3 $\epsilon$ 基因座处包含编码含有人CD3 $\epsilon$ 蛋白细胞外结构域的功能性嵌合人/小鼠CD3 $\epsilon$ 蛋白的核酸序列,  
    在内源性小鼠CD3 $\delta$ 基因座处包含编码含有人CD3 $\delta$ 蛋白细胞外结构域的功能性嵌合人/小鼠CD3 $\delta$ 蛋白的核酸序列,并且  
    在内源性小鼠CD3 $\gamma$ 基因座处包含编码含有人CD3 $\gamma$ 蛋白细胞外结构域的功能性嵌合人/小鼠CD3 $\gamma$ 蛋白的核酸序列,  
    其中所述基因组编码内源性T-细胞受体。
9. 根据权利要求8所述的遗传修饰的小鼠基因组,其中所述功能性的嵌合人/小鼠CD3 $\epsilon$ 蛋白的氨基酸序列示于SEQ ID NO:24,所述功能性的嵌合人/小鼠CD3 $\delta$ 蛋白的氨基酸序列示于SEQ ID NO:25,并且所述功能性的嵌合人/小鼠CD3 $\gamma$ 蛋白的氨基酸序列示于SEQ ID NO:26。
10. 根据权利要求8所述的遗传修饰的小鼠基因组,其中所述编码功能性嵌合人/小鼠

CD3 $\epsilon$ 蛋白的核酸序列取代了编码内源性小鼠CD3 $\epsilon$ 蛋白的基因组核酸序列;所述编码功能性嵌合人/小鼠CD3 $\delta$ 蛋白的核酸序列取代了编码内源性小鼠CD3 $\delta$ 蛋白的基因组核酸序列;以及所述编码功能性嵌合人/小鼠CD3 $\gamma$ 蛋白的核酸序列取代了编码内源性小鼠CD3 $\gamma$ 蛋白的基因组核酸序列。

11. 根据权利要求8-10中任一项所述的遗传修饰的小鼠基因组,其对于所述经修饰的内源性小鼠CD3基因座而言为杂合的。

12. 根据权利要求8-10中任一项所述的遗传修饰的小鼠基因组,其对于所述经修饰的内源性小鼠CD3基因座而言为纯合的。

13. 一种制备经遗传修饰的啮齿动物的方法,包括:

(a) 在内源性CD3 $\epsilon$ 基因座处将编码人CD3 $\epsilon$ 的细胞外结构域的核酸序列引入所述啮齿动物的胚胎干(ES)细胞的基因组中,以使得内源性CD3 $\epsilon$ 基因座编码功能性的嵌合人/啮齿动物CD3 $\epsilon$ 蛋白,

在内源性CD3 $\delta$ 基因座处将编码人CD3 $\delta$ 的细胞外结构域的核酸序列引入所述啮齿动物的胚胎干(ES)细胞的基因组中,以使得内源性CD3 $\delta$ 基因座编码功能性的嵌合人/啮齿动物CD3 $\delta$ 蛋白,和

在内源性CD3 $\gamma$ 基因座处将编码人CD3 $\gamma$ 的细胞外结构域的核酸序列引入所述啮齿动物的胚胎干(ES)细胞的基因组中,以使得内源性CD3 $\gamma$ 基因座编码功能性的嵌合人/啮齿动物CD3 $\gamma$ 蛋白;以及

(b) 由所述细胞产生经遗传修饰的啮齿动物;

其中所述ES细胞的基因组编码内源性T-细胞受体,并且所述啮齿动物是大鼠或小鼠。

14. 根据权利要求13所述的方法,其中所述啮齿动物为大鼠。

15. 根据权利要求13所述的方法,其中所述啮齿动物为小鼠。

16. 根据权利要求15所述的方法,其中所述功能性的嵌合人/小鼠CD3 $\epsilon$ 蛋白的所述氨基酸序列示于SEQ ID NO:24,所述功能性的嵌合人/小鼠CD3 $\delta$ 蛋白的所述氨基酸序列示于SEQ ID NO:25,并且所述功能性的嵌合人/小鼠CD3 $\gamma$ 蛋白的所述氨基酸序列示于SEQ ID NO:26。

17. 根据权利要求15所述的方法,其中所述引入包括:

用编码功能性嵌合人/小鼠CD3 $\epsilon$ 蛋白的核酸序列取代编码内源性小鼠CD3 $\epsilon$ 蛋白的基因组核酸序列;

用编码功能性嵌合人/小鼠CD3 $\delta$ 蛋白的核酸序列取代编码内源性小鼠CD3 $\delta$ 蛋白的基因组核酸序列;以及

用编码功能性嵌合人/小鼠CD3 $\gamma$ 蛋白的核酸序列取代编码内源性小鼠CD3 $\gamma$ 蛋白的基因组核酸序列。

18. 根据权利要求15-17中任一项所述的方法,其中所述ES细胞被引入小鼠胚胎中以产生小鼠。

19. 一种制备用于测试基于CD3的双特异性抗原结合蛋白的小鼠模型的方法,其中所述抗原结合蛋白能够结合CD3和非小鼠的目标抗原两者,所述方法包括:(1) 根据权利要求15-17中任一项所述的方法制备经遗传修饰的小鼠,和(2) 获得表达或包括所述非小鼠的目标

抗原的细胞。

20. 一种对抗原结合蛋白筛选T-细胞活化活性的方法,其中所述抗原结合蛋白结合人CD3和目标抗原,所述方法包括:

a. 将所述目标抗原引入经遗传修饰的小鼠中,所述经遗传修饰的小鼠:

在内源性小鼠CD3 $\epsilon$ 基因座处包含编码含有人CD3 $\epsilon$ 蛋白细胞外结构域的功能性嵌合人/小鼠CD3 $\epsilon$ 蛋白的核酸序列,

在内源性小鼠CD3 $\delta$ 基因座处包含编码含有人CD3 $\delta$ 蛋白细胞外结构域的功能性嵌合人/小鼠CD3 $\delta$ 蛋白的核酸序列,并且

在内源性小鼠CD3 $\gamma$ 基因座处包含编码含有人CD3 $\gamma$ 蛋白细胞外结构域的功能性嵌合人/小鼠CD3 $\gamma$ 蛋白的核酸序列;

b. 将所述抗原结合蛋白施用于所述小鼠;以及

c. 测定所述抗原结合蛋白是否有效激活表达功能性人源化CD3复合物和内源性T-细胞受体的小鼠T细胞。

21. 根据权利要求20所述的方法,其中所述功能性的嵌合人/小鼠CD3 $\epsilon$ 蛋白的氨基酸序列示于SEQ ID NO:24,所述功能性的嵌合人/小鼠CD3 $\delta$ 蛋白的氨基酸序列示于SEQ ID NO:25,并且所述功能性的嵌合人/小鼠CD3 $\gamma$ 蛋白的氨基酸序列示于SEQ ID NO:26。

22. 根据权利要求20所述的方法,其中所述编码功能性嵌合人/小鼠CD3 $\epsilon$ 蛋白的核酸序列取代了编码内源性小鼠CD3 $\epsilon$ 蛋白的基因组核酸序列;所述编码功能性嵌合人/小鼠CD3 $\delta$ 蛋白的核酸序列取代了编码内源性小鼠CD3 $\delta$ 蛋白的基因组核酸序列;以及所述编码功能性嵌合人/小鼠CD3 $\gamma$ 蛋白的核酸序列取代了编码内源性小鼠CD3 $\gamma$ 蛋白的基因组核酸序列。

23. 根据权利要求20所述的方法,其中所述引入步骤包括遗传修饰所述小鼠以表达所述目标抗原。

24. 根据权利要求20所述的方法,其中所述引入步骤包括将表达所述目标抗原的细胞引入所述小鼠中。

25. 根据权利要求24所述的方法,其中所述细胞为肿瘤细胞。

26. 根据权利要求24所述的方法,其中所述细胞为细菌细胞。

27. 根据权利要求20所述的方法,其中所述引入步骤包括用病毒感染小鼠。

28. 根据权利要求20所述的方法,其中所述小鼠为具有免疫能力的小鼠。

29. 根据权利要求20所述的方法,其中所述目标抗原为肿瘤相关抗原。

30. 根据权利要求20-25和28-29中任一项所述的方法,其中所述目标抗原是选自下述的肿瘤相关抗原:ALK、BALE蛋白、BIRC5(存活素)、BIRC7、CA9、CALR、CCR5、CD19、CD20(MS4A1)、CD22、CD27、CD30、CD33、CD38、CD40、CD44、CD52、CD56、CD79、CDK4、CEACAM3、CEACAM5、CLEC12A、EGFR、EGFR变体III、ERBB2(HER2)、ERBB3、ERBB4、EPCAM、EPHA2、EPHA3、FCRL5、FLT3、FOLR1、GAGE蛋白、GD2、GD3、GPNMB、GM3、GPR112、IL3RA、KIT、KRAS、LGR5、EBV衍生的LMP2、L1CAM、MAGE蛋白、MLANA、MSLN、MUC1、MUC2、MUC3、MUC4、MUC5、MUC16、MUM1、ANKRD30A、NY-ES01(CTAG1B)、OX40、PAP、PAX3、PAX5、PLAC1、PRLR、PMEL、PRAME、PSMA(FOLH1)、RAGE蛋白、RET、RGS5、ROR1、SART1、SART3、SLAMF7、SLC39A6(LIV1)、STEAP1、STEAP2、TERT、TMPRSS2、Thompson-nouvelle抗原、TNFRSF17、TYR、UPK3A、VTCN1和WT1。

31. 根据权利要求20所述的方法,其中所述目标抗原为病毒抗原。

32. 根据权利要求20-24、27-28和31中任一项所述的方法,其中所述目标抗原是选自下述的病毒的病毒抗原:HIV、甲肝病毒、乙肝病毒、丙肝病毒、疱疹病毒、腺病毒、流感病毒、黄热病毒、艾柯病毒、鼻病毒、柯萨基病毒、冠状病毒、呼吸道合胞病毒、流腮病毒、轮状病毒、麻疹病毒、风疹病毒、细小病毒、牛痘病毒、HTLV、登革病毒、乳头状瘤病毒、软疣病毒、脊髓灰质炎病毒、狂犬病毒、JC病毒、埃博拉病毒和虫媒病毒性脑炎病毒。

33. 根据权利要求20所述的方法,其中所述目标抗原为细菌抗原。

34. 根据权利要求20-24、26、28和33中任一项所述的方法,其中所述目标抗原是选自下述的细菌抗原:衣原体、立克次氏体、分枝杆菌、葡萄球菌、链球菌、肺炎双球菌、脑膜炎双球菌、淋菌、克雷伯氏菌、变形杆菌、沙雷氏菌、假单胞菌、军团杆菌、白喉菌、沙门氏菌、芽孢杆菌、霍乱菌、破伤风杆菌、肉毒杆菌、炭疽杆菌、鼠疫、钩旋体和莱姆病细菌抗原。

35. 根据权利要求20-29、31和33中任一项所述的方法,其中所述抗原结合蛋白为双特异性抗体。

36. 根据权利要求20-29、31和33中任一项所述的方法,其中所述抗原结合蛋白能够识别猴CD3蛋白。

## 表达人源化CD3复合物的非人类动物

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请是2014年11月24日提交的62/083,653和2015年1月23日提交的62/106,999的正式(nonprovisional)申请,为所有目的,上述二者各自的全文以引用方式并入本文。

[0003] 序列表的引用

[0004] 本申请包含名为470382\_SEQLIST.txt的文本文件中的序列,该文件创建于2015年11月23日,大小为23,965字节,其以引用方式并入本文。

### 技术领域

[0005] 本发明提供了一种经遗传修饰的非人类动物(例如啮齿动物,例如小鼠或大鼠),该动物基因组中包含编码人源化CD3蛋白(例如人源化CD3 $\epsilon$ 、人源化CD3 $\delta$ 和/或人源化CD3 $\gamma$ )的核酸序列。因此,本发明提供了表达人源化CD3复合物的经遗传修饰的非人类动物。本文还提供了一种临床前试验模型,用于CD3治疗剂,例如CD3抗体,例如CD3双特异性抗体。

### 背景技术

[0006] 除了T细胞受体亚基(例如高度可变的TCR $\alpha$ 和TCR $\beta$ ),T细胞表面的T细胞受体复合物还包含不变的CD3 $\epsilon$ 、CD3 $\delta$ 和CD3 $\gamma$ 链,这些链形成由CD3 $\epsilon\delta$ 和CD3 $\epsilon\gamma$ 组成的异源二聚体。 $\zeta$ 链也与TCR/CD3复合物相关,其以二硫键连接的同源二聚体形式存在。

[0007] CD3链在T细胞受体组装、转运到细胞表面、表面受体内吞作用、T细胞发育和T细胞信号转导方面具有重要作用。例如,对多种CD3亚基缺陷的研究证明,CD3链对于双阴性(CD4 $^-$ -CD8 $^-$ ,或DN)到双阳性(CD4 $^+$ CD8 $^+$ ,或DP)到单阳性(CD4 $^+$ 或CD8 $^+$ ,或SP)T细胞转换非常重要。此外,CD3 $\epsilon$ 、CD3 $\delta$ 和CD3 $\gamma$ 链各含有一个免疫受体酪氨酸激活基序(ITAM),而 $\zeta$ 链二聚体含有6个ITAM。这些基序起到信号转导模块的作用,并在TCR参与下被相关激酶磷酸化。

[0008] 抗CD3的抗体被证明能聚集T细胞上的CD3,从而通过与装载肽的MHC分子与TCR的结合相似的方式导致T细胞激活。因此,建议将抗CD3抗体用作旨在激活T细胞的候选治疗剂。此外,建议将能结合CD3和靶抗原的双特异性抗体用作治疗用途,涉及将T细胞免疫应答靶向到表达该靶抗原的组织和细胞。

[0009] 特别需要便利的动物模型,用于单特异性CD3和双特异性CD3治疗剂抗体的临床前试验。

### 发明内容

[0010] 本文提供了经遗传修饰的非人类动物(例如啮齿动物,例如小鼠或大鼠),该动物包含经遗传修饰、编码人CD3蛋白的细胞外结构域的内源性非人类CD3基因座,其中该人CD3蛋白是CD3 $\epsilon$ 、CD3 $\delta$ 、CD3 $\gamma$ 、CD3 $\zeta$ ,或其任意组合。在一个实施例中,内源性非人类CD3基因座经遗传修饰,编码人CD3 $\epsilon$ 的细胞外结构域、人CD3 $\delta$ 的细胞外结构域和人CD3 $\gamma$ 的细胞外结构域。在一个实施例中,内源性非人类CD3基因座经遗传修饰,以不表达相应非人类蛋白的功能性细胞外结构域。在一个实施例中,内源性非人类CD3基因座还编码相应内源性非人类动

物CD3蛋白的跨膜结构域和细胞质结构域,其中该动物在其T细胞表面上表达嵌合CD3蛋白,该T细胞包括人CD3蛋白的细胞外结构域和内源性非人类动物CD3蛋白的跨膜结构域和细胞质结构域。在一个实施例中,非人类动物中编码人CD3的细胞外结构域的核酸序列被有效连接到编码相应非人类动物CD3蛋白的跨膜结构域和细胞质结构域的核酸序列。在一个具体实施例中,非人类动物包含:(a)在内源性CD3 $\epsilon$ 基因座处编码人CD3 $\epsilon$ 细胞外结构域的核酸序列,该序列与编码内源性非人类动物CD3 $\epsilon$ 跨膜结构域和细胞质结构域的核酸序列有效连接,(b)在内源性CD3 $\delta$ 基因座处编码人CD3 $\delta$ 细胞外结构域的核酸序列,该序列与编码内源性非人类动物CD3 $\delta$ 跨膜结构域和细胞质结构域的核酸序列有效连接,以及(c)在内源性CD3 $\gamma$ 基因座处编码人CD3 $\gamma$ 细胞外结构域的核酸序列,该序列与编码内源性非人类动物CD3 $\gamma$ 跨膜结构域和细胞质结构域的核酸序列有效连接。其中非人类动物在其T细胞表面表达嵌合CD3 $\epsilon$ 、CD3 $\delta$ 和CD3 $\gamma$ 。在一些实施例中,非人类动物中CD3蛋白的细胞外结构域包括选自SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34和SEQ ID NO:35的序列。在一些实施例中,动物包括人CD3蛋白的细胞外结构域,所述细胞外结构域包括选自SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34和SEQ ID NO:35的序列。

[0011] 在一些实施例中,本文所述的经遗传修饰的非人类动物包括与CD3启动子有效连接的编码人CD3蛋白细胞外结构域的核酸序列。因此,在一些实施例中,本文所述的非人类动物包括编码以下各项的核酸序列:与CD3启动子有效连接的人CD3 $\epsilon$ 的细胞外结构域,与CD3启动子有效连接的人CD3 $\delta$ 的细胞外结构域,以及与CD3启动子有效连接的人CD3 $\gamma$ 的细胞外结构域。在一个实施例中,CD3启动子为非人动物CD3启动子。在一个实施例中,CD3启动子为人CD3启动子。在一个实施例中,CD3启动子为内源性非人CD3启动子。

[0012] 在一个具体实施例中,非人动物为哺乳动物。在一个实施例中,动物为啮齿动物。在一个实施例中,动物为大鼠或小鼠。在一个实施例中,动物为小鼠。因此,在一个实施例中,本文提供了一种经遗传修饰的小鼠,其中所述小鼠包含:(a)在内源性小鼠CD3 $\epsilon$ 基因座处编码人CD3 $\epsilon$ 细胞外结构域的核酸序列,该序列与编码内源性小鼠CD3 $\epsilon$ 跨膜结构域和细胞质结构域的核酸序列有效连接,(b)在内源性小鼠CD3 $\delta$ 基因座处编码人CD3 $\delta$ 细胞外结构域的核酸序列,该序列与编码内源性小鼠CD3 $\delta$ 跨膜结构域和细胞质结构域的核酸序列有效连接,以及(c)在内源性小鼠CD3 $\gamma$ 基因座处编码人CD3 $\gamma$ 细胞外结构域的核酸序列,该序列与编码内源性小鼠CD3 $\gamma$ 跨膜结构域和细胞质结构域的核酸序列有效连接,并且所述小鼠在其T细胞表面表达人源化CD3 $\epsilon$ 、CD3 $\delta$ 和CD3 $\gamma$ 。在一个实施例中,小鼠的人源化CD3 $\epsilon$ 蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO:24中所述,人源化CD3 $\delta$ 蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO:25中所述,人源化CD3 $\gamma$ 蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO:26中所述。在一个实施例中,本文提供的经遗传修饰的小鼠包括与小鼠CD3启动子有效连接的编码人CD3细胞外结构域的核酸序列。在一个实施例中,启动子为内源性小鼠CD3启动子。在另一个实施例中,本文提供的经遗传修饰的小鼠包括与人CD3启动子有效连接的编码人CD3细胞外结构域的核酸序列。在一个实施例中,所述小鼠与未经遗传修饰以表达人源化CD3蛋白的小鼠相比,在胸腺中呈现相似的CD4<sup>+</sup>与CD8<sup>+</sup>细胞比率。在一个实施例中,所述小鼠胸腺中CD4<sup>+</sup>与CD8<sup>+</sup>细胞的比在未经遗传修饰以表达人源化CD3蛋白的小鼠的CD4<sup>+</sup>与CD8<sup>+</sup>细胞的比的30%、25%、20%、15%、12%、10%、5%或2%以内。在一个实施例中,所述小鼠与未经遗传修饰以表达人源化CD3蛋白的小鼠相比,在脾、淋巴结和外周血中呈现相似的T细胞和B细胞百分比。在一个实施例中,所述小鼠

与未经遗传修饰以表达人源化CD3蛋白的小鼠相比,呈现相似数量的循环白细胞、淋巴细胞、单核细胞、嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞。

[0013] 因此,在一个方面,本文提供了一种经遗传修饰的小鼠,所述小鼠在内源性小鼠CD3基因座处包括编码人CD3蛋白细胞外结构域的核酸序列,其中所述人CD3蛋白选自CD3 $\epsilon$ 、CD3 $\delta$ 、CD3 $\gamma$ 、CD3 $\zeta$ ,及其组合。在一个实施例中,小鼠包含人CD3 $\epsilon$ 、CD3 $\delta$ 和CD3 $\gamma$ 的细胞外结构域。在所述小鼠的一个实施例中,所述人CD3 $\epsilon$ 的细胞外结构域如SEQ ID NO:33中所述,所述人CD3 $\delta$ 的细胞外结构域如SEQ ID NO:34中所述,所述人CD3 $\gamma$ 的细胞外结构域如SEQ ID NO:35中所述。在一个实施例中,小鼠表达人源化CD3 $\epsilon$ 、人源化CD3 $\delta$ 和人源化CD3 $\gamma$ 。在所述小鼠的一个实施例中,人源化CD3 $\epsilon$ 如SEQ ID NO:24中所述,人源化CD3 $\delta$ 如SEQ ID NO:25中所述,人源化CD3 $\gamma$ 如SEQ ID NO:26中所述。在一个实施例中,小鼠还包括小鼠CD3 $\epsilon$ 、CD3 $\delta$ 和CD3 $\gamma$ 跨膜结构域和细胞质结构域。在一个实施例中,小鼠还包括内源性小鼠CD3 $\epsilon$ 、CD3 $\delta$ 和CD3 $\gamma$ 跨膜结构域和细胞质结构域。

[0014] 在另一个方面,本文提供了一种制备表达人源化CD3蛋白的经遗传修饰的非人类动物的方法,包括将编码人CD3蛋白细胞外结构域的核酸序列引入非人类动物细胞的基因组中,其中所述人CD3蛋白选自CD3 $\epsilon$ 、CD3 $\delta$ 、CD3 $\gamma$ 、CD3 $\zeta$ ,及其组合;以及由所述细胞繁殖所述经遗传修饰的非人类动物。在所述方法的一个实施例中,动物不包含相应非人类蛋白的功能性细胞外结构域。在所述方法的一个实施例中,动物在内源性非人类CD3基因座处包含编码人CD3 $\epsilon$ 的细胞外结构域、人CD3 $\delta$ 的细胞外结构域和人CD3 $\gamma$ 的细胞外结构域的核酸序列。在所述方法的一个实施例中,人CD3 $\epsilon$ 的细胞外结构域如SEQ ID NO:33中所述,人CD3 $\delta$ 的细胞外结构域如SEQ ID NO:34中所述,人CD3 $\gamma$ 的细胞外结构域如SEQ ID NO:35中所述。在所述方法的一个实施例中,动物不包含相应非人类蛋白的功能性细胞外结构域。在一个具体实施例中,该方法包括在内源性CD3基因座处用人CD3蛋白的相应细胞外结构域替换非人CD3蛋白的细胞外结构域。在所述方法的一个实施例中,动物还包含编码相应内源性非人类动物CD3蛋白的跨膜结构域和细胞质结构域的核酸序列。在所述方法的一个实施例中,非人类动物是小鼠,替换是在内源性小鼠CD3基因座处。在其中所述动物是小鼠的该方法的一个实施例中,小鼠表达选自如SEQ ID NO:24中所述的人源化CD3 $\epsilon$ 、如SEQ ID NO:25中所述的人源化CD3 $\delta$ 、如SEQ ID NO:26中所述的人源化CD3 $\gamma$ ,及其组合的人源化CD3蛋白。在所述方法的一个实施例中,替换在单个ES细胞中进行,所述单个ES细胞被引入小鼠胚胎以产生小鼠。

[0015] 在又一个方面,本文提供了一种非人类动物模型,例如用于测试基于CD3的双特异性抗原结合蛋白的小鼠模型,其中抗原结合蛋白能够同时结合CD3和目标抗原,所述小鼠模型包含经遗传修饰以编码人CD3蛋白的细胞外结构域的小鼠,其中人CD3蛋白是CD3 $\epsilon$ 、CD3 $\delta$ 、CD3 $\gamma$ 、CD3 $\zeta$ ,或其任意组合(例如两种或更多种CD3蛋白的组合);并且所述小鼠模型包含表达或包含非小鼠目标抗原的细胞。所述模型中的非人类动物可以是上文或本文其他地方所述的任何非人类动物。在所述小鼠模型的一个实施例中,人源化CD3蛋白的核酸序列位于内源性CD3基因座处。在所述小鼠模型的一个实施例中,抗原结合蛋白已经被引入所述小鼠。在所述小鼠模型的一个实施例中,小鼠表达人CD3 $\epsilon$ 、CD3 $\delta$ 和CD3 $\gamma$ 细胞外结构域。在所述小鼠模型的一个实施例中,小鼠还表达小鼠CD3 $\epsilon$ 、CD3 $\delta$ 和CD3 $\gamma$ 跨膜结构域和细胞质结构域。

[0016] 在所述小鼠模型的一个实施例中,小鼠包含表达目标抗原的肿瘤的异种移植。在



所述小鼠模型的一个实施例中,表达或包含目标抗原的细胞是肿瘤细胞。在所述小鼠模型的一个实施例中,所选择的双特异性抗原结合蛋白同时结合到人源化CD3蛋白和目标抗原。在所述小鼠模型的一个实施例中,目标抗原是人抗原。在所述小鼠模型的一个实施例中,抗原结合蛋白能够结合猴CD3蛋白。在所述小鼠模型的一个实施例中,目标抗原是肿瘤相关抗原。在此类实施例中,肿瘤相关抗原可选自ALK、BAGE蛋白、BIRC5(存活素)、BIRC7、CA9、CALR、CCR5、CD19、CD20(MS4A1)、CD22、CD27、CD30、CD33、CD38、CD40、CD44、CD52、CD56、CD79、CDK4、CEACAM3、CEACAM5、CLEC12A、EGFR、EGFR变体III、ERBB2(HER2)、ERBB3、ERBB4、EPCAM、EPHA2、EPHA3、FCRL5、FLT3、FOLR1、GAGE蛋白、GD2、GD3、GPNMB、GM3、GPR112、IL3RA、KIT、KRAS、LGR5、源自EBV的LMP2、L1CAM、MAGE蛋白、MLANA、MSLN、MUC1、MUC2、MUC3、MUC4、MUC5、MUC16、MUM1、ANKRD30A、NY-ES01(CTAG1B)、OX40、PAP、PAX3、PAX5、PLAC1、PRLR、PMEL、PRAME、PSMA(FOLH1)、RAGE蛋白、RET、RGS5、ROR1、SART1、SART3、SLAMF7、SLC39A6(LIV1)、STEAP1、STEAP2、TERT、TMPRSS2、Thompson-nouvelle抗原、TNFRSF17、TYR、UPK3A、VTCN1、WT1。

[0017] 在另一个实施例中,目标抗原是传染性疾病相关抗原。在此类实施例中,小鼠可用传染性试剂感染。在一个此类实施例中,传染性疾病相关抗原可以是病毒抗原,所述病毒抗原选自HIV、甲肝病毒、乙肝病毒、丙肝病毒、疱疹病毒(例如HSV-1、HSV-2、CMV、HAV-6、VZV、艾普斯登-巴尔病毒)、腺病毒、流感病毒、黄热病毒、艾柯病毒、鼻病毒、柯萨基病毒、冠状病毒、呼吸道合胞病毒、流腮病毒、轮状病毒、麻疹病毒、风疹病毒、细小病毒、牛痘病毒、HTLV、登革病毒、乳头状瘤病毒、软疣病毒、脊髓灰质炎病毒、狂犬病毒、JC病毒、埃博拉病毒和虫媒病毒性脑炎病毒抗原。在另一个此类实施例中,传染性疾病相关抗原可以是细菌抗原,所述细菌抗原选自衣原体、立克次氏体、分枝杆菌、葡萄球菌、链球菌、肺炎双球菌、脑膜炎双球菌、淋菌、克雷伯氏菌、变形杆菌、沙雷氏菌、假单胞菌、军团杆菌、白喉菌、沙门氏菌、芽孢杆菌、霍乱菌、破伤风杆菌、肉毒杆菌、炭疽杆菌、鼠疫、螺旋体和莱姆病细菌抗原。

[0018] 在所述小鼠模型的一个实施例中,基于CD3的抗原结合蛋白是抗体。在一个实施例中,基于CD3的抗原结合蛋白是人或人源化抗原结合蛋白。此类小鼠模型可允许测试抗原结合蛋白在小鼠中的功效和/或毒性。

[0019] 本文还提供了一种筛选靶向目标抗原的候选药物的方法,包括(a)将目标抗原引入经遗传修饰的小鼠,所述经遗传修饰的小鼠包含经遗传修饰以编码人CD3蛋白细胞外结构域的内源性非人类CD3基因座,其中所述人CD3蛋白是如上文或本文其他地方所限定的CD3 $\epsilon$ 、CD3 $\delta$ 、CD3 $\gamma$ 、CD3 $\zeta$ ,或其任意组合;(b)使所述小鼠与目标候选药物接触,其中所述候选药物针对人CD3和目标抗原;以及(c)确定所述候选药物是否可有效防止、减少或消除以存在或表达所述目标抗原为特征的细胞。在所述方法的一个实施例中,经遗传修饰的小鼠在内源性小鼠CD3基因座处包含编码人CD3 $\epsilon$ 的细胞外结构域、人CD3 $\delta$ 的细胞外结构域和人CD3 $\gamma$ 的细胞外结构域的核酸序列。在所述方法的一个实施例中,小鼠不包含相应小鼠蛋白的功能性细胞外结构域。在所述方法的一个实施例中,小鼠包含编码相应内源性小鼠CD3蛋白的跨膜结构域和细胞质结构域的核酸序列。在所述方法的一个实施例中,编码人CD3的细胞外结构域的核酸序列被有效连接到编码相应内源性小鼠CD3蛋白的跨膜结构域和细胞质结构域的核酸序列。在所述方法的一个实施例中,人CD3 $\epsilon$ 的细胞外结构域如SEQ ID NO:33中所述,人CD3 $\delta$ 的细胞外结构域如SEQ ID NO:34中所述,人CD3 $\gamma$ 的细胞外结构域如SEQ ID NO:35中所述。因此,在所述方法的一个具体实施例中,小鼠表达包含SEQ ID NO:24中所述

的氨基酸序列的人源化CD3 $\epsilon$ 蛋白、包含SEQ ID NO:25中所述的氨基酸序列的人源化CD3 $\delta$ 蛋白,以及包含SEQ ID NO:26中所述的氨基酸序列的人源化CD3 $\gamma$ 蛋白。

[0020] 在本文所述的筛选候选药物的方法的一个具体实施例中,将目标抗原引入本文所述的小鼠这一步骤包括在小鼠中表达所述目标抗原。在一个实施例中,在小鼠中表达所述目标抗原这一步骤包括对小鼠进行遗传修饰以表达所述目标抗原。在一个实施例中,引入所述目标抗原这一步骤包括用所述目标抗原感染小鼠。在所述方法的一个实施例中,引入这一步骤包括将表达所述目标抗原的细胞引入所述小鼠。在所述方法的各种实施例中,细胞可以是肿瘤细胞、细菌细胞或用病毒感染的细胞。因此,在所述方法的一些实施例中,小鼠包含感染,所述感染是病毒感染或细菌感染。因此,目标抗原可以是传染性疾病相关抗原。在一个实施例中,目标抗原可以是病毒抗原,所述病毒抗原选自HIV、甲肝病毒、乙肝病毒、丙肝病毒、疱疹病毒(例如HSV-1、HSV-2、CMV、HAV-6、VZV、艾普斯登-巴尔病毒)、腺病毒、流感病毒、黄热病毒、艾柯病毒、鼻病毒、柯萨基病毒、冠状病毒、呼吸道合胞病毒、流腮病毒、轮状病毒、麻疹病毒、风疹病毒、细小病毒、牛痘病毒、HTLV、登革病毒、乳头状瘤病毒、软疣病毒、脊髓灰质炎病毒、狂犬病毒、JC病毒、埃博拉病毒和虫媒病毒性脑炎病毒抗原。在另一个实施例中,目标抗原可以是传染性疾病相关抗原,所述传染性疾病相关抗原是选自以下各项的细菌抗原:衣原体、立克次氏体、分枝杆菌、葡萄球菌、链球菌、肺炎双球菌、脑膜炎双球菌、淋菌、克雷伯氏菌、变形杆菌、沙雷氏菌、假单胞菌、军团杆菌、白喉菌、沙门氏菌、芽孢杆菌、霍乱菌、破伤风杆菌、肉毒杆菌、炭疽杆菌、鼠疫、螺旋体和莱姆病细菌抗原。

[0021] 在筛选候选药物的方法的另一个实施例中,目标抗原是肿瘤相关抗原。在所述方法的一个实施例中,肿瘤相关抗原选自ALK、BAGE蛋白、BIRC5(存活素)、BIRC7、CA9、CALR、CCR5、CD19、CD20(MS4A1)、CD22、CD27、CD30、CD33、CD38、CD40、CD44、CD52、CD56、CD79、CDK4、CEACAM3、CEACAM5、CLEC12A、EGFR、EGFR变体III、ERBB2(HER2)、ERBB3、ERBB4、EPCAM、EPHA2、EPHA3、FCRL5、FLT3、FOLR1、GAGE蛋白、GD2、GD3、GPNMB、GM3、GPR112、IL3RA、KIT、KRAS、LGR5、源自EBV的LMP2、L1CAM、MAGE蛋白、MLANA、MSLN、MUC1、MUC2、MUC3、MUC4、MUC5、MUC16、MUM1、ANKRD30A、NY-ES01(CTAG1B)、OX40、PAP、PAX3、PAX5、PLAC1、PRLR、PMEL、PRAME、PSMA(FOLH1)、RAGE蛋白、RET、RGS5、ROR1、SART1、SART3、SLAMF7、SLC39A6(LIV1)、STEAP1、STEAP2、TERT、TMPRSS2、Thompson-nouvelle抗原、TNFRSF17、TYR、UPK3A、VTCN1、WT1。

[0022] 在筛选候选药物的方法的一些实施例中,小鼠是具有免疫能力的小鼠。在本文所述方法的一些实施例中,目标抗原是人目标抗原。

[0023] 在所述方法的一些实施例中,候选药物是抗体。在一些实施例中,候选药物是抗原结合蛋白。在一些实施例中,候选药物是双特异性抗体或双特异性抗原结合蛋白。在一些实施例中,双特异性抗原结合蛋白能够同时结合人CD3蛋白和目标抗原。在一个实施例中,候选药物能够识别猴CD3蛋白。

[0024] 在筛选候选药物的方法的一些实施例中,与不靶向目标抗原的试剂相比,候选药物能够减少、消除或防止肿瘤生长。在此类方法的一些实施例中,确定候选药物是否可有效防止、减少或消除以存在或表达目标抗原为特征的细胞这一步骤包括肿瘤体积测定或T细胞介导的肿瘤细胞杀伤测定。

[0025] 在其他实施例中,与不靶向目标抗原的试剂相比,候选药物能够减少、消除或防止细菌或病毒感染。在一些此类实施例中,确定候选药物是否可有效防止、减少或消除以存在

或表达目标抗原为特征的细胞这一步骤包括测量病毒或细菌滴度。

[0026] 在其他实施例中,本文提供了一种非人类动物模型,例如用于测试联合药物治疗的安全性、功效和药代动力学的小鼠模型,其中所述联合治疗包括结合人CD3分子的药物,例如抗原结合蛋白。此类联合治疗的目的在于靶向特定肿瘤、感染或本文所述的其他疾病,该靶向过程可从T细胞的募集和/或活化中受益。

## 附图说明

[0027] 图1示出了T细胞受体复合物的结构。所述复合物包含两个CD3 $\epsilon$ 亚基、一个CD3 $\delta$ 亚基、一个CD3 $\gamma$ 亚基和两个CD3 $\zeta$ 亚基,这些亚基在T细胞表面与TCR $\alpha\beta$ 异源二聚体形成复合物。星号表示ITAM基序的位置。

[0028] 图2A和图2B是人源化CD3 $\gamma\delta\epsilon$ 大靶向载体的示意图(未按比例绘制)。图2A示出了选择表达盒(Neo)缺失前的大靶向载体,其中示出了人CD3E、CD3D和CD3G序列的敲入位置。A、B、C、D、E、F和G表示表1中所示的接合区核酸序列的位置。图2B示出了选择表达盒(Neo)缺失后的大靶向载体,与图2A类似,示出了人CD3E、CD3D和CD3G的位置。A、B、C、D、E、F和G是表1和表3中所示的接合区核酸序列的位置。

[0029] 图3示出了人源化CD3 $\gamma\delta\epsilon$ 小鼠中人源化CD3蛋白的氨基酸序列。人源CD3蛋白序列带下划线。

[0030] 图4示出了小鼠和人CD3e、CD3d和CD3g序列的比对结果。引入小鼠CD3基因座的人序列的5'和3'末端分别用\*和\*\*表示。

[0031] 图5A顶行是展示野生型(WT)、杂合人源化CD3 $\gamma\delta\epsilon$ (HET)或纯合人源化CD3 $\gamma\delta\epsilon$ (HO)小鼠中CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>胸腺细胞的正态分布的FAC分析图。图5B顶行是示出所示动物的外周血中B细胞和T细胞的百分比和数量的数据图。图5B底行是示出所示动物的脾脏中T细胞和B细胞的百分比的数据图。图5C示出了从人源化CD3 $\gamma\delta\epsilon$ 小鼠脾脏中获得的CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>T细胞的VB组库多克隆性。

[0032] 图6A至图6B展示了用LCMV克隆13感染(图6A)或者在先用LCMV Armstrong克隆感染之后用LCMV克隆13感染(图6B)的野生型对照或人源化CD3 $\gamma\delta\epsilon$ 小鼠的脾脏中的病毒LCMV滴度。

[0033] 图7是来自野生型(WT)、杂合人源化CD3 $\gamma\delta\epsilon$ (hCD3 $\gamma\delta\epsilon$ Het)或纯合人源化CD3 $\gamma\delta\epsilon$ (hCD3 $\gamma\delta\epsilon$ Ho)小鼠的脾细胞用两个同样与猴CD3交叉反应的抗人CD3抗体(ah/mfCD3-2和ah/mfCD3-1)、两个为人CD3特异性的抗人CD3抗体(ahCD3-1和ahCD3-2)、对照抗小鼠CD3抗体(amCD3-2C11)、无关的对照人IgG(对照hIgG)以及仅二抗对照(仅二抗)进行分选的FACS分析数据。在每张图下方的表中列出了MFI值。

[0034] 图8展示了人源化CD3 $\gamma\delta\epsilon$ 小鼠中对抗CD3抗体的应答。图8A展示了用抗CD3抗体处理的小鼠血液中的瞬时T细胞和B细胞耗尽,其中包括所示的每种抗体在第1天的T细胞耗尽(左图),以及所测试的每种抗体在14天中的T细胞和B细胞的耗尽和恢复(中图和右图)。图8B示出了用所示抗体处理2小时之后释放的细胞因子(IFN $\gamma$ 、KC、TNF $\alpha$ 、IL-6和IL-10)的浓度增加。

[0035] 图9展示了在野生型(WT)和人源化CD3 $\gamma\delta\epsilon$ 纯合(hCD3 $\gamma\delta\epsilon$ Ho)小鼠中用增加量的所示抗体处理之后脾细胞的增殖(仅以细胞的活化倍数测量)。

[0036] 图10是概述人源化CD3小鼠模型的各种性质的表格。

[0037] 图11A展示了在植入肿瘤的同时开始处理的情况下抗CD3抗体 (Ab-1; 识别CD3和CD20的双特异性抗体, 在两个不同浓度下测试) 对B16F10.9/CD20肿瘤的肿瘤体积的影响 (预防模型)。图11B展示了抗CD3抗体 (Ab-1; 识别CD3和CD20的双特异性抗体, 在两个不同浓度下测试) 对已确定的B16F10.9/CD20肿瘤的肿瘤体积的影响 (治疗模型)。

## 具体实施方式

### [0038] 定义

[0039] 本发明提供了经遗传修饰的非人类动物 (例如啮齿动物, 例如小鼠或大鼠), 该动物表达人源化CD3蛋白, 例如人源化CD3 $\epsilon$ 、CD3 $\delta$ 、CD3 $\gamma$  和/或CD3 $\zeta$ 蛋白。本发明还涉及经遗传修饰的非人类动物, 该动物基因组中 (例如, 生殖细胞系中) 包含编码人源化CD3蛋白 (例如, 嵌合人/小鼠CD3蛋白) 的经遗传修饰的CD3基因座。本发明还提供了包含上述CD3基因座的胚胎、细胞和组织, 制备上述CD3基因座的方法, 以及使用上述CD3基因座的方法。除非另有定义, 否则本文所用的所有术语和短语包括该术语或短语在本领域中所具有的含义, 除非在使用该术语或短语的情形中有明确说明或显而易见的相反含义。

[0040] 如本文所用, “CD3” 包括在T细胞上作为多分子T细胞受体 (TCR) 复合物的一部分表达的抗原; 该多分子TCR复合物由包括一个或多个以下受体链的同源二聚体和/或异源二聚体结合形成: CD3-epsilon ( $\epsilon$ )、CD3-delta ( $\delta$ )、CD3-zeta ( $\zeta$ ) 和CD3-gamma ( $\gamma$ ) (参见图1)。人和小鼠的CD3-delta、CD3-zeta和CD3-gamma的序列和GenBank登记号在下表4中列出。在本申请全篇中,  $\epsilon$ 或epsilon也可写作E,  $\delta$ 或delta也可写作D,  $\zeta$ 或zeta也可写作Z,  $\gamma$ 或gamma也可写作G。

[0041] 如本文所用, “结合CD3的抗体” 或“抗CD3抗体” 包括特异性识别单个CD3亚基 (例如, epsilon、delta、gamma或zeta) 的抗体及其抗原结合片段, 以及特异性识别两个CD3亚基的二聚体复合物 (例如, gamma/epsilon、delta/epsilon和zeta/zeta CD3二聚体) 的抗体及其抗原结合片段。本发明的抗体和抗原结合片段可结合可溶性CD3和/或细胞表面表达的CD3。可溶性CD3包括天然CD3蛋白以及重组CD3蛋白变体, 例如缺少跨膜结构域或者以其他方式与细胞膜无关的单体或二聚体CD3构建体。

[0042] 当用于描述保守氨基酸取代时, 术语“保守” 包括用侧链R基团的化学性质 (例如电荷或疏水性) 相似的另一个氨基酸残基取代某个氨基酸残基。保守氨基酸取代可通过修饰核苷酸序列以引入将编码保守取代的核苷酸变化来实现。通常, 保守氨基酸取代不会实质性改变蛋白质的目标功能性质, 例如CD3蛋白参与T细胞受体组装和信号转导的能力。侧链的化学性质相似的氨基酸基团的例子包括脂肪族侧链, 诸如甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸; 脂肪族-羟基侧链, 诸如丝氨酸和苏氨酸; 含酰胺侧链, 诸如天冬酰胺和谷氨酰胺; 芳香族侧链, 诸如苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸; 碱性侧链, 诸如赖氨酸、精氨酸和组氨酸; 酸性侧链, 诸如天冬氨酸和谷氨酸; 以及含硫侧链, 诸如半胱氨酸和甲硫氨酸。保守氨基酸取代基团包括, 例如缬氨酸/亮氨酸/异亮氨酸、苯丙氨酸/酪氨酸、赖氨酸/精氨酸、丙氨酸/缬氨酸、谷氨酸/天冬氨酸和天冬酰胺/谷氨酰胺。在一些实施例中, 保守氨基酸取代可以用丙氨酸取代蛋白质中的任何天然残基, 例如在丙氨酸扫描诱变中所用。在一些实施例中, 保守取代在“Gonnet et al. ((1992) Exhaustive Matching of the Entire Protein

Sequence Database, Science 256:1443-45)” (Gonnet等人, 1992年, “整个蛋白质序列数据库的详尽匹配”, 《科学》, 第256卷, 第1443-1445页) 中公开的PAM250对数似然矩阵中具有正值, 该文献据此以引用方式并入本文。在一些实施例中, 取代是适度的保守取代, 其中所述取代在PAM250对数似然矩阵中具有非负值。

[0043] 因此, 本发明包含经遗传修饰的非人类动物(例如啮齿动物, 例如小鼠或大鼠), 该动物表达在本文所述的氨基酸序列中包含保守氨基酸取代的人源化CD3蛋白。

[0044] 本领域的技术人员应当理解, 除了编码本文所述的人源化CD3蛋白的核酸残基之外, 由于遗传密码具有简并性, 其他核酸也可编码本发明的多肽。因此, 除了基因组中包含编码本文所述的人源化CD3蛋白的核苷酸序列的经遗传修饰的非人类动物之外, 本文还提供了基因组中包含不同于本文所述的核苷酸序列的核苷酸序列的非人类动物, 因为遗传密码具有简并性。

[0045] 当结合序列使用时, 术语“同一性”包括由本领域已知的可用于测量核苷酸和/或氨基酸序列同一性的多种不同算法所确定的同一性。在本文所述的一些实施例中, 同一性使用ClustalW v.1.83(慢) 比对法进行确定, 该比对法采用10.0的开放空位罚分、0.1的扩展空位罚分, 并使用Gonnet相似矩阵(MacVector公司的MacVector™10.0.2, 2008年(MacVector™10.0.2, MacVector Inc., 2008))。针对序列同一性进行比较的序列长度取决于具体序列。在各种实施例中, 同一性是通过将成熟蛋白从N端到C端的序列进行比较来确定的。在各种实施例中, 将人源化序列与人类序列进行比较时, 使用人源化序列的人类部分(而不是非人类部分)进行比较, 以便确定人类序列与人源化序列之间的同一性水平。

[0046] 术语“有效连接”包括并置, 其中这样描述的组分处于允许以其预期方式发挥作用的关系。因此, 编码蛋白的核酸序列可有效连接至调控序列(例如, 启动子、增强子、沉默子序列等)以保持适当的转录调控。此外, 本发明的人源化蛋白的各个部分可有效连接以保持该蛋白在细胞中适当的折叠、加工、靶向、表达和其他功能性质。除非另有说明, 否则本发明的人源化蛋白的各个结构域彼此有效连接。CD3蛋白的人类细胞外结构域与非人类跨膜结构域和胞质结构域的有效连接可通过由核酸编码序列表达这些组分作为连续融合蛋白来实现。

[0047] 有关基因置换的术语“置换”包括将外源性遗传物质放置在内源性遗传基因座处, 从而用直系同源或同源核酸序列置换内源性基因的全部或部分。在一种情况下, 内源性非人类基因或其片段用相应人类基因或其片段置换。例如, 编码小鼠或其他非人类CD3蛋白的细胞外结构域的DNA可用编码相应人类蛋白的细胞外结构域的DNA置换。相应人类基因或其片段是这样的人类基因或片段: 其是被置换的内源性非人类基因或其片段的直系同源物、同源物, 或在结构和/或功能上与被置换的内源性非人类基因或其片段基本相同或一样。如下文的实例所示, 编码内源性非人类CD3细胞外结构域的核苷酸序列被对应于人CD3细胞外结构域的核苷酸序列置换。

[0048] 如本文所用, 例如有关功能蛋白的“功能”包括保持正常情况下与天然蛋白相关的至少一种生物学活性的蛋白。例如, 在本发明的一些实施例中, 内源性基因座处的置换(例如, 内源性非人类CD3基因座处的置换)导致基因座不能表达功能内源性蛋白。

[0049] 如CD3基因座中的术语“基因座”包括包含CD3编码区的基因组DNA。不同的CD3基因CD3 $\epsilon$ 、CD3 $\delta$ 、CD3 $\gamma$ 在同一染色体上彼此靠近定位。因此, 根据情形, 提及内源性CD3基因座可

能是指包括这些编码区中的一些或全部或者单个编码区的基因座。例如,如果只将一个人CD3(诸如CD3 $\epsilon$ )引入非人类动物,则编码该CD3的核酸优选地修饰相应非人类CD3的基因座。如果将多个人CD3(诸如CD3 $\epsilon$ 、CD3 $\delta$ 、CD3 $\gamma$ )引入非人类动物,则被修饰的内源性基因座包括CD3 $\epsilon$ 、CD3 $\delta$ 、CD3 $\gamma$ 中每一者的编码区。CD3基因座也可能是指CD3 $\zeta$ 的基因座,其占据不同于CD3 $\epsilon$ 、CD3 $\delta$ 和CD3 $\gamma$ 的染色体。如果将人CD3 $\zeta$ 与人CD3 $\epsilon$ 、CD3 $\delta$ 和CD3 $\gamma$ 中的任一者一起引入,则可修饰不同染色体上的两个或更多个CD3基因座。所述CD3基因座中可包含其他序列,将这些序列引入用于遗传操作(例如选择表达盒、限制性位点等)目的。

[0050] 有关免疫球蛋白核酸序列的术语“生殖细胞系”包括可传递给子代的核酸序列。

[0051] 短语“免疫球蛋白分子”包括两条免疫球蛋白重链和两条免疫球蛋白轻链。重链可以相同或不同,轻链可以相同或不同。

[0052] 如本文所用,术语“抗体”包括包含四条多肽链的免疫球蛋白分子,其中两条重(H)链和两条轻(L)链通过二硫键相互连接。每条重链包含重链可变结构域和重链恒定结构域(C<sub>H</sub>)。重链恒定结构域包含三个结构域:C<sub>H</sub>1、C<sub>H</sub>2和C<sub>H</sub>3。每条轻链包含轻链可变结构域和轻链恒定结构域(C<sub>L</sub>)。重链和轻链可变结构域可进一步细分为超可变区,称为互补性决定区(CDR),该超可变区散布在更保守的区域(称为骨架区(FR))内。每个重链和轻链可变结构域包括三个CDR和四个FR,它们按下列顺序从氨基末端排列至羧基末端:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4(重链CDR可简写为HCDR1、HCDR2和HCDR3;轻链CDR可简写为LCDR1、LCDR2和LCDR3)。

[0053] 术语“高亲和性”抗体是指对靶表位的K<sub>D</sub>为约10<sup>-9</sup>M或更低(例如,约1×10<sup>-9</sup>M、1×10<sup>-10</sup>M、1×10<sup>-11</sup>M或约1×10<sup>-12</sup>M)的抗体。

[0054] 短语“双特异性抗体”包括能够选择性结合两个表位的抗体。双特异性抗体通常包括两个臂,每个臂结合不同表位(例如具有不同特异性的两条重链),所述不同表位在两个不同分子上(例如,不同表位在两个不同免疫原上)或同一分子上(例如,不同表位在同一免疫原上)。如果双特异性抗体能够选择性结合两个不同表位(第一表位和第二表位),则第一抗体臂对第一表位的亲和性通常比第一抗体臂对第二表位的亲和性低至少一个至两个或三个或四个或更多个数量级,反之亦然。被双特异性抗体特异性结合的表位可在相同或不同的靶标上(例如,在相同或不同的蛋白上)。示例性双特异性抗体包括第一抗体臂对肿瘤抗原具有特异性并且第二抗体臂对细胞毒性标志物(例如,Fc受体(例如Fc $\gamma$ RI、Fc $\gamma$ RII、Fc $\gamma$ RIII等)或T细胞标志物(例如CD3、CD28等))具有特异性的双特异性抗体。在本发明的一个实施例中,双特异性抗体的一个臂对CD3具有特异性。此外,第一臂对肿瘤抗原具有特异性并且第二臂对毒素具有特异性的双特异性抗体可被配对,以将毒素(例如皂草素、长春花生物碱等)递送到肿瘤细胞。其他示例性双特异性抗体包括第一抗体臂对激活性受体(例如B细胞受体、Fc $\gamma$ RI、Fc $\gamma$ RIIA、Fc $\gamma$ RIIIA、Fc $\gamma$ RI、T细胞受体等)具有特异性并且第二抗体臂对抑制性受体(例如Fc $\gamma$ RIIB、CD5、CD22、CD72、CD300a等)具有特异性的双特异性抗体。此类双特异性抗体可被构建用于与细胞活化相关的治疗条件(例如过敏和哮喘)中。双特异性抗体可例如通过将识别同一免疫原不同表位的重链进行组合来制备。例如,可将编码识别同一免疫原不同表位的重链可变序列的核酸序列融合到编码相同或不同重链恒定区的核酸序列中,这种序列可在表达免疫球蛋白轻链的细胞中表达。典型的双特异性抗体具有两条重链,每条重链具有三个重链CDR,然后是从N端至C端)C<sub>H</sub>1结构域、铰链、C<sub>H</sub>2

结构域和 $C_{H3}$ 结构域,以及免疫球蛋白轻链,所述轻链不具有表位结合特异性但能与每条重链结合,或者可与每条重链结合并且可结合一个或多个被重链表位结合区结合的表位,或者可与每条重链结合并且能够使得一条或两条重链结合到一个或两个表位。类似地,短语“多特异性抗体”包括能够选择性结合多个表位(例如两个、三个、四个表位)的抗体。

[0055] 短语“互补性决定区”或术语“CDR”包括由生物体的免疫球蛋白基因的核酸序列编码的氨基酸序列,所述核酸序列通常(即在野生型动物中)出现在免疫球蛋白分子的轻链或重链可变区中的两个骨架区之间。CDR可由例如生殖细胞系序列或重排或未重排序列编码且例如由未成熟或成熟的B细胞编码。CDR可以是体细胞突变的(例如,不同于动物的生殖细胞系中编码的序列)、人源化的和/或通过氨基酸取代、增添或缺失进行修饰的。在一些情况下(例如对于CDR3而言),例如由于剪接或连接序列(例如,重组V-D-J以形成重链CDR3),CDR可由两个或更多个(例如在未重排的核酸序列中)不连续的序列(例如生殖细胞系序列),但在B细胞核酸序列中连续的序列编码。

[0056] 短语“功能片段”包含抗原结合蛋白(诸如抗体)的片段,其可被表达、分泌并以微摩尔、纳摩尔或皮摩尔级的 $K_D$ 特异性地结合至表位。特异性识别包括具有至少在微摩尔级、纳摩尔级或皮摩尔级的 $K_D$ 。

[0057] 短语“重链”或“免疫球蛋白重链”包括来自任何生物体的免疫球蛋白重链序列,包括免疫球蛋白重链恒定区序列。除非另外指明,否则重链可变结构域包括三个重链CDR和四个骨架(FR)区。重链的片段包括CDR、CDR和FR,以及它们的组合。典型的重链具有在可变结构域之后(从N端到C端)的 $C_{H1}$ 结构域、铰链、 $C_{H2}$ 结构域和 $C_{H3}$ 结构域。重链的功能片段包括能够特异性识别表位(例如,以微摩尔级、纳摩尔级或皮摩尔级的 $K_D$ 识别表位)的片段,其能够表达并从细胞分泌,并且包含至少一个CDR。重链可变结构域由可变区基因序列编码,其一般包含 $V_H$ 、 $D_H$ 和 $J_H$ 区段,这些区段来源于存在于种系中的 $V_H$ 、 $D_H$ 和 $J_H$ 区段组库。多个物种中V、D和J重链区段的序列、位置和命名可在国际免疫遗传学信息系统(IMGT数据库)中查询。

[0058] 短语“轻链”包括来自任何生物体的免疫球蛋白轻链序列,并且除非另外指明,否则包括人kappa和lambda轻链及VpreB以及替代轻链。除非另外指明,否则轻链可变结构域通常包括三个轻链CDR和四个骨架区(FR)。一般来讲,全长轻链从氨基端到羧基端包括含有FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4的可变结构域,以及轻链恒定区。轻链可变结构域由轻链可变区基因序列编码,其一般包含 $V_L$ 和 $J_L$ 区段,这些区段来源于存在于种系中的V和J区段组库。多个物种中V和J轻链区段的序列、位置和命名可在国际免疫遗传学信息系统(IMGT数据库)中查询。轻链包括例如不选择性地结合任何表位的那些轻链,该表位由在其中呈现该表位的抗原结合蛋白(例如抗体)识别。轻链还包括结合并识别一个或多个表位或者帮助重链结合并识别一个或多个表位的那些轻链,所述一个或多个表位由在其中呈现这些表位的抗原结合蛋白(例如抗体)选择性结合。

[0059] 如本文所用的术语“抗原结合蛋白”包含抗体和多种能够结合目标抗原的天然产生及人工合成的分子。抗原结合蛋白包括例如结构域特异性抗体、单结构域抗体(例如源自骆驼和鱼等)、结构域缺失抗体、嵌合抗体、CDR移植抗体、双抗体、三抗体、四抗体、微抗体、纳抗体(例如单价纳抗体、二价纳抗体等)、小分子免疫药物(SMIP)、鲨鱼可变IgNAR结构域等。抗原结合蛋白也可包括抗原结合片段,诸如例如(i) Fab片段;(ii) F(ab')<sub>2</sub>片段;(iii) Fd片段;(iv) Fv片段;(v) 单链Fv(scFv)分子;(vi) dAb片段和(vii) 由模拟抗体超可变区的

氨基酸残基组成的最小识别单位(例如分离的互补性决定区(CDR)诸如CDR3肽)等。

[0060] 术语“细胞”包含适于表达重组核酸序列的任何细胞。细胞包括原核生物和真核生物(单细胞或多细胞)细胞、细菌细胞(例如大肠杆菌(*E. coli*)、芽孢杆菌属(*Bacillus* spp.)、链霉菌属(*Streptomyces* spp.)等品系)、分支杆菌细胞、真菌细胞、酵母细胞(例如酿酒酵母(*S. cerevisiae*)、裂殖酵母(*S. pombe*)、毕赤酵母(*P. pastoris*)、嗜甲醇毕赤酵母(*P. methanolica*)等)、植物细胞、昆虫细胞(例如SF-9、SF-21、杆状病毒感染的昆虫细胞、粉纹夜蛾等)、非人动物细胞、人细胞或细胞融合物,诸如杂交瘤细胞或细胞杂交瘤。在一些实施例中,该细胞为人、猴、大猩猩、仓鼠、大鼠或小鼠细胞。在一些实施例中,该细胞为真核的,并选自以下细胞:CHO(例如CHO K1、DXB-11 CHO、Veggie-CHO)、COS(例如COS-7)、视网膜细胞、Vero、CV1、肾(例如HEK293、293 EBNA、MSR 293、MDCK、HaK、BHK)、HeLa、HepG2、WI38、MRC 5、Colo205、HB 8065、HL-60(例如BHK21)、Jurkat、Daudi、A431(表皮)、CV-1、U937、3T3、L细胞、C127细胞、SP2/0、NS-0、MMT 060562、Sertoli细胞、BRL 3A细胞、HT1080细胞、骨髓瘤细胞、肿瘤细胞,以及源自上述细胞的细胞系。在一些实施例中,该细胞包含一个或多个病毒基因,例如,表达病毒基因的视网膜细胞(例如PER.C6<sup>TM</sup>细胞)。在一些实施例中,该细胞为ES细胞。

[0061] 在一个实施例中,人源化CD3蛋白表示其中细胞外结构域是人序列的CD3蛋白。跨膜和胞质结构域也可是人的,但优选地是非人内源性序列。包含来自不同物种,特别是人细胞外结构域以及非人跨膜和胞内结构域的CD3蛋白也可称为嵌合CD3蛋白。

#### [0062] 经遗传修饰的人源化CD3动物

[0063] 在多个实施例中,本发明提供经遗传修饰的非人动物(例如啮齿动物,例如小鼠或大鼠),在其基因组中(例如在其生殖细胞基因组中)包含编码人源化CD3蛋白(例如人源化CD3 $\epsilon$ 、CD3 $\gamma$ 、CD3 $\delta$ ,或其组合)的核酸序列。在一个实施例中,本发明提供经遗传修饰的非人动物(例如啮齿动物,例如小鼠或大鼠),在其基因组中(例如在其生殖细胞基因组中)包含编码人源化CD3 $\delta$ 、人源化CD3 $\gamma$ 和人源化CD3 $\epsilon$ 蛋白的核苷酸序列。因此,在本发明的一些实施例中,该小鼠在其T细胞表面上表达人源化CD3 $\gamma$  $\delta$  $\epsilon$ 复合物,使得该人源化CD3 $\gamma$  $\delta$  $\epsilon$ 与在同一T细胞上表达的T细胞受体形成复合物。

[0064] CD3分子通常是旨在调节T细胞免疫的试剂的靶点,并为此目的开发了多种抗CD3抗体(例如muromonab-CD3或OKT3)。如OKT3的抗CD3抗体用作免疫抑制剂(例如在移植排斥中),但也研究了其在自身免疫疾病(例如克罗恩氏病、I型糖尿病、溃疡性结肠炎等)中的治疗潜力。

[0065] 此外,CD3分子也正被研究作为双特异性试剂例如双特异性抗体的靶点,因为抗CD3双特异性抗体能够将T细胞招募至靶细胞,例如表达特定目标抗原的细胞。示例性抗CD3双特异性抗体在美国专利申请公开No.2014/0088295和美国专利申请公开No.2015/0266966中说明,二者都以引用方式并入本文。

[0066] 在临床前药物开发阶段,通常基于其效力、毒性以及其他药代动力学和药效学性质来研究候选试剂。候选试剂(诸如抗体)通常靶向人抗原,因为研究的最终目标是开发人的治疗方法。许多临床前研究在大型动物诸如灵长类中进行,因为其生理和药物代谢与人最相似。已知多种针对CD3开发的抗体(例如OKT3)不与非人CD3,特别是灵长类CD3交叉反应。为了进行关于候选药物的效力、毒性和其他参数的有效临床前研究,首先必须测定该候



选药物以识别灵长类CD3分子。

[0067] 但是,另一个使开发抗CD3治疗方法复杂化的因素是大型灵长类诸如黑猩猩是濒危物种,在许多国家禁止使用黑猩猩进行研究;而在其他灵长类,例如食蟹猕猴 (*Macaca fascicularis*) 中进行的研究可引起伦理问题。例如,由于上述原因,至今没有人肿瘤的有效灵长类模型。因此,任何可在较小的动物模型(诸如啮齿动物,例如小鼠)中获得的关于特定治疗候选物的初步数据可有助于决定在大型灵长类中进行临床前研究的进一步进展。

[0068] 在小型动物模型诸如小鼠中进行的临床前研究传统上使用药物替代物进行。例如,在研发靶向特定人抗原的临床候选物时,使用特异性靶向目标抗原的小鼠同源物的分子(例如抗原结合蛋白或抗体),在小鼠中产生一些临床前数据。关于效力、多种剂量方案、毒性和副作用以及给药的其他方面的信息从此类药物替代物研究中获得。但是,这些发现是有限的,因为被研究的不是实际开发的药物或其靶点。

[0069] 因此,进行初步临床前研究的最有用的小型动物模型是非人动物,例如啮齿动物,其表达人或人源化CD3蛋白,并且允许测试也与食蟹猕猴CD3交叉反应的抗CD3候选药物,以实现随后的灵长类临床前研究。本发明提供了此类复杂的动物模型。

[0070] 因此,本文提供了经遗传修饰的非人动物,其基因组中包含编码人CD3蛋白的细胞外结构域的核酸序列。在本发明的一些实施例中,CD3蛋白选自CD3 $\gamma$ 、CD3 $\delta$ 、CD3 $\epsilon$ 、CD3 $\zeta$ ,及其组合。在一些实施例中,CD3蛋白选自CD3 $\gamma$ 、CD3 $\delta$ 、CD3 $\epsilon$ ,及其组合。在一些实施例中,CD3蛋白包含CD3 $\gamma$ 、CD3 $\delta$ 和CD3 $\epsilon$ 多肽链。因此,在一些实施例中,经遗传修饰的非人动物的基因组中包含编码人CD3 $\gamma$ 的细胞外结构域、人CD3 $\delta$ 的细胞外结构域和人CD3 $\epsilon$ 的细胞外结构域的核酸序列。在一些此类实施例中,人CD3 $\gamma$ 、CD3 $\delta$ 和CD3 $\epsilon$ 的细胞外结构域可由单个核酸编码。在一些实施例中,人CD3 $\gamma$ 、CD3 $\delta$ 和CD3 $\epsilon$ 的细胞外结构域可由单独的核酸编码。

[0071] 在一些实施例中,本文所述非人动物保留了内源性非人CD3启动子和/或调节元件(例如内源性非人CD3 $\gamma$ 、CD3 $\delta$ 和/或CD3 $\epsilon$ 启动子和/或调节元件)。在其他实施例中,非人动物包含人CD3启动子和调节元件。

[0072] 尽管已经假定所产生的大部分抗CD3抗体识别CD3 $\epsilon$ 表位(参见Tunnacliffe et al. (1989) *International Immunology*, 1 (5):546-50) (Tunnacliffe等人,1989年,《国际免疫学》,第1卷,第5期,第546-550页)),但存在多种可识别其他CD3亚基(例如CD3 $\gamma$ 或CD3 $\delta$ )或需要CD3复合物组装的试剂。因此,基因组中包含编码人CD3 $\gamma$ 的细胞外结构域、人CD3 $\delta$ 的细胞外结构域和人CD3 $\epsilon$ 的细胞外结构域的核酸序列的经遗传修饰的非人动物提供了优势,因为其可适用于将结合任何CD3亚基或CD3复合物的试剂。

[0073] 图4的比对中提供了示例性CD3蛋白。小鼠CD3 $\epsilon$ 蛋白序列可通过GenBank登记号NP\_031674和SEQ ID NO:27查看,而人CD3 $\epsilon$ 蛋白序列可通过GenBank登记号NP\_000724和SEQ ID NO:28查看。小鼠CD3 $\delta$ 蛋白序列可通过GenBank登记号NP\_038515和SEQ ID NO:29查看,而人CD3 $\delta$ 蛋白序列可通过GenBank登记号NP\_000723和SEQ ID NO:30查看。小鼠CD3 $\gamma$ 蛋白序列可通过GenBank登记号NP\_033980和SEQ ID NO:31查看,而人CD3 $\gamma$ 蛋白序列可通过GenBank登记号NP\_000064和SEQ ID NO:32查看。

[0074] 在本发明的一些实施例中,编码人CD3的细胞外结构域,例如人CD3 $\gamma$ 、人CD3 $\delta$ 和人CD3 $\epsilon$ 的细胞外结构域的核酸序列位于内源性非人CD3基因座处。换句话说,此类核酸修饰了内源性CD3基因座以编码人CD3多肽。在本发明的一些实施例中,因为内源性基因座的遗传

修饰,非人动物不包含相应非人CD3蛋白的功能性细胞外结构域,使得功能性细胞外结构域不被表达。在本发明的一些实施例中,编码人CD3的细胞外结构域的核酸序列取代相应编码内源性非人CD3的核酸序列。因此,在一些实施例中,编码人CD3 $\gamma$ 的细胞外结构域的核酸序列取代编码内源性非人CD3 $\gamma$ 的细胞外结构域的核酸序列,编码人CD3 $\delta$ 的细胞外结构域的核酸序列取代编码内源性非人CD3 $\delta$ 的细胞外结构域的核酸序列,编码人CD3 $\epsilon$ 的细胞外结构域的核酸序列取代编码内源性非人CD3 $\epsilon$ 的细胞外结构域的核酸序列。在一些实施例中,取代不包括取代编码内源性信号序列的核酸序列。在另一个实施例中,取代包括用编码人信号序列的核酸序列来取代编码内源性信号序列的核酸序列。

[0075] 在本发明的一些方面,细胞外结构域包括不是跨膜或细胞内结构域的蛋白区域,例如,出现于细胞表面,并且当组装成复合物时与TCR信号转导复合物的其他组分的细胞外结构域(例如TCR $\alpha$ 和 $\beta$ 细胞外结构域)部分地相互作用的蛋白区域。在本文所述的多种实施例中,细胞外结构域指在细胞表面表达的蛋白的结构域,并且除非另有说明,否则不包括信号序列,该信号序列在细胞表面表达前通常以蛋白水解的方式裂解。在本发明的一些实施例中,CD3 $\epsilon$ 的细胞外结构域包含SEQ ID NO:24中示出氨基酸序列的氨基酸17-130(单独示出为SEQ ID NO:33)。在一些此类实施例中,动物包含编码内源性CD3 $\epsilon$ 信号序列(例如SEQ ID NO:24的氨基酸1-16处的信号序列)的核酸序列。在本发明的其他实施例中,动物包含编码人CD3 $\epsilon$ 信号序列的核酸序列。在本发明的一些实施例中,CD3 $\delta$ 的细胞外结构域包含SEQ ID NO:25中示出氨基酸序列的氨基酸19-105(单独示出为SEQ ID NO:34)。在一些实施例中,动物包含编码内源性CD3 $\delta$ 信号序列(例如SEQ ID NO:25的氨基酸1-18处的信号序列)的核酸序列。在本发明的其他实施例中,动物包含编码人CD3 $\delta$ 信号序列的核酸序列。在一些实施例中,CD3 $\gamma$ 的细胞外结构域包含SEQ ID NO:26中示出氨基酸序列的氨基酸20-116(单独示出为SEQ ID NO:35)。在一些实施例中,动物包含编码内源性CD3 $\gamma$ 信号序列(例如SEQ ID NO:26的氨基酸1-19处的信号序列)的核酸序列。在本发明的其他实施例中,动物包含编码人CD3 $\gamma$ 信号序列的核酸序列。

[0076] 在本发明的一些方面,非人动物包含编码内源性CD3蛋白,例如相应内源性CD3蛋白的跨膜和胞质结构域的核酸序列。因此,在一个实施例中,非人动物包含编码人CD3蛋白的细胞外结构域的核酸序列,该核酸序列与编码相应内源性非人CD3蛋白的跨膜和胞质结构域的核酸序列有效连接,使得包含人CD3蛋白的细胞外结构域以及相应内源性非人CD3蛋白的跨膜和胞质结构域的嵌合蛋白被表达。因此,在一个方面,动物在内源性CD3基因座处包含编码人CD3蛋白的细胞外结构域的核酸序列,该核酸序列与编码内源性非人CD3的跨膜和胞质结构域的核酸序列有效连接。在一个实施例中,动物在内源性CD3 $\epsilon$ 基因座处包含编码人CD3 $\epsilon$ 的细胞外结构域的核酸序列,该核酸序列与编码内源性非人动物CD3 $\epsilon$ 的跨膜和胞质结构域的核酸序列有效连接;在内源性CD3 $\delta$ 基因座处包含编码人CD3 $\delta$ 的细胞外结构域的核酸序列,该核酸序列与编码内源性非人动物CD3 $\delta$ 的跨膜和胞质结构域的核酸序列有效连接;在内源性CD3 $\gamma$ 基因座处包含编码人CD3 $\gamma$ 的细胞外结构域的核酸序列,该核酸序列与编码内源性非人动物CD3 $\gamma$ 的跨膜和胞质结构域的核酸序列有效连接。与完全人CD3蛋白相比,使用具有人细胞外结构域以及内源性跨膜和胞质结构域的嵌合CD3蛋白允许与具有对人CD3特异性的药物相互作用,但也可允许再现与内源性T细胞受体及其信号转导组分的相互作用。

[0077] 在本发明的一些方面,非人动物表达人CD3蛋白的细胞外结构域。在一些方面,非人动物表达SEQ ID NO:33中所示出的人CD3 $\epsilon$ 的细胞外结构域。在一些方面,非人动物表达SEQ ID NO:34中所示出的人CD3 $\delta$ 的细胞外结构域。在一些方面,非人动物表达SEQ ID NO:35中所示出的人CD3 $\gamma$ 的细胞外结构域。

[0078] 在本发明的一些实施例中,非人动物为哺乳动物。在一个方面,非人动物为例如跳鼠总科(Dipodoidea)或鼠总科(Muroidea)的小型哺乳动物。在一个实施例中,经遗传修饰的动物是啮齿动物。在一个实施例中,啮齿动物选自小鼠、大鼠和仓鼠。在一个实施例中,啮齿动物选自鼠总科。在一个实施例中,经遗传修饰的动物来自选自以下项的科:丽仓鼠科(Calomyscidae)(例如,丽仓鼠)、仓鼠科(Cricetidae)(例如,仓鼠、新世界鼠、田鼠、野鼠)、鼠科(Muridae)(例如,真小鼠和大鼠(true mice and rats)、沙鼠、非洲刺毛鼠、冠鼠)、马岛鼠科(Nesomyidae)(例如,攀鼠、岩鼠、白尾鼠、马岛鼠(Malagasy rats and mice))、刺睡鼠科(Platacanthomyidae)(例如,刺睡鼠)以及鼯形鼠科(Spalacidae)(例如,鼯形鼠、竹鼠和鼯鼠)。在一个具体实施例中,经遗传修饰的啮齿动物选自真小鼠或大鼠(鼠科)、沙鼠、非洲刺毛鼠和冠鼠。在一个实施例中,经遗传修饰的小鼠来自鼠科的成员。在一个实施例中,动物为啮齿动物。在一个具体实施例中,啮齿动物选自小鼠和大鼠。在一个实施例中,非人动物为小鼠。

[0079] 在一个实施例中,非人动物是啮齿动物,为C57BL品系小鼠,其选自C57BL/A、C57BL/An、C57BL/GrFa、C57BL/KaLwN、C57BL/6、C57BL/6J、C57BL/6ByJ、C57BL/6NJ、C57BL/10、C57BL/10ScSn、C57BL/10Cr和C57BL/01a。在另一个实施例中,小鼠是129品系小鼠,选自129P1、129P2、129P3、129X1、129S1(例如129S1/SV、129S1/SvIm)、129S2、129S4、129S5、129S9/SvEvH、129S6(129/SvEvTac)、129S7、129S8、129T1、129T2(参见例如Festing et al.(1999) Revised nomenclature for strain 129mice, Mammalian Genome 10:836(Festing等人,1999年,对129品系小鼠的重新命名,《哺乳动物基因组》,第10卷,第836页),亦可参见Auerbach et al(2000) Establishment and Chimera Analysis of 129/SvEv-and C57BL/6-Derived Mouse Embryonic Stem Cell Lines(Auerbach等人,2000年,源于129/SvEv和C57BL/6的小鼠胚胎干细胞系的建立和嵌合分析))品系。在一个具体实施例中,经遗传修饰的小鼠为上述129品系与上述C57BL/6品系的混合型。在另一个具体实施例中,小鼠为上述129品系的混合型,或上述BL/6品系的混合型。在一个具体实施例中,混合型的129品系为129S6(129/SvEvTac)品系。在另一个实施例中,小鼠为BALB品系,例如BALB/c品系。在又一个实施例中,小鼠为BALB品系和另一种上述品系的混合型。

[0080] 在一个实施例中,非人动物为大鼠。在一个实施例中,大鼠选自Wistar大鼠、LEA品系、Sprague Dawley品系、Fischer品系、F344、F6和Dark Agouti。在一个实施例中,大鼠品系为选自Wistar、LEA、Sprague Dawley、Fischer、F344、F6和Dark Agouti中的两种或更多种品系的混合型。

[0081] 因此,在一个实施例中,经遗传修饰的非人动物为啮齿动物。在一个实施例中,经遗传修饰的非人动物为小鼠或大鼠。在一个实施例中,动物为小鼠。因此,在一个实施例中,经遗传修饰的动物是小鼠,该小鼠在内源性小鼠CD3基因座处包含编码人CD3蛋白的细胞外结构域的核苷酸序列。在一个实施例中,小鼠包含编码人CD3 $\epsilon$ 的细胞外结构域的核酸序列、编码人CD3 $\delta$ 的细胞外结构域的核酸序列和编码人CD3 $\gamma$ 的细胞外结构域的核酸序列。在本

发明的一些实施例中,人CD3 $\epsilon$ 的细胞外结构域包含在SEQ ID NO:33中示出的序列,人CD3 $\delta$ 的细胞外结构域包含在SEQ ID NO:34中示出的序列,人CD3 $\gamma$ 的细胞外结构域包含在SEQ ID NO:35中示出的序列。在一些实施例中,小鼠包含编码内源性小鼠CD3信号序列的序列。在其他实施例中,小鼠包含编码人CD3信号序列的序列。

[0082] 在本发明的一些实施例中,本发明的小鼠表达人源化CD3蛋白。在一个实施例中,小鼠表达人源化CD3 $\epsilon$ 、人源化CD3 $\delta$ 和人源化CD3 $\gamma$ 蛋白。在本发明的一些实施例中,小鼠表达人CD3 $\epsilon$ 细胞外结构域和内源性小鼠CD3 $\epsilon$ 跨膜和胞质结构域、人CD3 $\delta$ 细胞外结构域和内源性小鼠CD3 $\delta$ 跨膜和胞质结构域,以及人CD3 $\gamma$ 细胞外结构域和内源性小鼠CD3 $\gamma$ 跨膜和胞质结构域。在一些此类实施例中,小鼠表达人源化CD3蛋白,其中所述人源化CD3蛋白是在SEQ ID NO:24中示出的人源化CD3 $\epsilon$ 、在SEQ ID NO:25中示出的人源化CD3 $\delta$ ,以及在SEQ ID NO:26中示出的人源化CD3 $\gamma$ 。

[0083] 在本发明的一些方面,经基因工程化的小鼠是具有免疫能力的小鼠。在本发明的一些实施例中,引入人源化CD3蛋白不影响小鼠的免疫系统功能。在本发明的一些实施例中,小鼠包含正常的T细胞和B细胞比率。在本发明的一些实施例中,小鼠能对小鼠感染产生正常应答。在一些方面,与野生型小鼠(例如未经遗传修饰以表达人源化CD3蛋白的小鼠)相比,该小鼠在胸腺中呈现相似的CD4 $^+$ 与CD8 $^+$ 细胞比。在本发明的一些实施例中,小鼠胸腺中CD4 $^+$ 与CD8 $^+$ 细胞比在未经遗传修饰以表达人源化CD3蛋白的小鼠的CD4 $^+$ 与CD8 $^+$ 细胞比的30%以内,例如20%以内,例如15%以内,例如12%以内,例如10%以内,例如5%以内,例如2%以内。在一些方面,与未经遗传修饰以表达人源化CD3蛋白的小鼠相比,该小鼠在脾、淋巴结和外周血中呈现相似的T细胞和B细胞百分比。在一些方面,与未经遗传修饰以表达人源化CD3蛋白的小鼠相比,该小鼠呈现相似的循环白细胞、淋巴细胞、单核细胞、嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞数量。

[0084] 本文还提供了制备本文所述经遗传修饰的非人动物的方法。在一些实施例中,制备经遗传修饰的非人动物(其中该动物表达人源化CD3蛋白)的方法包括在内源性非人动物CD3基因座处引入编码人CD3蛋白的细胞外结构域的核酸序列,其中该人CD3蛋白选自CD3 $\epsilon$ 、CD3 $\delta$ 、CD3 $\gamma$ 、CD3 $\zeta$ ,及其组合。如果引入多个人CD3蛋白,其可在单个核酸上共同引入(如本实施例中)或单独引入。如果是后者,单个细胞系(例如ES细胞系)可进行连续修饰直至修饰为包含编码各个所需的人CD3的核酸。在一个实施例中,动物不包含相应非人CD3蛋白的功能性细胞外结构域。在一个方面,动物在内源性非人CD3基因座包含编码人CD3 $\epsilon$ 的细胞外结构域和人CD3 $\delta$ 的细胞外结构域和人CD3 $\gamma$ 的细胞外结构域的核酸序列。在一些实施例中,人CD3 $\epsilon$ 的细胞外结构域在SEQ ID NO:33中示出,人CD3 $\delta$ 的细胞外结构域在SEQ ID NO:34中示出,人CD3 $\gamma$ 的细胞外结构域在SEQ ID NO:35中示出。在一个实施例中,动物不包含相应非人CD3蛋白的功能性细胞外结构域。

[0085] 在一些实施例中,制备本发明的经遗传修饰的非人动物的方法包括在内源性CD3基因座处用编码相应人CD3蛋白的细胞外结构域的核苷酸序列替换编码非人CD3蛋白的细胞外结构域的核苷酸序列。在一个实施例中,动物保留非人CD3蛋白的跨膜和胞质结构域。在一些实施例中,该替换得到包含人CD3蛋白的细胞外结构域以及相应内源性非人CD3蛋白的跨膜和胞质结构域的嵌合蛋白。

[0086] 通常将编码人CD3蛋白的核酸序列引入细胞,并由该细胞繁殖非人动物。如实例中

所述,在一些实施例中,替换方法利用通过VELOCIGENE<sup>®</sup>技术制备的靶标构建物,将该构建物引入ES细胞,并用VELOCIMOUSE<sup>®</sup>技术将靶标的ES细胞引入小鼠胚胎。

[0087] 在一个实施例中,其中该方法包括用编码人CD3 $\epsilon$ 蛋白的细胞外结构域的核苷酸序列替换编码内源性非人CD3 $\epsilon$ 的细胞外结构域的核苷酸序列,该方法包括用人CD3 $\epsilon$ 基因的编码外显子2至5的部分序列替换内源性小鼠CD3 $\epsilon$ 基因的编码外显子2至4的部分序列。在一个实施例中,其中该方法包括用编码人CD3 $\delta$ 的细胞外结构域的核苷酸序列替换编码内源性非人CD3 $\delta$ 的细胞外结构域的核苷酸序列,该方法包括用人CD3 $\delta$ 基因的编码外显子2至3的部分序列替换内源性小鼠CD3 $\delta$ 的编码外显子2至3的部分序列。在一个实施例中,其中该方法包括用编码人CD3 $\gamma$ 的细胞外结构域的核苷酸序列替换编码内源性非人CD3 $\gamma$ 的细胞外结构域的核苷酸序列,该方法包括用人CD3 $\gamma$ 基因的编码外显子2至4的部分序列替换小鼠CD3 $\gamma$ 的编码外显子2至4的部分序列。在本发明的一个实施例中,该替换包含替换CD3 $\epsilon$ 、CD3 $\delta$ 和CD3 $\gamma$ 的序列。在此类实施例中,该替换可通过以下过程完成:制备整合了所有三个基因座的序列遗传修饰的大靶向载体并将该大靶向载体引入小鼠ES细胞以制备小鼠,例如,如实例1中所述。

[0088] 因此,在一个实施例中,本文提供了用于制备本发明的经遗传修饰的动物的大靶向载体。在一个实施例中,该大靶向载体包含5'和3'小鼠同源臂;包含CD3 $\epsilon$ 基因的DNA片段,其包括用人CD3 $\epsilon$ 编码外显子2至5的部分序列替换小鼠CD3 $\epsilon$ 编码外显子2至4的部分序列;包含CD3 $\delta$ 基因的DNA片段,其包括用人CD3 $\delta$ 编码外显子2至3的部分序列替换小鼠CD3 $\delta$ 编码外显子2至3的部分序列;包含CD3 $\gamma$ 基因的DNA片段,其包括用人CD3 $\gamma$ 编码外显子2至4的部分序列替换小鼠CD3 $\gamma$ 编码外显子2至4的部分序列;以及选择表达盒。

[0089] 选择表达盒是插入靶标构建物中以便于选择整合了目标构建物细胞(例如细菌细胞、ES细胞)的核苷酸序列。本领域已知多种合适的选择表达盒(Neo、Hyg、Pur、CM、SPEC等)。此外,选择表达盒两侧可侧接重组位点,其允许在用重组酶处理后缺失表达盒。常用的重组位点是loxP和Frt,分别由Cre和Flp酶识别,但本领域已知其他重组位点。选择表达盒可位于构建物中编码区外的任何位置。在一个实施例中,选择表达盒插入人CD3 $\epsilon$ 插入序列的上游。

[0090] 在完成基因靶定后,对ES细胞或经遗传修饰的非人动物进行筛选以确认目标外源核苷酸序列成功整合或者外源多肽表达。本领域的技术人员已知多种技术,包括(但不限于)Southern印迹、长PCR、定量PCR(例如使用TAQMAN<sup>®</sup>的定量PCR)、荧光原位杂交、Northern印迹、流式细胞术、Western分析、免疫细胞化学、免疫组化学等。在一个实例中,带有目标遗传修饰的非人动物(例如小鼠)可通过用Valenzuela et al. (2003) High-throughput engineering of the mouse genome coupled with high-resolution expression analysis, Nature Biotech. 21 (6):652-659 (Valenzuela等人,2003年,小鼠基因组的高通量工程以及高分辨率表达分析,《自然生物技术》,第21卷,第6期,第652-659页)中描述的改进的等位基因测定方法来筛选丢失小鼠等位基因和/或获得人等位基因以进行鉴定。本领域的技术人员知悉在经遗传修饰的动物中识别特异性核苷酸或氨基酸序列的其他测定方法。

[0091] 由上述方法得到的杂合子可通过杂交产生纯合子。

[0092] 在一个方面,提供了用于制备嵌合人/非人CD3分子的方法,包括在单个细胞中由本文所述的核苷酸构建物表达嵌合CD3蛋白。在一个实施例中,核苷酸构建物是病毒载体;在一个具体实施例中,病毒载体是慢病毒载体。在一个实施例中,细胞选自表达病毒核酸序列的CHO、COS、293、HeLa和视网膜细胞(例如PERC.6<sup>TM</sup>细胞)。

[0093] 在一个方面,提供了表达嵌合人/非人CD3蛋白的细胞。在一个实施例中,细胞包含表达载体,该表达载体包含本文所述的嵌合CD3序列。在一个实施例中,细胞选自表达病毒核酸序列的CHO、COS、293、HeLa和视网膜细胞(例如PERC.6<sup>TM</sup>细胞)。

[0094] 还提供了如本文所述的由非人动物制备的嵌合CD3分子,其中在一个实施例中,该嵌合CD3分子包含人CD3蛋白细胞外结构域的全部或基本全部氨基酸序列,以及来自非人CD3蛋白(例如小鼠CD3蛋白)的至少跨膜和胞质结构域。

[0095] 除了经遗传修饰的非人动物,还提供了非人胚胎(例如啮齿动物,例如小鼠或大鼠胚胎),其中该胚胎包含如本文所述源自非人动物(例如啮齿动物,例如小鼠或大鼠)的供体ES细胞。在一个方面,胚胎包含ES供体细胞以及宿主胚胎细胞,该ES供体细胞包含所述嵌合CD3基因。

[0096] 还提供了组织,其中该组织源自如本文所述的非人动物(例如啮齿动物,例如小鼠或大鼠),并表达嵌合CD3蛋白。

[0097] 此外,提供了从如本文所述的非人动物分离的非人细胞。在一个实施例中,该细胞为ES细胞。在一个实施例中,该细胞为T细胞。在一个实施例中,该细胞为CD8<sup>+</sup>T细胞。在一个实施例中,该细胞为CD4<sup>+</sup>T细胞。

[0098] 在一些实施例中,本文还提供了包含本文所述的编码人源化CD3蛋白的核酸序列的遗传基因座。

[0099] 用于测试人类疗法的小鼠模型

[0100] 在一些方面,本文提供了用于测试靶向CD3(“抗CD3”)治疗剂的小鼠模型。在一些实施例中,本文提供了用于测试抗CD3抗原结合蛋白的小鼠模型。在一些实施例中,本文提供了用于测试抗CD3抗体的小鼠模型。在一些此类实施例中,提供了用于测试抗CD3多特异性(例如双特异性)抗原结合蛋白或抗CD3双特异性抗体的小鼠模型。因此,抗CD3多特异性抗原结合蛋白(例如抗CD3双特异性抗原结合蛋白)靶向或特异性结合所述人源化CD3蛋白和至少一种其他目标抗原。在各个方面,用于测试抗CD3双特异性抗原结合蛋白的小鼠模型(其中抗原结合蛋白能够结合CD3和目标抗原两者)包含编码人源化CD3蛋白的核酸序列,其中人源化CD3蛋白选自CD3 $\epsilon$ 、CD3 $\delta$ 、CD3 $\gamma$ 、CD3 $\zeta$ ,及其组合,以及表达或包含目标抗原的细胞。在一个实施例中,小鼠包含表达所述人源化CD3蛋白的T细胞。

[0101] 在一个实施例中,单特异性或双特异性抗原结合蛋白的测试涉及进行这样的分析或研究:其能够测定抗原结合蛋白对表达所述人源化CD3蛋白的T细胞的效应。在另一个实施例中,双特异性抗原结合蛋白的测试涉及进行这样的分析或研究:其能够测定抗原结合蛋白对表达所述人源化CD3蛋白的T细胞和表达或包含目标抗原的细胞两者的效应,或所述表达CD3的T细胞与表达或包含目标抗原的细胞之间的相互作用。在一个实施例中,单特异性或双特异性抗原结合蛋白的测试涉及进行这样的分析或研究:其能够测定表达所述人源化CD3蛋白的T细胞对表达或包含所述目标抗原的细胞的效应。在一个实施例中,这样的分析法测量例如表达目标抗原的细胞的数目、免疫应答、细胞相互作用、细胞毒性、细胞因子

释放、细胞活化、细胞增殖、肿瘤生长或消退、病理学变化等。各种分析法包括但不限于测量补体主导的细胞毒性 (CDC)、抗体依赖型细胞毒性 (ADCC)、抗体依赖型细胞吞噬作用 (ADCP)、PBMC增殖、CD69激活、组织学组织分析、组织和细胞生物标记物的分析 (例如,为了进行分析,可从小鼠中提取细胞或组织,并通过射线照相术、MRI、PET、SPECT、BLI和基于荧光的成像模态进行分析)。

[0102] 在本发明的一些实施例中,在这种小鼠模型中,目标抗原已经被引入所述小鼠中。目标抗原可通过本领域的技术人员已知的若干种方式引入。一些非限制性方法包括转基因、注射、感染、组织或细胞移植。目标抗原或其片段 (例如,被正在测试的抗原结合蛋白识别的片段) 可靶向特定细胞类型或由特定细胞类型表达。在一些实施例中,目标抗原为由小鼠基因组编码的人源化目标抗原。

[0103] 目标抗原可为膜结合蛋白,以致其仅在细胞表面上表达。或者,目标抗原或其片段 (例如,被正在测试的抗原结合蛋白识别的片段) 可显示在与另一蛋白或部分复合的细胞表面。一些细胞表面抗原可与其他蛋白相联作为共受体复合物,或结合细胞外分子或对细胞外分子具有亲和力。因此,小鼠模型可用于测试与各个细胞系统中的T细胞相互作用的双特异性抗原结合分子。

[0104] 在一个实施例中,小鼠模型表达人CD3 $\epsilon$ 、CD3 $\delta$ 、CD3 $\gamma$  细胞外结构域。在一个实施例中,小鼠表达CD3 $\epsilon$ 、CD3 $\delta$ 和CD3 $\gamma$  的小鼠跨膜结构域和胞质结构域;并且在一个实施例中,跨膜和胞质结构域为内源性小鼠结构域。在一个实施例中,小鼠模型表达CD3 $\epsilon$ 、CD3 $\delta$ 和CD3 $\gamma$ , 它们各自包含人细胞外结构域和小鼠 (例如内源性小鼠) 跨膜结构域和胞质结构域。

[0105] 在本发明的各种实施例中,抗原结合蛋白在小鼠模型中结合CD3和目标抗原两者。在一个实施例中,目标抗原为人抗原。在一个实施例中,目标抗原为灵长类动物抗原,例如食蟹猴抗原。在一个实施例中,抗原结合蛋白能够结合人和猴来源的相同目标抗原。在一个实施例中,抗原结合蛋白能够结合人和猴CD3。

[0106] 在一个实施例中,小鼠模型包含表达目标抗原的肿瘤异种移植物。在一个实施例中,在所述小鼠中表达或包含目标抗原的细胞为无限增殖化细胞,诸如肿瘤细胞。因此,小鼠模型用于测试抗CD3双特异性抗原结合蛋白在阻断或影响表达目标抗原的肿瘤细胞中的活性。

[0107] 因此,在本发明的实施例中,其中表达或包含目标抗原的细胞为肿瘤细胞,目标抗原可为肿瘤相关抗原 (TAA)。各种肿瘤抗原在T细胞限定的肿瘤抗原的数据库中列出 (van der Bruggen P, Stroobant V, Vigneron N, Van den Eynde B. Peptide database: T cell-defined tumor antigens. *Cancer Immun* 2013 (van der Bruggen P, Stroobant V, Vigneron N, Van den Eynde B, 肽数据库: T细胞限定的肿瘤抗原,《癌症免疫学》,2013年)。示例性肿瘤相关抗原包括但不限于ALK、BAGE蛋白、BIRC5 (存活素)、BIRC7、CA9、CALR、CCR5、CD19、CD20 (MS4A1)、CD22、CD27、CD30、CD33、CD38、CD40、CD44、CD52、CD56、CD79、CDK4、CEACAM3、CEACAM5、CLEC12A、EGFR、EGFR变体III、ERBB2 (HER2)、ERBB3、ERBB4、EPCAM、EPHA2、EPHA3、FCRL5、FLT3、FOLR1、GAGE蛋白、GD2、GD3、GPNMB、GM3、GPR112、IL3RA、KIT、KRAS、LGR5、EBV衍生的LMP2、L1CAM、MAGE蛋白、MLANA、MSLN、MUC1、MUC2、MUC3、MUC4、MUC5、MUC16、MUM1、ANKRD30A、NY-ESO1 (CTAG1B)、OX40、PAP、PAX3、PAX5、PLAC1、PRLR、PMEL、PRAME、PSMA (FOLH1)、RAGE蛋白、RET、RGS5、ROR1、SART1、SART3、SLAMF7、SLC39A6 (LIV1)、STEAP1、

STEAP2、TERT、TMPRSS2、Thompson-nouvelle抗原、TNFRSF17、TYR、UPK3A、VTCN1、WT1。在一个实例中，如本文实例3中所述的那样，目标抗原可为CD20，例如人或人源化CD20。

[0108] 在本发明的另一个实施例中，小鼠模型用于确定候选双特异性抗原结合蛋白是否能够阻断或影响目标抗原，即传染性疾病相关抗原。在本发明的一个实施例中，小鼠被传染性制剂感染。在本发明的一个实施例中，传染性疾病相关抗原为病毒抗原。在一个方面，病毒抗原选自HIV、甲肝病毒、乙肝病毒、丙肝病毒、疱疹病毒（例如，HSV-1、HSV-2、CMV、HAV-6、VZV、EB病毒）、腺病毒、流感病毒、黄病毒、艾柯病毒、鼻病毒、柯萨奇病毒、冠状病毒、呼吸道合胞体病毒、腮腺炎病毒、轮状病毒、麻疹病毒、风疹病毒、细小病毒、牛痘病毒、HTLV、登革病毒、乳头瘤病毒、软疣病毒、脊髓灰质炎病毒、狂犬病毒、JC病毒、埃博拉病毒和虫媒病毒性脑炎病毒抗原。

[0109] 在本发明的另一个实施例中，其中目标抗原为传染性疾病相关抗原，目标抗原为细菌抗原。在本发明的一些方面中，细菌抗原选自衣原体、立克次氏体、分枝杆菌、葡萄状球菌、链球菌、肺炎双球菌、脑膜炎球菌、淋球菌、克雷白氏杆菌、变形杆菌、沙雷氏菌、假单胞菌、军团杆菌、白喉、沙门氏菌、杆菌、霍乱、破伤风、肉毒杆菌、炭疽杆菌、瘟疫、钩端螺旋体和莱姆病细菌抗原。

[0110] 在本发明的一些方面中，基于CD3的双特异性抗原结合蛋白为基于人CD3的抗原结合蛋白。在一个实施例中，抗原结合蛋白为抗体，例如人抗体或其抗原结合片段。

[0111] 在本发明的一些实施例中，小鼠模型为有免疫活性的小鼠模型。在本发明的一些实施例中，小鼠模型能够测试目标抗原结合蛋白的功效和/或毒性。功效的量度将取决于由双特异性剂靶向的目标抗原。在一些实施例中，功效的量度为T细胞杀死表达抗原的细胞的能力。在其它实施例中，功效的量度为病毒的中和作用。在其它实施例中，功效的量度可为动物的活力。在又一个实施例中，功效的量度可为表达目标抗原的细胞的消除、T细胞的增殖、细胞因子（例如，IFN $\gamma$ 、TNF $\alpha$ 、IL-1、IL-2、IL-10、IL4、IL-6、颗粒酶、穿孔素等）的产生。

[0112] 在本发明的一些实施例中，动物身上的毒性可通过动物身上的不良事件来衡量，例如，体重、食欲、消化系统的变化，血细胞计数的变化，脾肿大，器官的组织学变化，肝酶功能的变化，尿液分析的变化，器官毒性，出血，脱水，脱毛和长皮屑，或其他发病症状。一种量度可为测定抗原结合蛋白与无关抗原的交叉反应性，在一个实施例中，该交叉反应性可通过器官组织学检测，具体地讲为检测已知不表达目标抗原的组织或细胞类型中的抗原结合蛋白。

[0113] 使用经遗传修饰的非人动物

[0114] 本发明也提供了使用本文所述的经遗传修饰的非人动物的各种方法。

[0115] 在一个实施例中，本文提供了一种筛选靶向目标抗原的候选治疗性药物的方法，该方法包括 (a) 提供或接收经遗传修饰的小鼠，该小鼠在其内源性小鼠CD3基因座处包含编码选自下列的人CD3蛋白的细胞外结构域的核酸序列：CD3 $\epsilon$ 、CD3 $\delta$ 、CD3 $\gamma$ 、CD3 $\zeta$ 及其组合；(b) 将目标抗原引入所述经遗传修饰的小鼠；(c) 使所述小鼠接触目标候选药物，其中候选药物针对人CD3和目标抗原；以及 (d) 确定候选药物对预防、减少或消除通过目标抗原的存在或表达来表征的细胞是否有效。在各个实施例中，小鼠在其T细胞表面表达功能性人源化CD3蛋白。在所述方法的一个实施例中，所述经遗传修饰的小鼠在内源性小鼠CD3基因座处包含编码人CD3 $\epsilon$ 的细胞外结构域、人CD3 $\delta$ 的细胞外结构域和人CD3 $\gamma$ 的细胞外结构域的核



酸序列。在本文所述方法的一个实施例中,小鼠不包含编码对应小鼠蛋白的功能性细胞外结构域的核酸序列。在所述方法的一些实施例中,人CD3蛋白的细胞外结构域有效连接至相应内源性小鼠CD3蛋白的跨膜结构域和胞质结构域。在所述方法的各个此类实施例中,人CD3 $\epsilon$ 的细胞外结构域示于SEQ ID NO:33,人CD3 $\delta$ 的细胞外结构域示于SEQ ID NO:34,并且人CD3 $\gamma$ 的细胞外结构域示为SEQ ID NO:35。在本文所述方法的各个实施例中,小鼠可表达SEQ ID NO:24所示的人源化CD3 $\epsilon$ 蛋白、SEQ ID NO:25所示的人源化CD3 $\delta$ 蛋白以及SEQ ID NO:26所示的人源化CD3 $\gamma$ 。

[0116] 在本文所述方法的各个实施例中,可采用本领域的技术人员已知的任何方法来完成将目标抗原引入本文所述经遗传修饰的小鼠中,这些方法可包括但不限于转基因、注射、感染、组织或细胞移植。因此,引入可通过在小鼠中表达目标抗原来实现,这可包括遗传修饰所述小鼠以表达目标抗原。或者,引入可包括将表达目标抗原的细胞引入所述小鼠中,例如,如在细胞或组织移植中那样。引入也可包括用目标抗原感染所述小鼠,例如,如在细菌或病毒感染中那样。在一个实施例中,目标抗原可为人目标抗原。在另一个实施例中,它可为细菌或病毒目标抗原。

[0117] 目标抗原可为肿瘤相关抗原,如在上文中详细描述的那样。抗原也可为传染性疾病相关抗原如细菌或病毒抗原,如在上文中详细描述的那样。

[0118] 在筛选候选治疗性药物的方法的各个实施例中,候选药物可为抗原结合蛋白例如抗体(如双特异性抗体)。在各个方面,这种候选药物能够结合人CD3和目标抗原。目标抗原可为人抗原。目标抗原也可为灵长类动物(例如猴)抗原。因此,用于筛选的候选药物除结合人CD3之外,可能能够结合人抗原和相应灵长类动物抗原两者。候选药物也可能能够结合灵长类动物(例如猴)CD3。因此,候选药物可能能够结合人和灵长类动物(例如猴)CD3两者;并且,在一个实施例中,还能够结合人目标抗原。在另一个实施例中,目标抗原可为细菌或病毒抗原,并且候选药物可能能够结合人和灵长类动物(如猴)CD3两者以及细菌或病毒目标抗原。

[0119] 在一些方面,治疗性候选物为抗体,即人抗体。在其他方面,它可为人源化抗体。例如,治疗性候选物可为在VELOCIMMUNE<sup>®</sup>小鼠(美国专利编号8,502,018,以引用方式并入本文)中生成的抗体;因此,初始抗体候选物可包含人可变区和小鼠恒定区。抗体候选物的小鼠恒定区可通过表达VELOCIMMUNE<sup>®</sup>小鼠中所选与人恒定区有效连接的人可变区而被改造成为人来源。

[0120] 在本文所述方法的各种实施例中,治疗性候选物能够缓解、消除或预防疾病。在一个实施例中,疾病为肿瘤,并且与不靶向目标抗原的试剂相比,治疗性候选物能够缓解、消除或预防肿瘤生长。在所述方法的这类实施例中,可使用肿瘤体积分析、肿瘤细胞杀伤分析、肿瘤中凋亡标记物的诱导、肿瘤血管生长减缓、免疫细胞渗入肿瘤等测定候选药物对预防、减少或消除通过目标抗原的存在或表达来表征的细胞是否有效。在另一个实施例中,疾病为传染性疾病,并且与不靶向目标抗原的试剂相比,治疗性候选物能够降低、消除或预防细菌或病毒感染。在所述方法的此类实施例中,可使用细菌或病毒滴度的量度、受感染细胞中凋亡标记物的诱导等测定候选药物对预防、减少或消除通过目标抗原的存在或表达来表征的细胞是否有效。

[0121] 还提供了使用本发明的人源化CD3小鼠的其他方法。例如,可使用非人动物(如本

文所述的人源化CD3小鼠)来研究药物作用机制。在本发明动物开发之前很难研究药物作用机制,因为此类研究通常不在人和灵长类动物身上进行且通常需要有免疫活性的动物模型。了解药物作用机制可致使开发更强的抗体。在本发明的各个实施例中,人源化CD3小鼠为有免疫活性的小鼠。例如,本发明的人源化CD3小鼠(该小鼠具有所有免疫细胞类型完好发育和完全互补且免疫信号通路完整的健康正常的免疫系统)可用于研究各种治疗性候选物对特定细胞类型、细胞因子、趋化因子等的效果。然后该小鼠可用于解答与候选药物功能相关的机制问题。

[0122] 此外,人源化CD3小鼠可用于涉及测试双特异性抗CD3候选药物对肿瘤移植的效果的方法中。先前开发的小鼠模型为免疫功能不全的小鼠模型以能够实现适当的人肿瘤移植。人源化CD3小鼠具有完全免疫活性并实现了表达目标抗原的肿瘤细胞的引入和生长,因此可研究对免疫应答的全面影响,包括但不限于回答机制问题、早期毒性问题、早期功效问题等。

[0123] 在又一个实施例中,人源化CD3小鼠可用于研究动物模型中联合药物治疗的效果,具体地讲例如其中一种药物为结合CD3的抗原结合蛋白,而另一种药物为此前被批准用于特定适应症的试剂的联合药物治疗。在进行任何人体试验之前,有关药物剂量及其效果的具体问题可在动物模型中得到解答。

#### [0124] 实例

[0125] 提供了下面的实例以便向本领域的技术人员描述如何制备本发明的组合物和如何使用本发明的方法,并且这些实例并非旨在限制本发明人视作其发明的范围。已尽量确保所使用的数字(例如量、温度等)的准确性,但应考虑到一些实验误差和偏差。这些实例不包括本领域的技术人员熟知的常规方法(分子克隆技术等)的详细描述。除非另外指明,否则份数是重量份数,分子量是平均分子量,温度以摄氏度表示,而压力是大气压或接近大气压。

#### [0126] 实例1.人源化CD3基因座的构建

##### [0127] 实例1.1.人源化CD3的构建 $\gamma \delta \epsilon$

[0128] 小鼠CD3基因座通过采用VELOCIGENE<sup>®</sup>技术由人和小鼠细菌人工染色体(BAC)DNA构建独特的靶向载体而被人源化(参见例如,美国专利No.6,586,251和Valenzuela et al.(2003)High-throughput engineering of the mouse genome couple with high-resolution expression analysis.Nat.Biotech.21(6):652-659(Valenzuela等人,2003年,与高解析度表达分析相结合的小鼠基因组高通量工程改造,《自然生物技术》,第21卷,第6期,第652-659页),这两篇文献均以引用的方式并入本文)。小鼠BAC bMQ-425K11的DNA通过同源重组被修饰,以分别用来源于人BAC RP11-414G21的CD3 $\epsilon$ 、CD3 $\delta$ 和CD3 $\gamma$ 基因(人CD3基因在11号染色体上位于彼此紧邻的位置)的对应部分替换小鼠CD3 $\epsilon$ 、CD3 $\delta$ 和CD3 $\gamma$ 基因(小鼠CD3基因在9号染色体上位于彼此紧邻的位置)的基因组DNA编码部分。

[0129] 具体地讲,为产生人源化CD3 $\gamma \delta \epsilon$ 小鼠,首先在单个靶向事件中使用包含Spec盒的靶向载体并使用小鼠同源臂,通过用939bp的人CD3D序列(对应于CD3D基因的人编码外显子2-3的部分序列)替换714bp的小鼠Cd3d序列(对应于Cd3d基因的小鼠编码外显子2-3的部分序列)来修饰小鼠BAC。

[0130] 用对应人序列替换CD3d基因的小鼠编码外显子2-3的部分序列的小鼠BAC随后同

样在单个靶向事件中使用另一含Spec盒的载体和小鼠同源臂,通过用1,639bp的人CD3G序列(对应于CD3G基因的人编码外显子2-4的部分序列)替换1,738bp的小鼠Cd3g序列(对应于Cd3g基因的小鼠编码外显子2-4的部分序列)而被修饰。

[0131] 最后,用对应人基因替换小鼠CD3d和CD3g基因的BAC通过用6,817bp的人序列替换6,213bp的小鼠CD3e序列(对应于用人CD3E基因的人编码外显子2-5的部分序列替换小鼠CD3e基因的小鼠编码外显子2-4的部分序列)而被进一步修饰。将4,996bp的floxed新霉素盒插入人CD3E序列敲入的上游。

[0132] 所得用于插入ES细胞的人源化大靶向载体示于图2A中,其中A、B、C、D、E、F和G表示不同的小鼠/人或小鼠/NEO盒或人/NEO盒接合区。接合区的序列示于下表1中。

[0133] 表1.大靶向载体的接合序列

| 图 1 中的<br>序列标号 | 接合区                    | 序列  | SEQ<br>ID NO: |
|----------------|------------------------|---|---------------|
| A              | 5'小鼠 Cd3e/XhoI/(loxP)盒 | CGACTTTCTTGACTTCTATTTGTTA<br>AACACTGTGCATTCACATCGAATGC<br>TAGAAGTTTCCTCGTCCCGCTTCCT<br>CCTGAATTGCCTGGGATCCTCTGCT<br>TGATGCCCTGTAGGAAACGTCCTTT<br>CCTGTGGTATAGAAATGACTG/CTC<br><b>GAG/ATAACTTCGTATAATGTATGC</b><br><b>TATACGAAGTTATATGCATGGCCTC</b><br>CGCGCCGGGTTTTGGCGCCTCCCGC | 1             |
| B              | 3'盒(loxP)IceUI//人 CD3E | TGTATCTTATCATGTCTGGAATAAC<br><b>TTCGTATAATGTATGCTATACGAAG</b><br><b>TTATGCTAGTAACTATAACGGTCCT</b><br>AAGGTAGCGAGCTAGC//CTCCAC<br>AGACACCAATGTTCAAATGGAGGC<br>TTGGGGGCAAATTCCTTTTGCTATG<br>TCTCTAGTCGTCCAAAAAATGGTCC<br>TAACTTTTTCTGACTCCTGCTTGT<br>AAAAATTGTGGGCTCATAGTTAATGC   | 2             |
| C              | 3'人 CD3E/小鼠 Cd3e       | AGGGGAGAATGGCCTTCATGCACTCC<br>CTCCTCACCTCCAGCGCCTTGTTT<br>TCCTTGCTTAGTGATTTCCCCTCTCC<br>CCACCCACCCCCACAGTGTGTGAG<br>AACTGCATGGAGATGGATGTGATGTC<br>GGTG/GCCATAATCATCATTGTTGAC<br>ATCTGTATCACTCTGGGCTTGCTGAT<br>GGTCATTTATTACTGGAGCAAGAATA<br>GGAAGCCAAGCCAAGCCT                  | 3             |

[0134]

|   |                        |   |   |
|---|------------------------|---|---|
| D | 3'小鼠 Cd3d/人 CD3D       | GAAAGAGAGAGTCTTTCTGCTAACTA<br>ACCCCAGAAGGCCTTCCGGTTCAT<br>GTCCTGCAAAGCAGTAGACGCCAAA<br>GCCAGGAGCAGAGTTGCGATGAGGTC<br>AATGAAGATGACACC/AGCCACGGTG<br>GCTGGATCCAGCTCCACACAGCTCTG<br>GCACACTGTGGGGGAAGGGAGGAGAG<br>AGGAGAGGTTGAGAGCCTTTAAGATC<br>AGGGAACCATCCT            | 4 |
| E | 5'人 CD3D/SgrDI/小鼠 Cd3d | CAAGAGAGACAGAAGTCACAAGAAAA<br>AGCCTTCAGAAAGTCCCCACCAACT<br>GCAGGGGTCAAGGGGGACATGAGGAT<br>GCCATTCAAG/CGTCGACG/AGCGTA<br>GGCAGCTTATTGCTCTGCATACTTAC<br>AGACCATTTGTGTAGTAAGGGACATG<br>ATGCCGAGTGAAAGGGGCAGGAGCAA<br>CCAGAGGGAGATTTTCAGGAAGTTCTC<br>CAGGGACTCGAGGTTTCGTGA | 5 |
| F | 5'小鼠 Cd3g/AsisI/人 CD3G | GAAGCCCCACCCAGAAAGGTAGGACA<br>AAGATCATAGTCATATTTACTTCATCC<br>AGGAGAGAAACACAGACACAGCCATT<br>GCCTTGGCCATCATCTCTCTCCATCTTG<br>ACCTCACGTGATCATG/GCGATCGC/G<br>AGTGATTTAGTCTACAATCCGGAAAAC<br>TAAGTATAGATACTACCATTTTCATGG<br>ATTTGGATCTTTCTTCATCTTGGCCTCA<br>AATAACCATG    | 6 |
| G | 3'人 CD3G/小鼠 Cd3g       | GCATTATTGCAGACAGGCAGGAGAAA<br>ACGAACCAGGAAAAACAACCTTTCGCA<br>ACCTGAAGGTTTGTCTCTCCTTTCCCT<br>ACAGTGTGTCAGAACTGCATTGAACTA<br>AATGCAGCCACCATATCT/GGCTTTATC<br>TTGCTGAGGTCATCAGCATCTTCTTCC<br>TTGCTCTTGGTGTATAATCTCATTGCGGG<br>ACAGGATGGACAATACCCTGTCTTAA                 | 7 |

[0136] 所靶向BAC DNA用于电穿孔包含小鼠CD3基因座缺失的小鼠ES细胞,以形成经修饰的ES细胞,用于产生在其T细胞表面上表达人源化CD3 $\epsilon$ 、CD3 $\delta$ 和CD3 $\gamma$ 的小鼠。通过定量TAQMAN<sup>TM</sup>分析来鉴定包含插入人CD3 $\epsilon$ 、CD3 $\delta$ 和CD3 $\gamma$ 序列的ES细胞(参见例如,Lie and Petropoulos,1998.Curr.Opin.Biotechnology 9:43-48(Lie和Petropoulos,1998年,《生物技术当前述评》,第9卷,第43-48页),该文献以引用方式并入本文)。特异性引物组和探针被设计成用于检测人序列的插入(等位基因获得,GOA)和小鼠序列的缺失(等位基因丢失,LOA)。表2示出了在定量PCR分析中采用的每个引物/探针组的名称和位置。

[0137] 表2:用于基因分型的引物/探针对

| 基因            | 序列名称     | 测定法 | 正向引物  | 探针(BHQ)  | 反向引物  |
|---------------|----------|-----|---|--|---|
| 小鼠 Cd3e       | 968 mTU  | LOA | CCTCTGCCATG<br>TAGGTTTGTG<br>TAC<br>(SEQ ID NO:9)   | TGCCGTGATGT<br>TTGTTCAATGA<br>CCAAA<br>(SEQ ID NO:10)  | GTTCTGAG<br>AAAGGCGT<br>TCTTAAGTG<br>(SEQ ID NO:11) |
| 小鼠 Cd3g       | 7164 mTD | LOA | CCAGGCGTACT<br>TGCTGTTCTG<br>(SEQ ID NO:12)         | TGGGCTTACCAT<br>CCAGGACGA<br>(SEQ ID NO:13)            | GCTACTCTTC<br>CCACAAACTG<br>CTTAG<br>(SEQ ID NO:14) |
| [0138] 人 CD3E | 7170 hTU | GOA | CCAGCAGTAAG<br>TTCCACTGTTC<br>TAG<br>(SEQ ID NO:15) | TGTAGAAATGG<br>CTGTGACCCAGCA<br>(SEQ ID NO:16)         | GGGCTGTGTT<br>GCAGTATGAC<br>(SEQ ID NO:17)          |
| 人 CD3D        | 928 hTU  | GOA | ACCGTGCAAGT<br>TCATTATCGAAG<br>(SEQ ID NO:18)       | ACGTGCTTCCTG<br>AACCCCTTTGGGT<br>(SEQ ID NO:19)        | TCTCACATCCA<br>GAAGCCCTATC<br>(SEQ ID NO:20)        |
| 人 CD3G        | 7164 hTD | GOA | CGAGGGATGTA<br>TCAGTGTAAG<br>GA<br>(SEQ ID NO:21)   | CACAGAACAAGT<br>CAAACCACTCC<br>AAGTG<br>(SEQ ID NO:22) | GCTCACCAGAA<br>CAGCAAATACTG<br>(SEQ ID NO:23)       |

[0139] 上述所靶向的ES细胞用作供体ES细胞,并通过VELOCIMOUSE<sup>®</sup>方法被引入8细胞期小鼠胚胎(参见例如,美国专利No.7,294,754和Poueymirou et al.(2007) F0 generation mice that are essentially fully derived from the donor gene-targeted ES cells allowing immediate phenotypic analyses Nature Biotech.25(1):91-99(Poueymirou等人,2007年,“基本上完全来源于供体基因靶向的ES细胞的F0代小鼠实现了即时表型分析”,《自然生物技术》,第25卷第1期,第91-99页))。采用等位基因分析(检测是否存在独特的人CD3基因序列)的变型形式(参见上文),通过基因分型鉴定独立携带人源化CD3基因的VELOCIMICE<sup>®</sup>(完全来源于供体ES细胞的F0小鼠)。

[0140] 选择盒可通过本领域的技术人员已知的方法除去。例如,携带人源化CD3基因座的ES细胞可用表达Cre的构建体转染,以便除去floxed盒。选择盒可任选地通过与表达Cre重组酶的小鼠嫁接除去。任选地,选择盒保留在小鼠体内。在除去选择盒之后,人源化CD3ε等位基因的小鼠/人接合区(在图2B中示为A-B),示于下表3中。其余接合区序列与靶向载体中的接合区序列相同,并示于上表1中。

[0141] 表3.人源化等位基因的接合序列

| 图 1B 中的<br>序列标号 | 接合区                                     | 序列   | SEQ<br>ID NO: |
|-----------------|---|--|---------------|
| [0142]<br>A-B   | 5'小鼠<br>Cd3e/XhoI/Lox/IceUI//<br>人 CD3E | CGACTTTCTTGACTTCTATTTGTAAACAC<br>TGTGCATTCACATCGAATGCTAGAAAGTTT<br>CCTCGTCCCCTTCCTCCTGAATTGCCTGG<br>GATCCTCTGCTTGATGCCCTGTAGGAAAC<br>GTCCTTTCTGTGGTATAGAAATGACTG/C<br><b>TCGAG/ATAACTTCGTATAATGTATGCT</b><br><b>ATACGAAGTTAT/GCTAGTAACTATAACG</b><br>GTCCTAAGGTAGCGAGCTAGC//CTTCCAC<br>AGACACCAATGTTCAAAATGGAGGCTTGG<br>GGGCAAAATTCTTTTGCTATGTCTCTAGTC<br>GTCCAAAAAATGGTCCTAACTTTTCTGA<br>CTCCTGCTTGTCAAAAATTGTGGGCTCAT<br>AGTTAATGC | 8             |

[0143] 所得人源化CD3 $\epsilon$ 、CD3 $\delta$ 和CD3 $\gamma$ 蛋白的序列示于图3中,并包括在序列表中。另外,小鼠-人序列的比对以及在所插入人序列的5'和3'处的接合区在图4中分别示为\*和\*\*。CD3 $\epsilon$ 、CD3 $\delta$ 和CD3 $\gamma$ 蛋白的GenBank蛋白登录号汇总于下表4中。

[0144] 表4 GenBank蛋白登录号

| 蛋白名称                     | 小鼠登录#<br>(SEQ ID NO)        | 人登录#<br>(SEQ ID NO)                 |
|--------------------------|-----------------------------|-------------------------------------|
| [0145]<br>CD3 $\epsilon$ | NP_031674<br>(SEQ ID NO:27) | NP_000724<br>(SEQ ID NO:28)         |
| CD3 $\delta$             | NP_038515<br>(SEQ ID NO:29) | NP_000723 (同种型 A)<br>(SEQ ID NO:30) |
| CD3 $\gamma$             | NP_033980<br>(SEQ ID NO:31) | NP_000064<br>(SEQ ID NO:32)         |

[0146] 实例2.人源化CD3小鼠的表征

[0147] 实例2.1.人源化CD3小鼠中的免疫细胞发育

[0148] 人CD3 $\epsilon\delta\gamma$ 小鼠的胸腺及外周中的免疫细胞发育采用荧光激活细胞分选(FACS)分析和微分细胞计数来评估。从野生型(WT,无人CD3 $\gamma\delta\epsilon$ )、杂合(Het,一个hCD3 $\gamma\delta\epsilon$ 等位基因)和纯合(Ho,两个hCD3 $\gamma\delta\epsilon$ 等位基因)小鼠群采集胸腺、脾和淋巴结。外周血通过心脏穿刺或眼眶后穿刺流入EDTA涂覆的Microtainer管(BD)得到。单细胞悬浮液是通过机械破碎脾、LN和胸腺制备的,并用AKC裂解缓冲液裂解除去脾、胸腺和全血中的红细胞。在室温下将细胞与抗CD16/CD32(FcBlock)的纯化抗体一起温育10分钟,通过Fc受体阻断非特异性结合,然后在4°C下与直接缀合到T和B细胞标记物上的抗体混合物一起温育30分钟。这些细胞用含1%BSA的冷PBS洗涤两次,然后重悬浮于缓冲液中并在FACSCanto II™流式细胞分析仪(BD生物科学公司(BD Biosciences))上采用流式细胞术进行分析。首先通过前向散射和侧向散射门控,然后通过B220群上的门控鉴定出胸腺细胞。在外周中,T细胞被标识为CD45+/TCRb+/B220-,B细胞被标识为CD45+/TCRb-/B220+。在Hemavet 950FS血液分析仪上获得绝对计数。

[0149] 如图5A和5B中所示,人源化CD3 $\gamma\delta\epsilon$ 小鼠看起来具有正常的胸腺细胞发育并在胸腺、外周血和脾中具有正常的T细胞和B细胞比。另外,淋巴结中T细胞和B细胞百分比看起来

很正常,并且脾和淋巴结的绝对细胞计数(该数据未示出)处于正常范围内。WT、Het和Ho小鼠之间血液中的CD4和CD8细胞数目近似。循环白细胞、淋巴细胞、单核细胞、中性粒细胞、嗜曙红细胞和嗜碱粒细胞看起来均处于正常范围内(该数据未示出)。因此,在人源化CD3 $\epsilon\delta\gamma$ 小鼠中观察到正常的免疫细胞发育。

[0150] 为了确定人源化CD3 $\epsilon\delta\gamma$ 小鼠是否具有多克隆V $\beta$  CD4+和CD8+T细胞组库,从四种人源化小鼠和五种品系匹配的对照小鼠中分离出脾细胞并检查这些细胞是否可用于TCR V $\beta$ 。收集脾并如上文所述的那样制备单细胞脾细胞。在室温下将细胞与抗CD16/CD32 (FcBlock;Biolegend)的纯化抗体一起温育10分钟,通过Fc受体阻断非特异性结合,然后重悬于直接缀合到小鼠CD4 (Biolegend) 和小鼠CD8 (Biolegend) 上的抗体混合物中。然后将直接缀合到TCR V $\beta$ 上的抗体添加到各个孔中,并在4 $^{\circ}$ C下温育30分钟。用冷PBS洗涤这些细胞并在室温下将其与活力染料(LIVE/DEAD可固定水性死细胞染料,美国生命技术公司(Life Technologies))一起温育15分钟。这些细胞用含2%FBS的冷PBS洗涤两次,然后重悬浮于缓冲液中,并用BD稳定缓冲液固定,然后在LSR Fortessa<sup>TM</sup>流式细胞分析仪(BD生物科学公司(BD Biosciences))上采用流式细胞术进行分析。首先通过前向散射和侧向散射门控,然后通过活体群上的门控鉴定出CD4和CD8T细胞。然后检查CD4T细胞(CD4+CD8-)和CD8T细胞(CD4-CD8+)是否可用于TCR V $\beta$ 。

[0151] 如图5C中可见,人源化CD3 $\epsilon\delta\gamma$ 小鼠中的CD4和CD8T细胞均使用的V $\beta$ 组库表现出多克隆性,其用法与品系匹配的对照小鼠没有显著区别。

#### [0152] 实例2.2.T细胞对人源化CD3小鼠感染的反应

[0153] 为了确定人源化CD3小鼠(人源化CD3 $\gamma\delta\epsilon$ 小鼠)是否对感染表现出正常的反应,测试人源化小鼠清除淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒(LCMV)的能力。LCMV是一种小鼠热带病毒,是否感染取决于病毒菌株。被Armstrong菌株感染可导致急性感染,在这种感染中小鼠可迅速产生T细胞响应对抗病毒并在约一周内清除感染。在另一方面,Clone 13病毒不能被清除,因此T细胞渐渐“耗尽”,形成慢性感染。因为慢性和急性感染均取决于T细胞活性,所以LCMV是测试T细胞功能的理想模型。

[0154] 用 $2 \times 10^5$ ffu的Armstrong i.p.和/或 $2 \times 10^6$ ffu的用于Clone 13感染的Clone 13i.v.感染6-8周龄的人源化CD3小鼠或品系匹配的对照小鼠,感染两周后,收集脾并通过噬斑试验测量病毒滴度。在对照和huCD3小鼠中病毒滴度均相似(图6A),这表明CD3人源化对T细胞耗尽表型没有影响,因为在两小鼠品系中T细胞均可将病毒控制于近似水平。对于Armstrong菌株感染,在初始Armstrong菌株感染两周后,用Clone 13感染小鼠,并在被Clone 13感染两周之后在脾中测量病毒滴度。在对照或人源化CD3小鼠中均未检测到病毒(图6B)。数据显示已清除急性Armstrong感染。此外,这表明,在两小鼠品系中由Armstrong感染引起的记忆T细胞足以保护小鼠免受后续的Clone 13感染。

#### [0155] 实例3.人源化CD3小鼠作为用于测试基于抗CD3的治疗性候选物的模型

##### [0156] 实例3.1.用于测试食蟹猴交叉反应的抗人CD3抗体的人源化CD3小鼠

[0157] 采用荧光激活细胞分选(FACS)分析测试不同的人限制型抗CD3抗体或食蟹猴交叉反应的抗CD3抗体结合来自野生型(WT)或人源化CD3 $\gamma\delta\epsilon$ (Ho=纯合的,Het=杂合的)小鼠的腺细胞的能力。

[0158] 在4 $^{\circ}$ C下将刚分离的腺细胞(每孔 $2 \times 10^5$ 个)与抗CD3抗体(15 $\mu$ g/ml)一起温育30分

钟。温育之后,洗涤细胞两次并加入合适的二级抗体(例如,荧光标记的PE抗人IgG和直接缀合到T细胞标记物的抗体),在4°C下再温育30分钟,然后洗涤两次。使用下面的抗体:ah/mfCD3-2和ah/mfCD3-1为识别人和猴CD3两者的两种抗体;ahCD3-2和ahCD3-1为只识别人CD3的两种抗体;amCD3-2C11为只识别小鼠CD3的抗体;对照人IgG为不相关的对照抗体;以及仅二级抗体为仅用于对照的二级抗体。这些细胞用含1%BSA的冷PBS洗涤两次,然后重悬浮于缓冲液中并在FACSCanto II™流式细胞分析仪(BD生物科学公司(BD Biosciences))上采用流式细胞术进行分析。T细胞被标识为CD45+/TCRb+/B220-。用经改造包含hIgG1的抗mCD3-2C11鉴定WT小鼠脾细胞上的T细胞。

[0159] 如图7中所示,只识别人CD3的抗CD3抗体能够结合人源化CD3  $\gamma\delta\epsilon$  小鼠脾细胞表面上的CD3;类似地,识别人和猴CD3的抗CD3抗体能够结合人源化CD3  $\gamma\delta\epsilon$  小鼠表面上的CD3。因此,所有三种CD3 $\epsilon$ 、CD3 $\delta$ 和CD3  $\gamma$  人源化的小鼠对于基于CD3的候选药物的早期预临床研究是相关的,然后可对食蟹猴开展功效和毒性研究跟进。

### [0160] 实例3.2. 人源化CD3小鼠中的T细胞活化

[0161] 测试抗人CD3抗体在人源化CD3小鼠中引发免疫应答的能力。向CD3  $\gamma\delta\epsilon$  人源化小鼠(每组2个)腹腔内注射10 $\mu$ g不同的人限制型抗CD3抗体或食蟹猴交叉反应的抗CD3抗体(所有hIgG1)。为了得到细胞组合物和血浆细胞因子水平,注射后2小时开始从眶后窦取血,将血液抽入EDT涂覆的Microtainer管(BD)中。通过FACS评估外周T细胞和B细胞数目。简而言之,在4°C下将50 $\mu$ L全血与直接缀合至T和B细胞标记物的抗体混合物一起温育30分钟。用AKC裂解缓冲液裂解除去红细胞,并用含1%BSA的冷PBS洗涤所标记细胞一次。洗涤之后,将细胞重悬于冷缓冲液中,并在FACSCANTO II™流式细胞分析仪(BD生物科学公司(BD Biosciences))上采用流式细胞术进行分析。T细胞被标识为活CD45+/TCRb+/B220-,B细胞被标识为活CD45+/TCRb-/B220+。通过加入已知量的CountBright™绝对计数珠来确定绝对细胞计数。使用小鼠促炎7-Plex超灵敏试剂盒(Mouse ProInflammatory 7-Plex Ultra-Sensitive Kit (Meso-Scale Discovery))评估注射后2小时得到的血液中的血浆细胞因子水平。

[0162] 如图8A中所示,注射10 $\mu$ g的抗CD3抗体引起瞬态T细胞和B细胞耗减,这在初始抗体治疗4天后大部分恢复。另外,注射抗CD3抗体(仅识别人CD3的抗CD3抗体(ahCD3-1和ahCD3-3)以及识别人和猴CD3两者的抗CD3抗体(ah/mfCD3-1和ah/mfCD3-2))引起CD3  $\gamma\delta\epsilon$  人源化小鼠产生细胞因子(图8B)。

[0163] 此外,采用ATP催化定量(CellTiterGlo®)评估抗人CD3抗体、抗人/食蟹猴CD3抗体或抗小鼠抗体诱导来自野生型或人源化CD3  $\gamma\delta\epsilon$  小鼠的脾细胞增殖的能力。小鼠脾细胞的活化导致驱动细胞增殖的细胞因子的释放。使用下面的方案采集增殖数据:将源自野生型(WT)或人源化纯合CD3  $\gamma\delta\epsilon$  (hCD3  $\gamma\delta\epsilon$ Ho)的脾细胞( $5 \times 10^5$ /孔)加入96孔板中,该96孔板已在4°C下用递减量的人限制型抗CD3抗体、食蟹猴交叉反应的抗CD3抗体或鼠科动物特异性抗CD3抗体涂覆过夜。将500ng/mL抗小鼠CD28加入培养物中,并在37°C下温育72h。温育之后,加入CellTiterGlo®并使用VICTOR X5多标记读板机(珀金埃尔默公司(PerkinElmer))测量发光强度。使用Prism(加利福尼亚州圣地亚哥的GraphPad Software公司(GraphPad Software, San Diego, CA))确定EC50细胞活力(ATP催化定量)。使用4参数非线性回归分析计算数值。



[0164] 如图9中所示,通过食蟹猴交叉反应的CD3抗体诱导来自人源化CD3  $\gamma\delta\epsilon$ 小鼠的脾细胞增殖。

[0165] WT和CD3  $\gamma\delta\epsilon$ 小鼠各种特性的汇总示于图10中。如图中可见,来自CD3  $\gamma\delta\epsilon$ 小鼠的淋巴细胞能够结合抗人CD3抗体并响应于抗人CD3抗体(尤其已知与猴CD3交叉反应的那些),这是治疗剂的一个重要方面,因为对候选药物的预临床研究通常是在大型动物诸如食蟹猴中开展的。

#### [0166] 实例3.3.人源化CD3小鼠中肿瘤耗减研究

[0167] 通过使在CD3基因座处人源化的小鼠与在CD20基因座处人源化的小鼠杂交产生CD3(上述人源化CD3  $\gamma\delta\epsilon$ 小鼠)和CD20两者双重人源化的小鼠。所得动物表达两种人源化蛋白。具体地讲,为产生人源化CD20小鼠,用从第二氨基酸到3'非翻译区下游107bp、横跨8482bp的对应CD20人编码区域(Human Chr.11)替换从第二氨基酸(第一氨基酸为Met,)到3'非翻译区下游167bp、横跨9312bp的整个小鼠Ms4a1(Cd20)编码区域(Murine Chr.19)。小鼠和人CD20均具有六个外显子。用于下述实验中的动物在CD3和CD20基因座处的替换均为纯合的,并通过在各个基因座处修饰过的小鼠杂交产生。

[0168] 人源化CD3/CD20小鼠经皮下植入 $2 \times 10^5$ 个经人CD20转染的B16F10.9黑素瘤肿瘤细胞。在第0天(肿瘤移植之日)开始,每周两次用载体(PBS;n=5)、0.4mg/kg对照Ab 2(对CD20抗原不显示交叉反应性的对照抗体;n=5)、0.4mg/kg Ab 1(抗CD3/CD20双特异性抗体,参见W02014121087A1,2014年8月7日公布,N=5)或0.004mg/kg Ab 1(n=5)以腹腔内给药方式治疗小鼠。测量肿瘤体积,如图11A中所示。当肿瘤体积大于约1500mm<sup>3</sup>时杀死小鼠。如图11A中所示,当治疗与肿瘤移植同时开始时,用Ab 1处理延缓了肿瘤生长。

[0169] 在单独的实验中,还测试了Ab 1在已成形肿瘤中抑制肿瘤生长的能力(图11B)。人源化CD3/CD20小鼠经皮下植入 $2 \times 10^5$ 个表达人CD20的B16F10.9黑素瘤肿瘤细胞。在肿瘤植入后第10天,按照肿瘤大小将小鼠随机分组成以下治疗组,每组5只小鼠:载体(PBS)组、4mg/kg对照Ab 2(对CD20抗原不显示交叉反应性的对照抗体)组、4mg/kg的Ab 1组或0.4mg/kg的Ab 1组。所有小鼠均用腹腔注射,每周2次。当肿瘤体积大于约1500mm<sup>3</sup>时杀死小鼠。如图11B中所示,用Ab 1治疗延缓了已成形肿瘤的肿瘤生长,表明人源化CD3小鼠对早期候选药物研究是有利的。

#### [0170] 等同方案

[0171] 本领域的技术人员将认识到,或能够使用不超过常规实验的手段确定本文所述发明的具体实施例的许多等同方案。这些等同方案旨在包括在以下权利要求中。

[0172] 在整个本申请中所引用的所有非专利文献的整体内容、登录号、网站等、专利申请和专利出于所有目的全文以引用方式并入本文,其程度如同每一篇被单独引用。如果登录号或其他引用内容在不同时间与不同内容相关,则指在本申请的有效申请日期有效的内容,有效申请日期为参考所引用内容的最早优先权申请的申请日期,如果该日期不存在,则为实际申请日期。

[0173] 除非根据情形显见,否则任何实施例、方面、元件、特征、步骤等可与任何其他实施例、方面、元件、特征、步骤等组合。

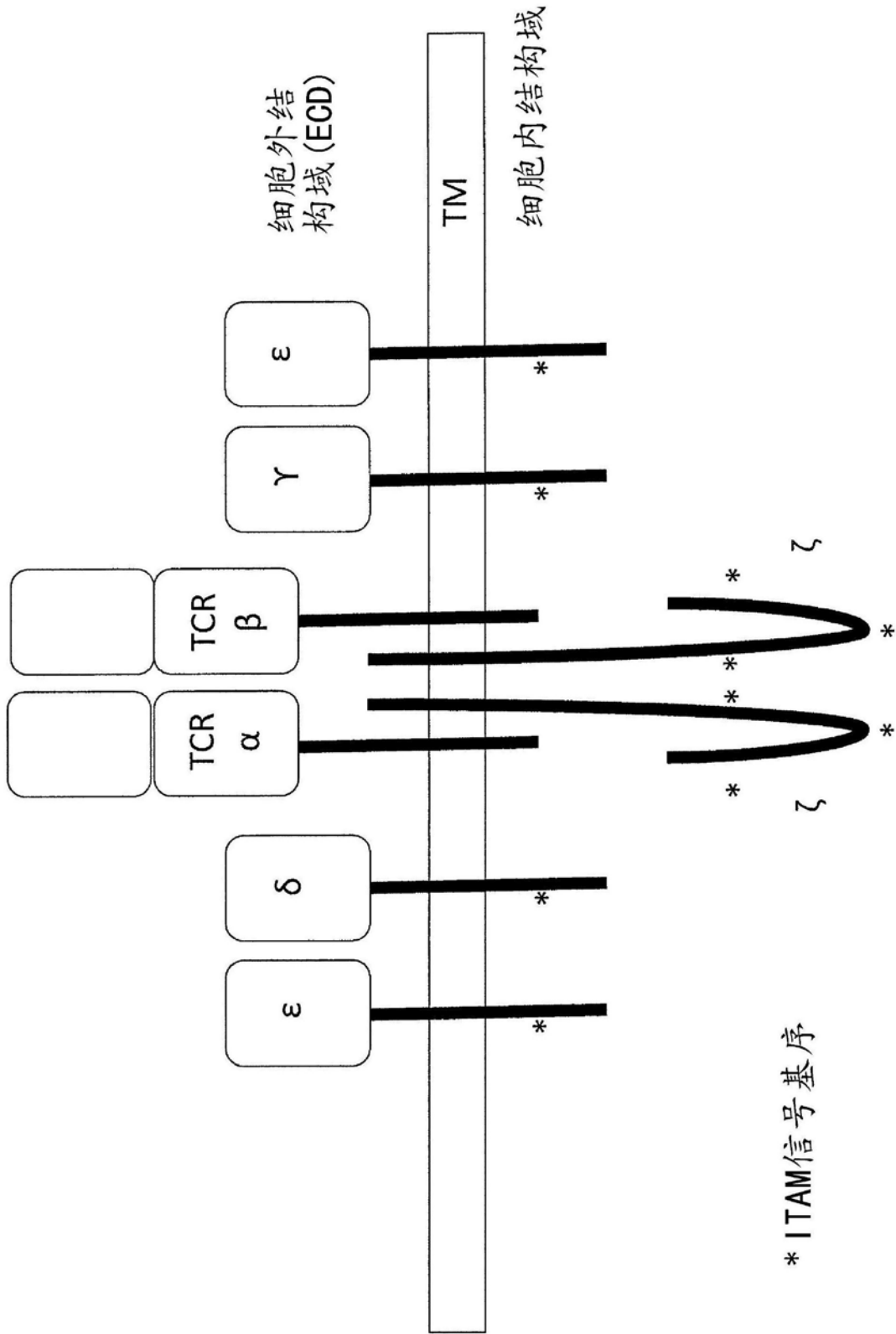


图1

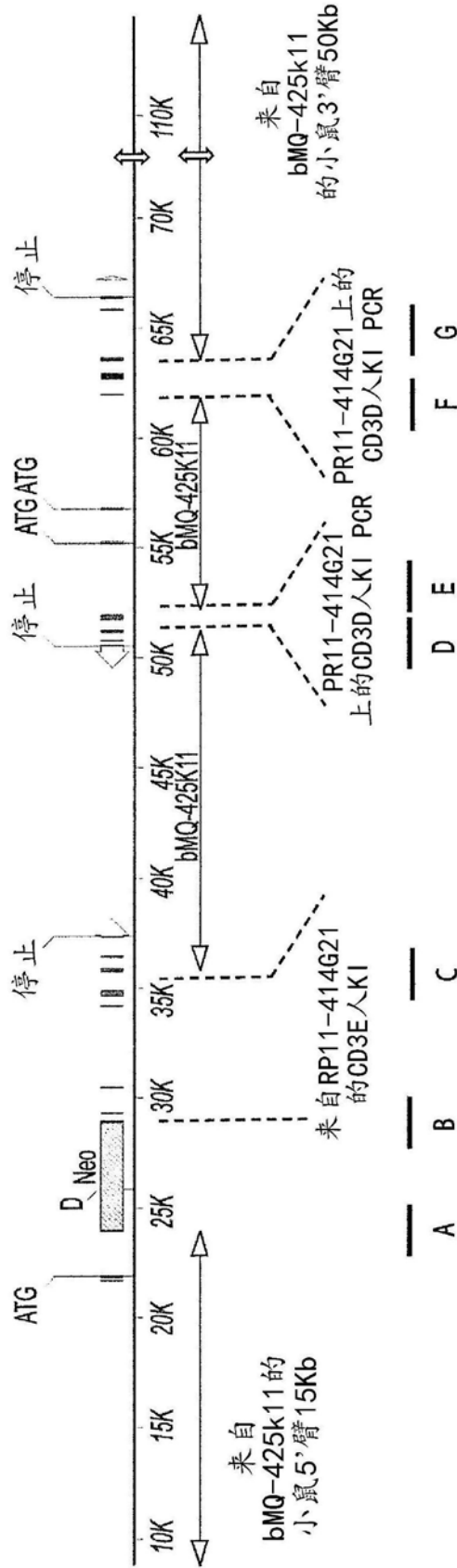


图2A

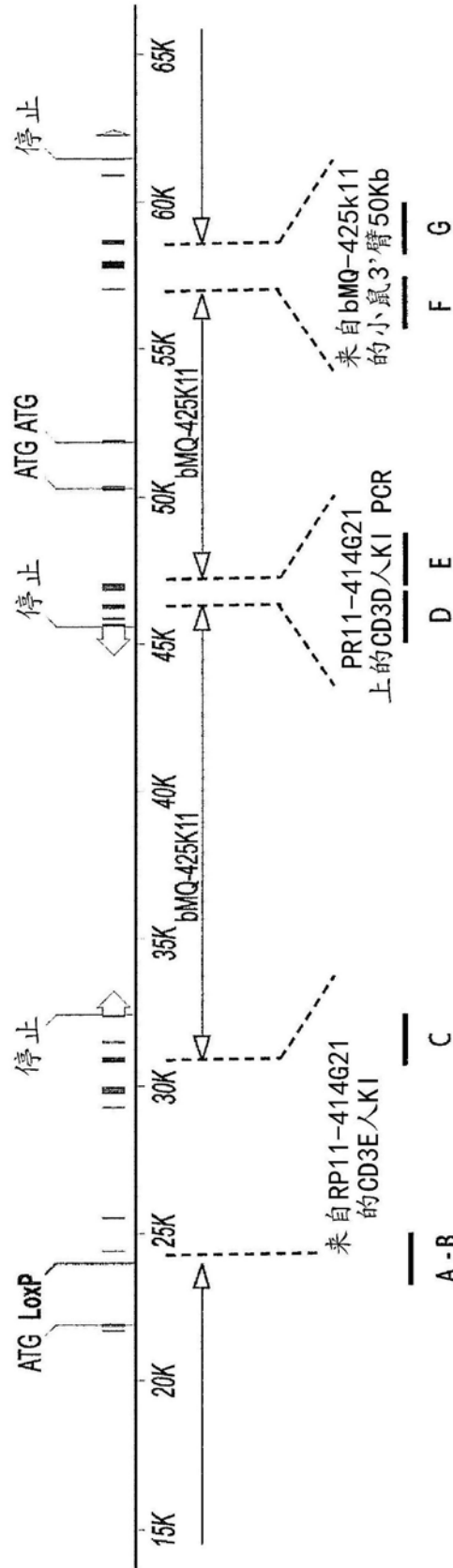


图2B

## CD3e 人源化蛋白

(SEQ ID NO: 24)

MRWNTFWGILCLSLAVGVWGDGNEEMGGITQTPYKVSISGTTVILTCPQ  
YPGSEILWQHNDKNIGGDEDDKNIGSDEDHLSLKEFSELEQSGYVVCYPRGSK  
PEDANFYLRARVCENCMEMDVMVAIIIVDICITLGLLMVYYWWSKNRKAK  
AKPVTRGTGAGSRPRGQNKERPPVPPNDYEPYRKGQRDLYSGLNQRAV\*

## CD3d 人源化蛋白

(SEQ ID NO: 25)

MEHSGILASLIIAVLPQVSPFKIPIEELEDRVFNCSITWVEGTVGTLSDITRL  
DLGKRILDPRGIYRCNGTDIYKDESTVQVHYRMCQSCVELDPATVAGVIFIDLIA  
TLLLALGVYCFAGHETGRPSGAAEVQALLKNEQLYQPLRDREDTQYSRLGGNWP  
 RNKKS\*

## CD3g 人源化蛋白

(SEQ ID NO: 26)

MEQRKGLAGLFLVISLLOGLTAQSIKGNHLVKVYDYQEDGSVLLTCDAEAKNIT  
WFKDGKMIGFLTEDKKKWNLGSNAKDPGRMYQCKGSGQNSKSKPLQVYYRMC  
QNCIELNAATISGFIFAEVISIFFLALGVYLIAGQDGVQRQRASDKQTLLQNEQLY  
QPLKDREYDQYSHLQGNQLRKK\*

加下划线的残基由所引入的人外显子编码

图3



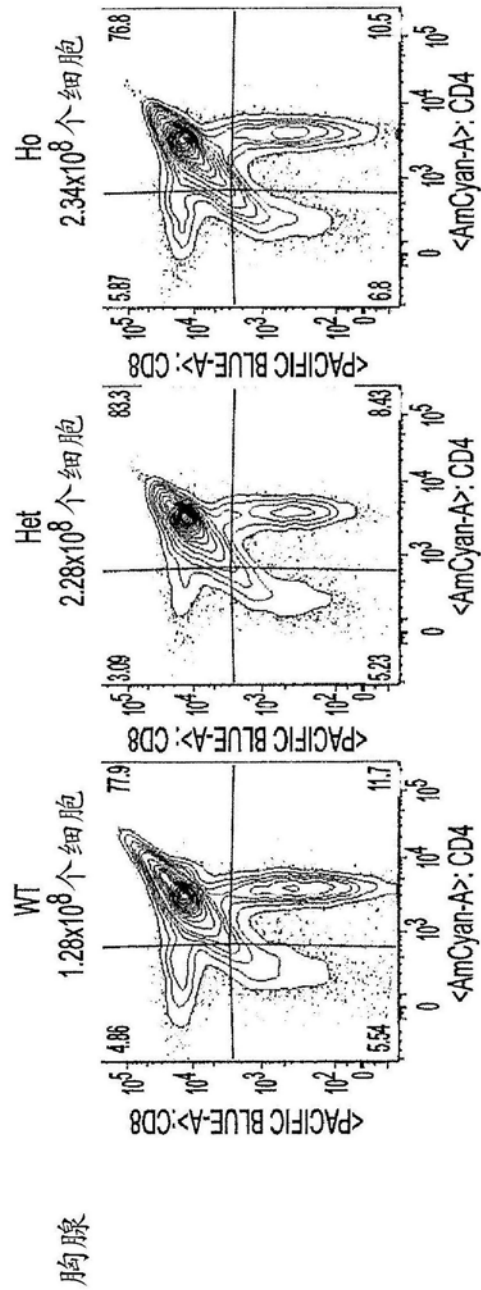


图5A

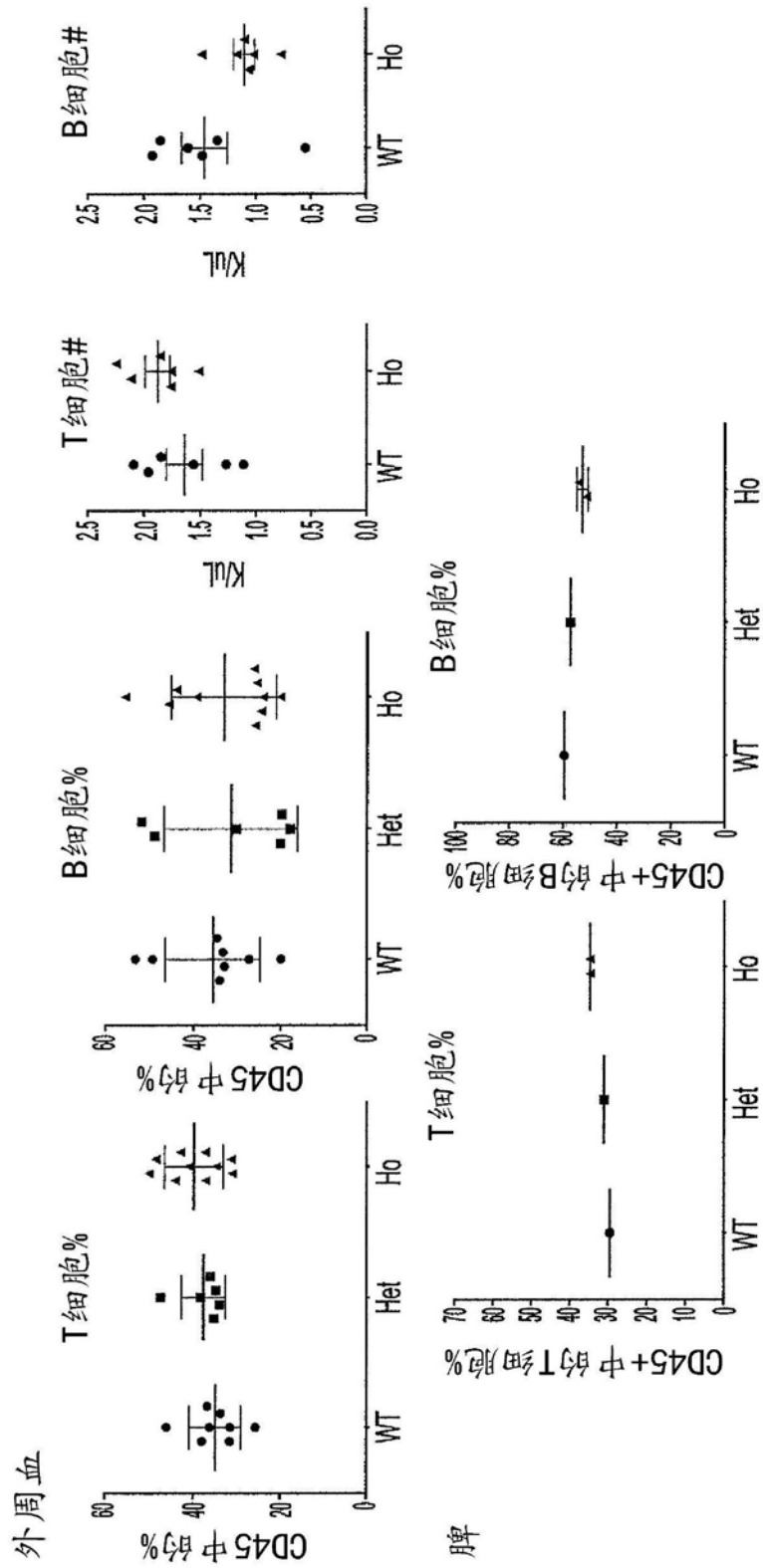


图5B



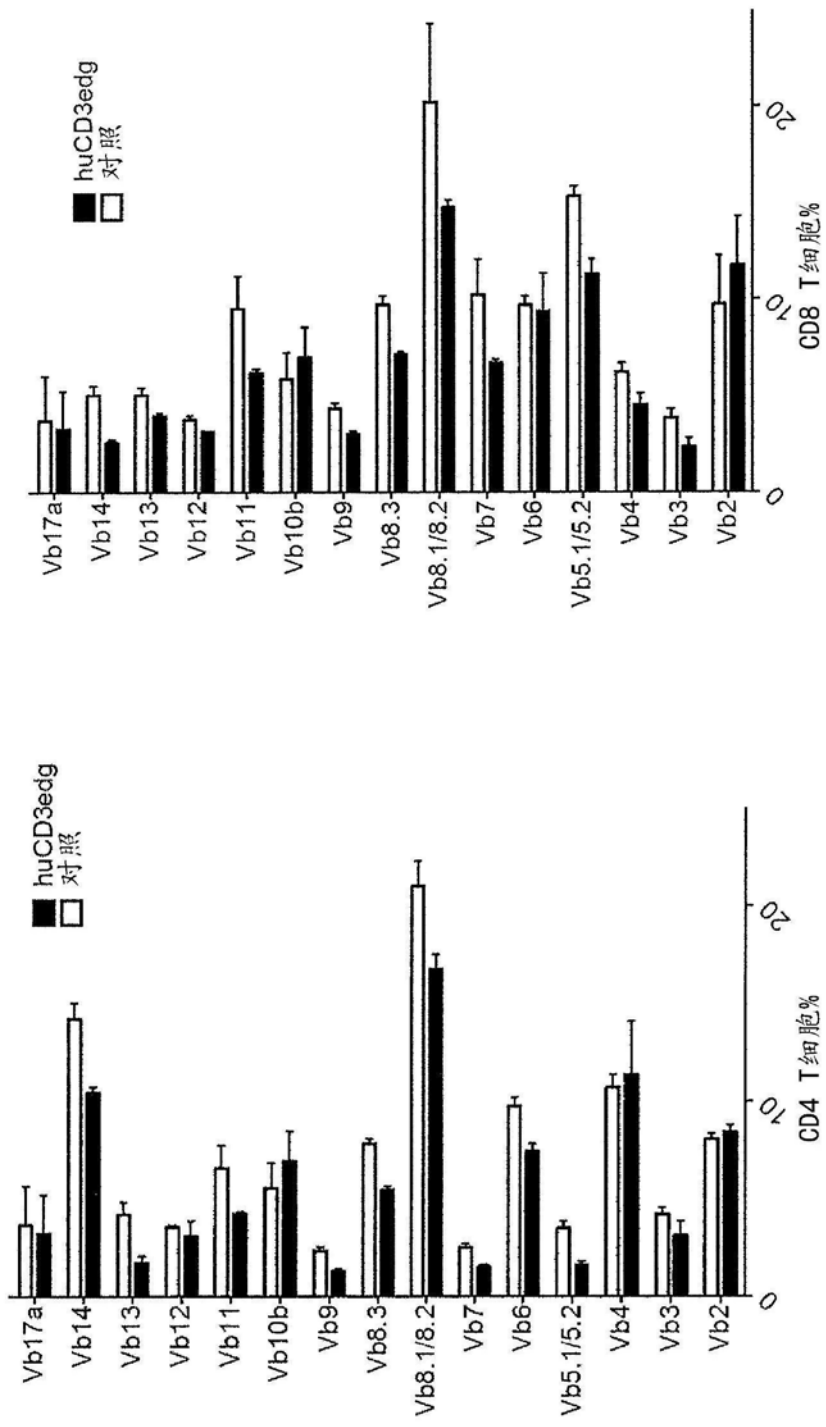


图5C

存在或不存在先前的LCMV Armstrong感染下被LCMV Clone 13  
感染的人源化CD3小鼠脾滴度 (ffu/mL)

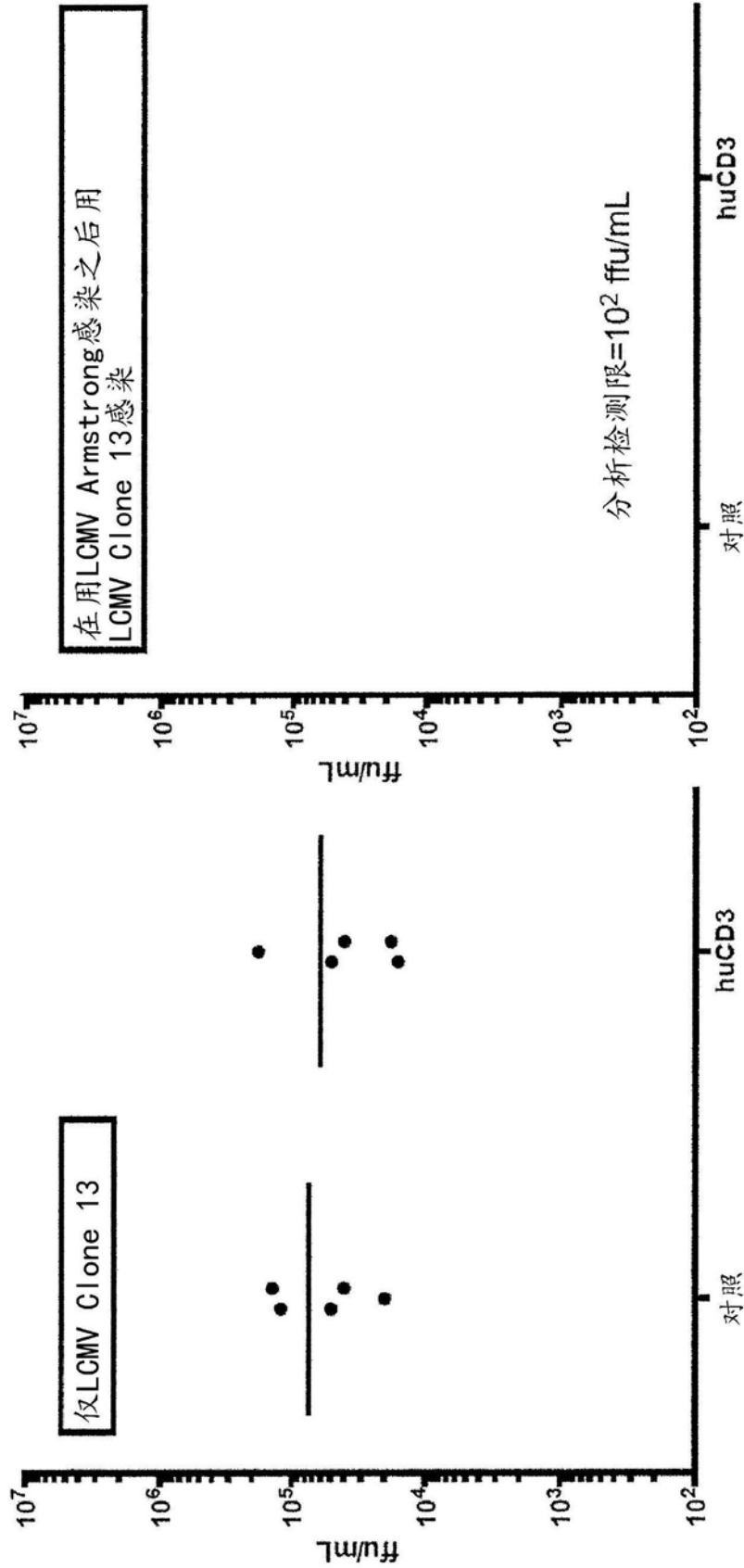


图 6A

图 6B

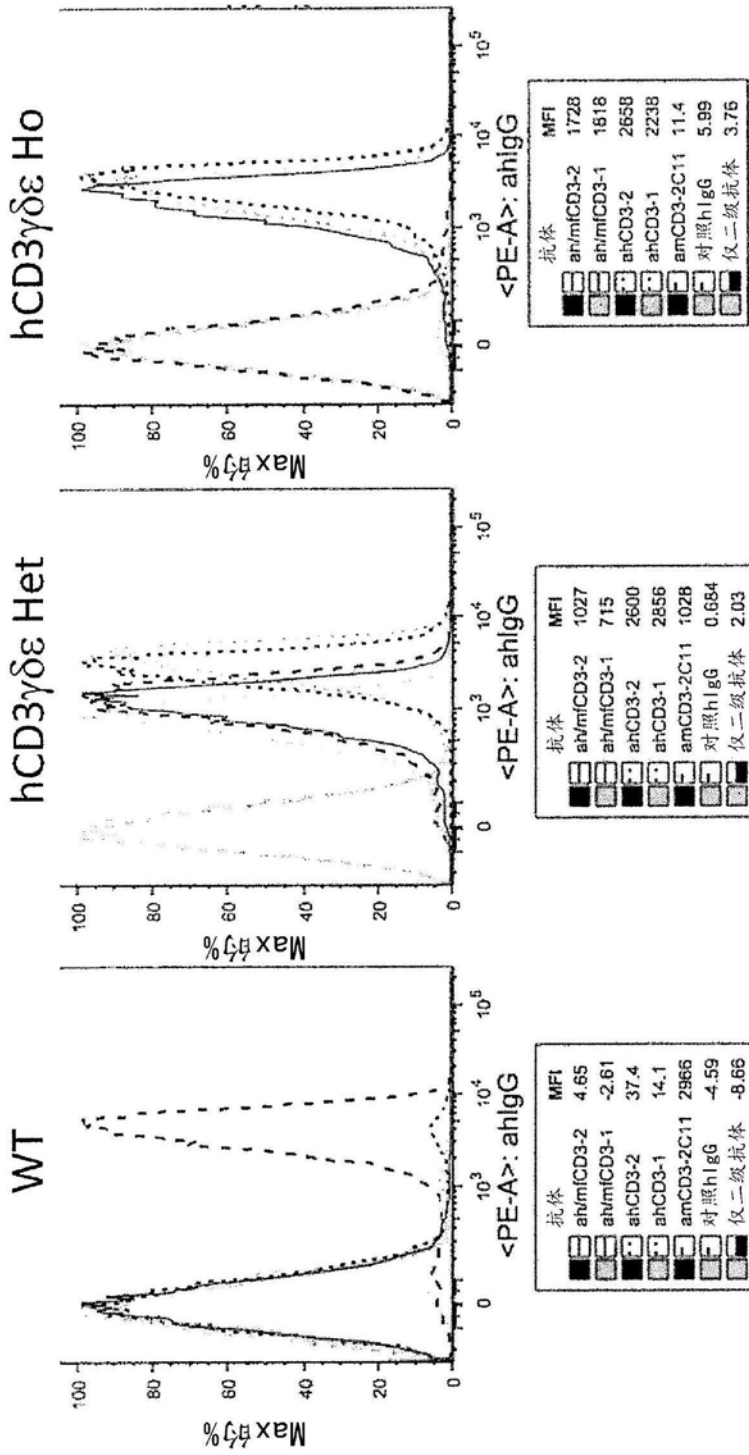


图7

- ah/mf为与食蟹猴CD3交叉反应的抗人CD3抗体
- ah为不与食蟹猴CD3交叉反应的抗人CD3抗体

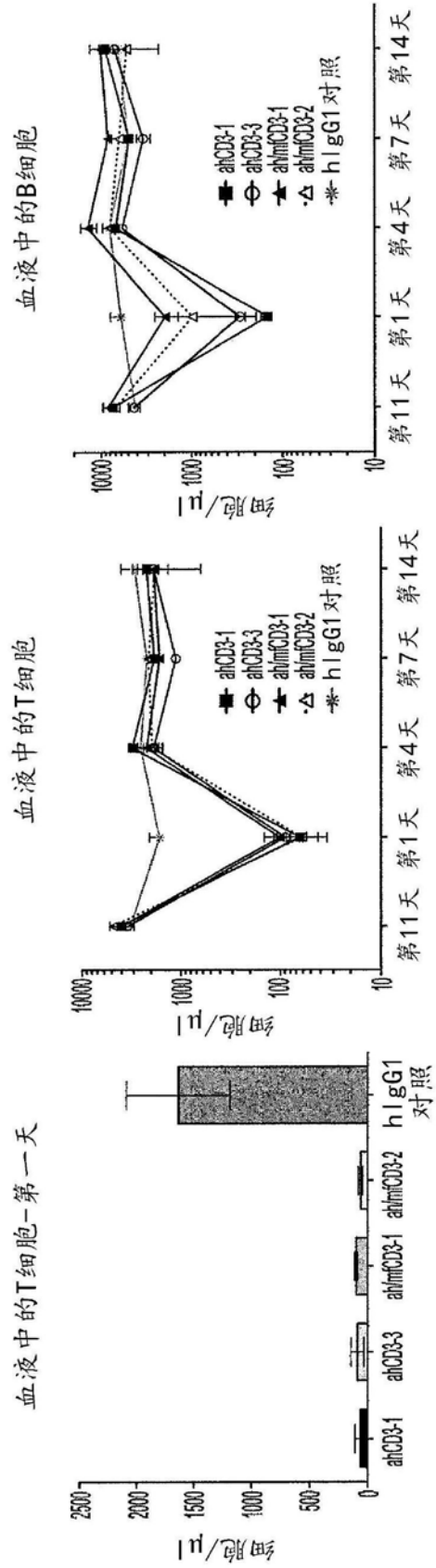


图8A

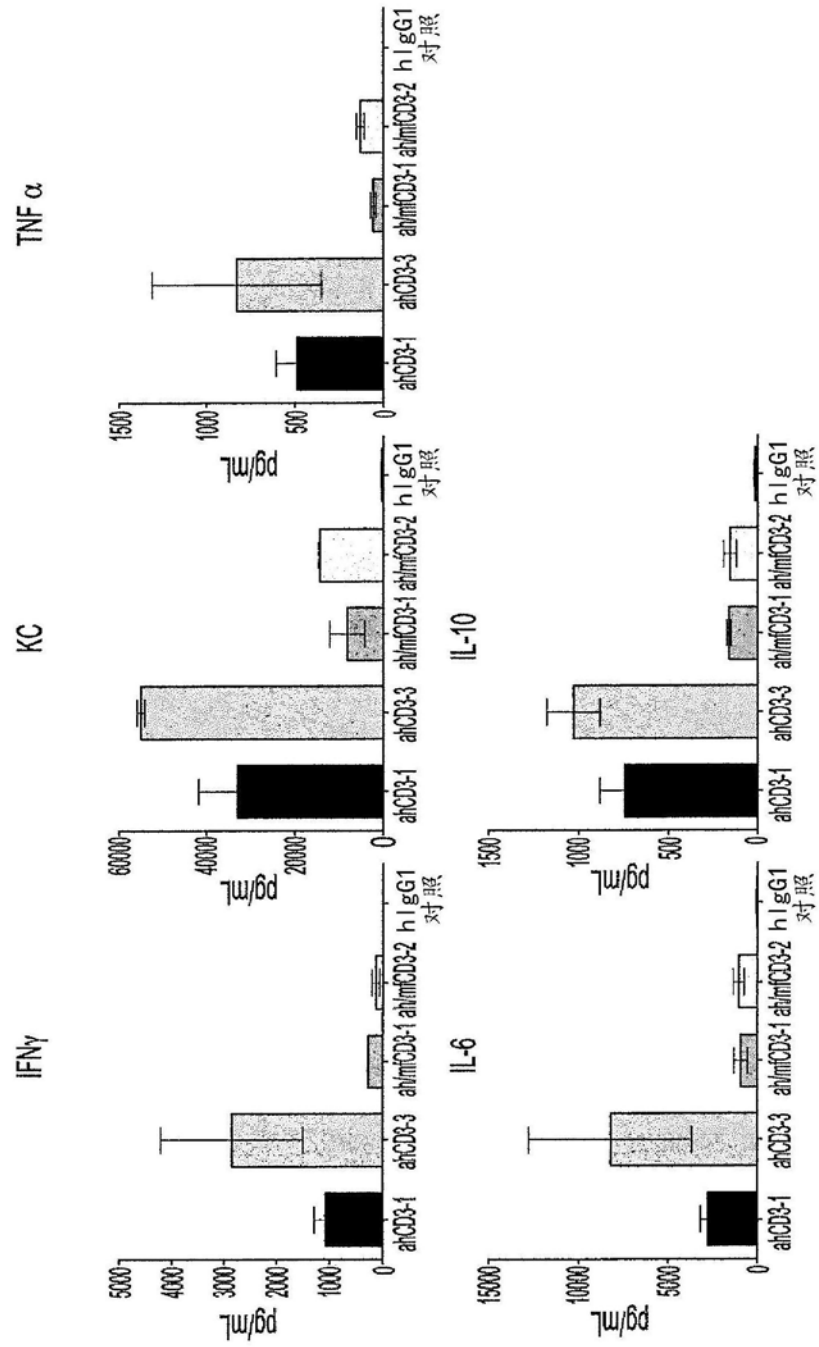


图8B

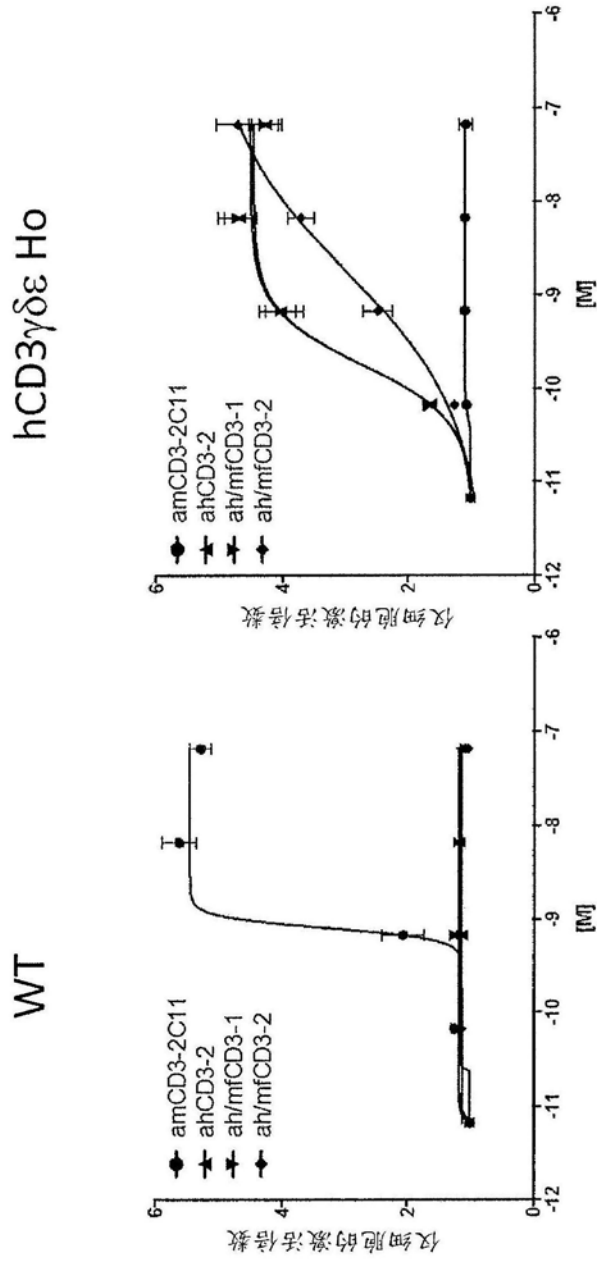
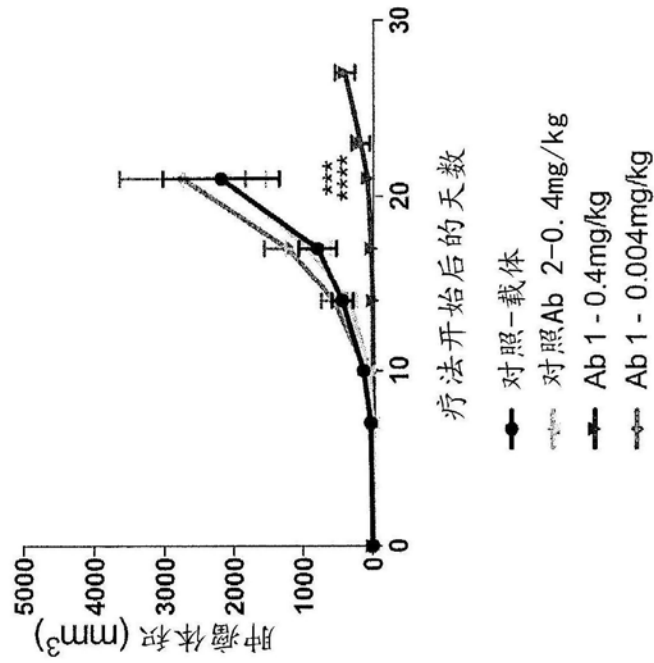


图9

| 基因型            | ECD | T细胞发育 | 是否对抗<br>mCD3有响应 | 结合抗hCD3                               | 是否对抗<br>hCD3有响应                       |
|----------------|-----|-------|-----------------|---------------------------------------|---------------------------------------|
| WT             | 小鼠  | 正常    | 是               | 否                                     | 否                                     |
| hCD3gde<br>纯合型 | 人   | 正常    | 否               | 是, 所有测<br>试, 的抗体, 与抗体的<br>交叉反应<br>食蟹猴 | 是, 所有测<br>试, 的抗体, 与抗体的<br>交叉反应<br>食蟹猴 |

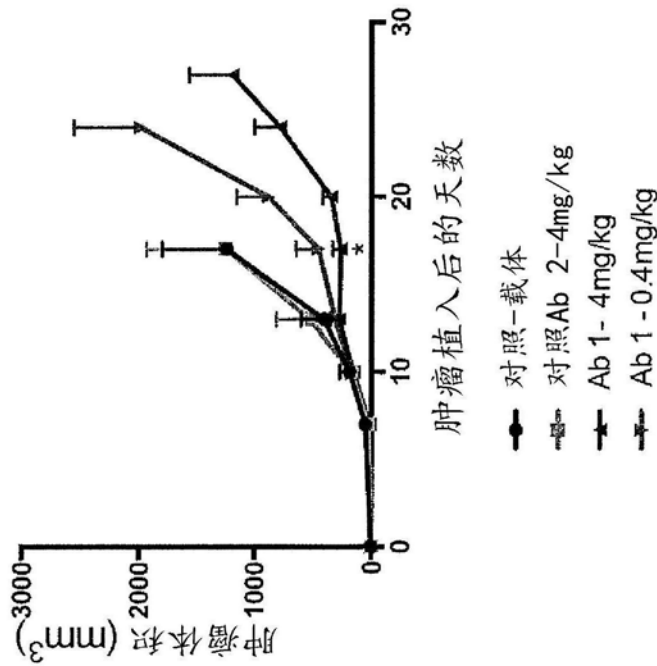
图10



\*\*\*\* - 与载体相比; \*\*\* - 与对照Ab 2相比

数据表示每组n=5小鼠的复合数据。数据以平均值(SEM)表示,并采用方差分析(ANOVA)和事后检验进行分析以研究显著效应(Turkey双向ANOVA)。

图11A



\* - 与载体和抗体对照相比;

数据表示每组n=5小鼠的复合数据。数据以平均值(SEM)表示,并采用方差分析(ANOVA)进行分析

图11B