



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

A01K 67/0276 (2020.08); A01K 67/0278 (2020.08); C07K 14/70503 (2020.08)

(21)(22) Заявка: 2018117944, 18.11.2016

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
18.11.2016Дата регистрации:
24.03.2021

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
20.11.2015 US 62/258,181;
03.08.2016 US 62/370,430

(43) Дата публикации заявки: 20.12.2019 Бюл. № 35

(45) Опубликовано: 24.03.2021 Бюл. № 9

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 20.06.2018(86) Заявка РСТ:
US 2016/062733 (18.11.2016)(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2017/087780 (26.05.2017)Адрес для переписки:
119019, Москва, б-р Гоголевский, 11, пом. 3й
этаж, "Гоулинг ВЛГ (Интернэшнл) Инк."

(72) Автор(ы):

МУДЖИКА Александр О. (US),
БУРОВА Елена (US),
МЕРФИ Эндрю Дж. (US)

(73) Патентообладатель(и):

РЕГЕНЕРОН ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ,
ИНК. (US)(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: WO2004078928 A2, 16.09.2004. WOO
SR et al., Immune inhibitory molecules LAG-3
and PD-1 synergistically regulate T-cell function
to promote tumoral immune escape, Cancer Res.,
2012, Vol.72, p.4, pp.917-927. WO0236789 A2,
10.05.2002. ELENA BUROVA et al., Abstract 266:
Antitumor activity of REGN2810, a fully human
anti-PD-1 monoclonal antibody, (см. прод.)(54) ЖИВОТНЫЕ, ОТЛИЧНЫЕ ОТ ЧЕЛОВЕКА, ИМЕЮЩИЕ ГУМАНИЗИРОВАННЫЙ ГЕН
АКТИВАЦИИ ЛИМФОЦИТОВ-3

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биохимии, в частности к грызуну для получения гуманизированного полипептида гена активации лимфоцитов-3 (Lag-3), при этом геном грызуна содержит гуманизированный ген Lag-3 в эндогенном локусе Lag-3, к способу его получения, а также к его ткани и клетке. Также раскрыта эмбриональная стволовая (ЭС) клетка грызуна для получения гуманизированного

полипептида Lag-3 и эмбрион грызуна, содержащий вышеуказанную клетку. Изобретение позволяет эффективно оценивать противоопухолевую эффективность и фармакокинетические свойства лекарственного средства, целенаправленно воздействующего на человеческий LAG-3. 8 н. и 11 з.п. ф-лы, 9 ил., 1 табл., 3 пр.

(56) (продолжение):

against MC38.Ova tumors grown in immune-competent humanized PD-1 mice, AACR 106th Annual Meeting 2015; April 18-22, 2015; Philadelphia, PA. RU2425880 C2, 10.08.2011.

R U
2 7 4 5 4 0 3
C 2

R U
2 7 4 5 4 0 3
C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
A01K 67/027 (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

A01K 67/0276 (2020.08); *A01K 67/0278* (2020.08); *C07K 14/70503* (2020.08)(21)(22) Application: **2018117944**, 18.11.2016(24) Effective date for property rights:
18.11.2016Registration date:
24.03.2021

Priority:

(30) Convention priority:
20.11.2015 US 62/258,181;
03.08.2016 US 62/370,430

(43) Application published: 20.12.2019 Bull. № 35

(45) Date of publication: 24.03.2021 Bull. № 9

(85) Commencement of national phase: 20.06.2018

(86) PCT application:
US 2016/062733 (18.11.2016)(87) PCT publication:
WO 2017/087780 (26.05.2017)

Mail address:

119019, Moskva, b-r Gogolevskij, 11, pom. 3j etazh,
"Gouling VLG (Interneshnl) Ink."

(72) Inventor(s):

MUDZHIKA Aleksandr O. (US),
BUROVA Elena (US),
MERFI Endryu Dzh. (US)

(73) Proprietor(s):

REGENERON FARMASYUTIKALZ, INK.
(US)(54) **NON-HUMAN ANIMALS HAVING HUMANIZED LYMPHOCYTE-ACTIVATION GENE 3**

(57) Abstract:

FIELD: biochemistry.

SUBSTANCE: invention relates to biochemistry, in particular to a rodent for producing a humanized polypeptide of the lymphocyte-activation gene 3 (Lag-3), wherein the rodent gene comprises a humanized Lag-3 gene in the endogenous locus Lag-3, a method for producing said gene, and also to the tissue and cell thereof. An embryonic rodent stem (ES) cell for

producing a humanized Lag-3 polypeptide and a rodent embryo containing the above-mentioned cell are also disclosed.

EFFECT: invention enables effectively assessing the antitumor effectiveness and pharmacokinetic properties of a medicinal agent which is purposely acting on human LAG-3.

19 cl, 9 dwg, 1 tbl, 3 ex

C 2
3
4
5
4
7
2
R UR U
2
7
4
5
4
0
3
C 2

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[001] Настоящая заявка испрашивает приоритет на основании предварительной заявки на патент США №62/258181, поданной 20 ноября 2015 г., и предварительной заявки на патент США №62/370430, поданной 3 августа 2016 г., полное содержание которых включено в данный документ посредством ссылки.

ВКЛЮЧЕНИЕ ПЕРЕЧНЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ПОСРЕДСТВОМ ССЫЛКИ

[002] Перечень последовательностей в виде текстового файла ASCII размером 49 кБ под названием 34031_10212US01_SequenceListing.txt, созданный 18 октября 2016 г. и поданный в Ведомство по патентам и товарным знакам США через EFS-Web, включен в данный документ посредством ссылки.

ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[003] Рак остается огромной проблемой в отрасли здравоохранения во всем мире отчасти потому, что раковые клетки обладают способностью уклоняться от иммунной системы хозяина. Полагают, что такая способность является результатом ингибирования и/или подавления противоопухолевого иммунитета. Разработка применимых систем *in vivo* для оптимального определения терапевтического потенциала новых терапевтических средств и/или схем для лечения рака, предназначенных для активации и/или стимуляции противоопухолевого иммунитета, и определение механизмов передачи ингибирующих сигналов от раковых клеток к иммунным клеткам, в частности Т-клеткам, по-прежнему является недостаточной. Такие системы обеспечивают источник для анализов для оценки терапевтической эффективности кандидатных средств, обеспечивающих противоопухолевую среду *in vivo*.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[004] Настоящее изобретение охватывает понимание того, что для обеспечения улучшенных систем идентификации и разработки новых терапевтических средств и/или схем лечения, которые можно применять для лечения рака, желательным является получение с помощью генной инженерии животных, отличных от человека. Настоящее изобретение также охватывает понимание того, что для обеспечения улучшенных систем *in vivo* для идентификации и разработки новых терапевтических средств, которые можно применять для лечения аутоиммунных (или воспалительных, или инфекционных) заболеваний, нарушений или состояний, желательным является получение с помощью генной инженерии животных, отличных от человека. Настоящее изобретение также охватывает понимание того, что для обеспечения улучшенных систем *in vivo* для идентификации и разработки новых терапевтических средств, которые стимулируют противораковый иммунитет, желательным является получение с помощью генной инженерии животных, отличных от человека. Кроме того, настоящее изобретение также охватывает понимание того, что, например, для применения в идентификации и разработке противораковых терапевтических средств, повышающих противоопухолевый иммунитет, желательными являются животные, отличные от человека, имеющие гуманизированный ген активации лимфоцитов-3 (Lag-3) и/или иным образом экспрессирующие, содержащие или продуцирующие человеческий или гуманизированный полипептид Lag-3. В некоторых вариантах осуществления животные, отличные от человека, по настоящему изобретению обеспечивают улучшенные системы *in vivo* для идентификации и разработки способов комбинированной терапии, предусматривающих целенаправленное воздействие на Lag-3 и/или белок запрограммированной гибели клеток-1 (PD-1).

[005] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает

животных, отличных от человека, имеющих геном, содержащий сконструированный ген Lag-3, причем данный сконструированный ген Lag-3 содержит генетический материал от двух различных видов (например, человека и вида, отличного от человека). В некоторых вариантах осуществления такой сконструированный ген Lag-3 содержит генетический материал, который кодирует один или более иммуноглобулиноподобных (Ig-подобных) доменов человеческого полипептида LAG-3. В некоторых вариантах осуществления генетический материал кодирует Ig-подобные домены человеческого полипептида LAG-3, ответственные за связывание лиганда (например, связывание МНС класса II). Таким образом, в некоторых вариантах осуществления сконструированный ген Lag-3 животного, отличного от человека, описанного в данном документе, кодирует полипептид Lag-3, содержащий человеческую и отличную от человеческой части, где человеческая и отличная от человеческой части соединены вместе и образуют функциональный полипептид Lag-3. В некоторых вариантах осуществления сконструированный ген Lag-3 животного, отличного от человека, описанного в данном документе, кодирует полипептид Lag-3, содержащий первые два полных или неполных Ig-подобных домена (D1 и D2) человеческого полипептида LAG-3. Говоря в общем, первые два Ig-подобных домена (D1 и D2) содержатся в пределах 260 N-концевых аминокислот человеческого полипептида LAG-3, а в некоторых вариантах осуществления в пределах аминокислотных остатков 21-260, 23-260 или 29-260 человеческого полипептида LAG-3. См. также фигуры 1-2, например.

[006] В некоторых вариантах осуществления предусмотрено животное, отличное от человека, которое экспрессирует полипептид Lag-3, причем данный полипептид Lag-3 содержит человеческую часть и эндогенную часть.

[007] В некоторых вариантах осуществления предусмотрено животное, отличное от человека, геном которого содержит гуманизированный ген (или локус) Lag-3, который содержит эндогенную часть и человеческую часть, где эндогенная и человеческая части функционально связаны с отличным от человеческого промотором Lag-3.

[008] В некоторых вариантах осуществления эндогенная часть полипептида Lag-3 содержит внутриклеточную часть эндогенного полипептида Lag-3. В некоторых вариантах осуществления эндогенная часть полипептида Lag-3 содержит внутриклеточный домен эндогенного полипептида Lag-3. В некоторых определенных вариантах осуществления эндогенная часть полипептида Lag-3 дополнительно содержит трансмембранную часть эндогенного полипептида Lag-3. В некоторых вариантах осуществления эндогенная часть полипептида Lag-3 содержит трансмембранный домен эндогенного полипептида Lag-3. В некоторых вариантах осуществления эндогенная часть полипептида Lag-3 дополнительно содержит внеклеточную часть эндогенного полипептида Lag-3, например C-концевую часть внеклеточного домена эндогенного полипептида Lag-3, которая не содержит первые два Ig-подобных домена, но содержит последних два Ig-подобных домена (D3 и D4). В некоторых вариантах осуществления эндогенная часть полипептида Lag-3 содержит аминокислоты сигнального пептида эндогенного полипептида Lag-3. Например, эндогенная часть полипептида Lag-3, по сути, содержит сигнальный пептид эндогенного полипептида Lag-3.

[009] В некоторых вариантах осуществления эндогенная часть полипептида Lag-3 имеет аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 98% идентична соответствующей аминокислотной последовательности, представленной в полипептиде Lag-3 грызуна с

SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4. В некоторых вариантах осуществления эндогенная часть полипептида Lag-3 имеет аминокислотную последовательность, которая, по сути, идентична или идентична соответствующей аминокислотной последовательности, представленной в полипептиде Lag-3 грызуна с SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4.

5 [0010] В некоторых вариантах осуществления эндогенная часть гуманизованного гена Lag-3 содержит эндогенные экзоны 1, 5, 6, 7 и 8 Lag-3, отличные от человеческих. В некоторых вариантах осуществления экзоны 1, 5, 6, 7 и 8 эндогенного гена Lag-3, отличного от человеческого, на по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по
10 меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 98% идентичны соответствующим экзонам 1, 5, 6, 7 и 8, представленным в последовательности мРНК Lag-3 грызуна с SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах осуществления экзоны 1, 5, 6, 7 и 8 эндогенного гена Lag-3, отличного от человеческого, по сути, идентичны или идентичны соответствующим
15 экзонам 1, 5, 6, 7 и 8, представленным в последовательности мРНК Lag-3 грызуна с SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3.

[0011] В некоторых вариантах осуществления человеческая часть (или человеческая последовательность) гуманизованного полипептида Lag-3 содержит один или более Ig-подобных доменов человеческого полипептида LAG-3, ответственных за связывание
20 лиганда (например, связывание МНС класса II). В некоторых вариантах осуществления человеческая часть гуманизованного полипептида Lag-3 содержит первые два полных или неполных Ig-подобных домена (D1 и D2) человеческого полипептида LAG-3. В некоторых вариантах осуществления в пределах аминокислотных остатков 21-260, 23-260 или 29-260 человеческого полипептида LAG-3. В некоторых вариантах осуществления
25 человеческая часть гуманизованного полипептида Lag-3 содержит аминокислоты 29-260 (или 23-260 или 21-260) человеческого полипептида LAG-3. В некоторых вариантах осуществления человеческая часть (или человеческая последовательность) полипептида Lag-3 содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере
30 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 98% идентична соответствующей аминокислотной последовательности, представленной в человеческом полипептиде LAG-3 с SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления человеческая часть (или человеческая последовательность) полипептида Lag-3 содержит
35 аминокислотную последовательность, по сути, идентичную или идентичную соответствующей аминокислотной последовательности, представленной в человеческом полипептиде LAG-3 с SEQ ID NO: 6.

[0012] В некоторых вариантах осуществления человеческая часть (или человеческая последовательность) гуманизованного гена Lag-3 кодирует по меньшей мере
40 аминокислоты 29-260 (или 23-260 или 21-260) человеческого полипептида LAG-3. В некоторых вариантах осуществления человеческая часть (или человеческая последовательность) гуманизованного гена Lag-3 содержит экзоны 2- 4 (или экзоны 2, 3 и 4) гена LAG-3 человека.

[0013] В некоторых вариантах осуществления экзоны 2-4 гена LAG-3 человека по
45 меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 55%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 98% идентичны соответствующим экзонам 2-4, представленным

в последовательности мРНК LAG-3 человека с SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления экзоны 2-4 гена LAG-3 человека, по сути, идентичны или идентичны соответствующим экзонам 2-4, представленным в последовательности мРНК LAG-3 человека с SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления человеческая часть гуманизированного гена Lag-3 содержит последовательность, подвергнутую оптимизации кодонов для экспрессии в животном, отличном от человека, как описано в данном документе.

[0014] В некоторых вариантах осуществления полипептид Lag-3, который содержит человеческую часть и эндогенную часть, кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, помещенной в эндогенный локус (или ген) Lag-3, описанный в данном документе.

[0015] В некоторых вариантах осуществления эндогенная часть полипептида Lag-3 кодируется эндогенными экзонами 1, 5, 6, 7 и 8 Lag-3.

[0016] В некоторых вариантах осуществления гуманизированный ген Lag-3 содержит эндогенный экзон 1 Lag-3, отличный от человеческого, экзоны 2-4 LAG-3 человека и экзоны 5-8 Lag-3, отличные от человеческих, где отличные от человеческих и человеческие экзоны функционально связаны друг с другом и с эндогенным отличным от человеческого промотором Lag-3. В некоторых вариантах осуществления такой гуманизированный ген Lag-3 размещен в эндогенном локусе Lag-3.

[0017] В некоторых вариантах осуществления гуманизированный ген Lag-3 кодирует гуманизированный полипептид Lag-3, содержащий сигнальный пептид, который, по сути, идентичен сигнальному пептиду эндогенного полипептида Lag-3, отличного от человеческого; внеклеточный домен, который содержит человеческую часть и часть, отличную от человеческой, где человеческая часть содержит первые два Ig-подобных домена (например, последовательность, содержащую аминокислоты 26-290) человеческого полипептида LAG-3, а часть, отличная от человеческой, содержит последние два Ig-подобных домена эндогенного полипептида Lag-3, отличного от человеческого; и трансмембранные и внутриклеточные домены эндогенного полипептида Lag-3, отличного от человеческого.

[0018] В некоторых вариантах осуществления предусмотрен полипептид Lag-3, продуцируемый или экспрессируемый животным, отличным от человека, описанным в данном документе. В некоторых вариантах осуществления полипептид Lag-3, продуцируемый или экспрессируемый животным, отличным от человека, описанным в данном документе, транслируется в клетке животного, отличного от человека, с полным или неполным сигнальным пептидом, отличным от человеческого, (например, химерным сигнальным пептидом). В некоторых вариантах осуществления полипептид Lag-3, продуцируемый или экспрессируемый животным, отличным от человека, описанным в данном документе, содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 98% идентична аминокислотной последовательности, представленной в гуманизированном полипептиде Lag-3 с SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления полипептид Lag-3, продуцируемый или экспрессируемый животным, отличным от человека, описанным в данном документе, содержит аминокислотную последовательность, по сути, идентичную или идентичную аминокислотной последовательности, представленной в гуманизированном полипептиде Lag-3 с SEQ ID NO: 8.

[0019] В некоторых вариантах осуществления предусмотрена выделенная клетка или ткань, отличная от человеческой, геном которой содержит ген (или локус) Lag-3, описанный в данном документе. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой лимфоцит. В некоторых вариантах осуществления клетка выбрана из В-клетки, дендритной клетки, макрофага, моноцита и Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления ткань выбрана из жировой ткани, ткани мочевого пузыря, головного мозга, молочной железы, костного мозга, глаза, сердца, кишечника, почки, печени, легкого, лимфатического узла, мышцы, поджелудочной железы, плазмы крови, сыворотки крови, кожи, селезенки, желудка, вилочковой железы, яичка, яйцеклетки и их комбинации.

[0020] В некоторых вариантах осуществления предусмотрена иммортализируемая клетка, созданная, образованная или полученная из выделенной клетки, отличной от человеческой, описанной в данном документе.

[0021] В некоторых вариантах осуществления предусмотрена эмбриональная стволовая клетка (ES), отличная от человеческой, геном которой содержит ген (или локус) Lag-3, описанный в данном документе. В некоторых вариантах осуществления эмбриональная стволовая клетка, отличная от человеческой, представляет собой эмбриональную стволовую клетку грызуна. В некоторых определенных вариантах осуществления эмбриональная стволовая клетка грызуна представляет собой эмбриональную стволовую клетку мыши и получена из линии 129, линии C57BL или их помеси. В некоторых определенных вариантах осуществления эмбриональная стволовая клетка грызуна представляет собой эмбриональную стволовую клетку мыши и является помесью линий 129 и C57BL. В некоторых вариантах осуществления предусмотрена ES-клетка, отличная от человеческой, описанная в данном документе, которая содержит любую из SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14 и SEQ ID NO: 15.

[0022] В некоторых вариантах осуществления предусмотрено применение эмбриональной стволовой клетки, отличной от человеческой, описанной в данном документе, для получения животного, отличного от человека. В некоторых определенных вариантах осуществления эмбриональная стволовая клетка, отличная от человеческой, представляет собой эмбриональную стволовую клетку мыши и применяется для получения мыши, содержащей гуманизированный ген (или локус) Lag-3, описанный в данном документе. В некоторых определенных вариантах осуществления эмбриональная стволовая клетка, отличная от человеческой, представляет собой эмбриональную стволовую клетку крысы и применяется для получения крысы, содержащей гуманизированный ген (или локус) Lag-3, описанный в данном документе.

[0023] В некоторых вариантах осуществления предусмотрен эмбрион, отличный от человеческого, содержащий эмбриональную стволовую клетку, отличную от человеческой, описанную в данном документе, созданный из нее, полученный из нее или образованный из нее. В некоторых определенных вариантах осуществления эмбрион, отличный от человеческого, представляет собой эмбрион грызуна; в некоторых вариантах осуществления эмбрион мыши; в некоторых вариантах осуществления эмбрион крысы.

[0024] В некоторых вариантах осуществления предусмотрено применение эмбриона, отличного от человеческого, описанного в данном документе, для получения животного, отличного от человека. В некоторых определенных вариантах осуществления эмбрион, отличный от человеческого, представляет собой эмбрион мыши и применяется для получения мыши, содержащей гуманизированный ген (или локус) Lag-3, описанный в

данном документе. В некоторых определенных вариантах осуществления эмбрион, отличный от человеческого, представляет собой эмбрион крысы и применяется для получения крысы, содержащей гуманизированный ген (или локус) Lag-3, описанный в данном документе.

5 [0025] В некоторых вариантах осуществления предусмотрен набор, содержащий выделенную клетку или ткань, отличную от человеческой, описанную в данном документе, иммортализованную клетку, описанную в данном документе, эмбриональную стволовую клетку, отличную от человеческой, описанную в данном документе, эмбрион, отличный от человеческого, описанный в данном документе, или
10 животное, отличное от человека, описанное в данном документе.

[0026] В некоторых вариантах осуществления предусмотрен набор, описанный в данном документе, для применения в производстве и/или разработке лекарственного средства (например, антитела или его антиген-связывающего фрагмента) для терапии или диагностики.

15 [0027] В некоторых вариантах осуществления предусмотрен набор, описанный в данном документе, для применения в производстве и/или разработке лекарственного средства (например, антитела или его антиген-связывающего фрагмента) для лечения, профилактики или улучшения заболевания, нарушения или состояния.

[0028] В некоторых вариантах осуществления предусмотрен трансген, конструкция нуклеиновой кислоты, ДНК-конструкция или вектор для целенаправленного воздействия, описанные в данном документе. В некоторых определенных вариантах осуществления трансген, конструкция нуклеиновой кислоты, ДНК-конструкция или вектор для целенаправленного воздействия содержит полный или неполный ген (локус) Lag-3, описанный в данном документе. В некоторых определенных вариантах осуществления трансген, конструкция нуклеиновой кислоты, ДНК-конструкция или вектор для целенаправленного воздействия содержит фрагмент ДНК, который содержит полный или неполный ген (или локус) Lag-3, описанный в данном документе. В некоторых определенных вариантах осуществления трансген, конструкция нуклеиновой кислоты, ДНК-конструкция или вектор для целенаправленного воздействия содержит ген (или локус) Lag-3, содержащий любую из SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14 и SEQ ID NO: 15. В некоторых определенных вариантах осуществления трансген, конструкция нуклеиновой кислоты, ДНК-конструкция или вектор для целенаправленного воздействия дополнительно содержит один или более селективных маркеров. В некоторых определенных вариантах осуществления трансген, конструкция нуклеиновой кислоты, ДНК-конструкция или вектор для целенаправленного воздействия дополнительно содержит один или более сайтов для сайт-специфической рекомбинации (например, loxP, Frt или их комбинации). В некоторых определенных вариантах осуществления трансген, конструкция нуклеиновой кислоты, ДНК-конструкция или вектор для целенаправленного воздействия
20 изображены на фигуре 3.

[0029] В некоторых вариантах осуществления предусмотрено применение трансгена, конструкции нуклеиновой кислоты, ДНК-конструкции или вектора для целенаправленного воздействия, описанного в данном документе, для получения эмбриональной стволовой клетки, отличной от человеческой, клетки, отличной от человеческой, эмбриона, отличного от человеческого, и/или животного, отличного от человека.

[0030] В некоторых вариантах осуществления предусмотрен способ получения животного, отличного от человека, которое экспрессирует полипептид Lag-3 из

эндогенного гена Lag-3, где полипептид Lag-3 содержит человеческую последовательность, при этом способ предусматривает (а) помещение геномного фрагмента в эндогенный ген Lag-3 в эмбриональной стволовой клетке, отличной от человеческой, при этом указанный геномный фрагмент содержит нуклеотидную последовательность, которая кодирует полный или неполный человеческий полипептид Lag-3; (b) получение эмбриональной стволовой клетки, отличной от человеческой, образованной в (а); и (с) создание животного, отличного от человека, с применением эмбриональной стволовой клетки, отличной от человеческой, из (b).

[0031] В некоторых вариантах осуществления способа получения животного, отличного от человека, которое экспрессирует полипептид Lag-3 из эндогенного гена Lag-3, способ дополнительно предусматривает стадию помещения геномного фрагмента в эндогенный ген Pdc1 эмбриональной стволовой клетки, отличной от человеческой, из (а), при этом указанный геномный фрагмент содержит нуклеотидную последовательность, которая кодирует полный или неполный человеческий полипептид PD-1. В некоторых вариантах осуществления способа получения животного, отличного от человека, которое экспрессирует полипептид Lag-3 из эндогенного гена Lag-3, геномный фрагмент, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую полный или неполный человеческий полипептид PD-1, помещают в эндогенный ген Pdc1 эмбриональной стволовой клетки, отличной от человеческой, из (а) перед помещением геномного фрагмента, который содержит нуклеотидную последовательность, которая кодирует полный или неполный человеческий полипептид Lag-3, в эндогенный ген Lag-3, одновременно с этим или после этого. В некоторых вариантах осуществления способа получения животного, отличного от человека, которое экспрессирует полипептид Lag-3 из эндогенного гена Lag-3, способ дополнительно предусматривает скрещивание животного, отличного от человека, из (с) со вторым животным, отличным от человека, где указанное второе животное, отличное от человека имеет геном, содержащий ген Pdc1, который кодирует полипептид PD-1, содержащий человеческую часть и эндогенную часть.

[0032] В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность содержит экзоны 2-4 человеческого Lag-3. В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность кодирует по меньшей мере аминокислоты 29-260 (или 23-260 или 21-260) человеческого полипептида LAG-3. В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность содержит один или более селективных маркеров. В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность содержит один или более сайтов сайт-специфической рекомбинации.

[0033] В некоторых вариантах осуществления предусмотрен способ получения животного, отличного от человека, геном которого содержит ген Lag-3, который кодирует полипептид Lag-3, имеющий человеческую часть и эндогенную часть, при этом способ предусматривает модифицирование генома животного, отличного от человека, таким образом, чтобы он содержал ген Lag-3, который кодирует полипептид Lag-3, имеющий человеческую часть и эндогенную часть, причем эти части функционально связаны с отличным от человеческого промотором Lag-3 с получением тем самым указанного животного, отличного от человека.

[0034] В некоторых вариантах осуществления способа получения животного, отличного от человека, геном которого содержит ген Lag-3, который кодирует полипептид Lag-3, имеющий человеческую часть и эндогенную часть, ген Lag-3 модифицируют с включением экзонов 2-4 (или экзонов 2, 3 и 4) гена LAG-3 человека. В некоторых вариантах осуществления способа получения животного, отличного от

человека, геном которого содержит ген Lag-3, который кодирует полипептид Lag-3, имеющий человеческую часть и эндогенную часть, ген Lag-3 модифицируют для кодирования по меньшей мере аминокислот 29-260 (или 23-260 или 21-260) человеческого полипептида LAG-3.

5 [0035] В некоторых вариантах осуществления способа получения животного, отличного от человека, геном которого содержит ген Lag-3, который кодирует полипептид Lag-3, имеющий человеческую часть и эндогенную часть, способ дополнительно предусматривает модифицирование генома животного, отличного от человека, таким образом, чтобы он содержал ген Pcd1, который кодирует полипептид
10 PD-1, содержащий человеческую часть и эндогенную часть. В некоторых вариантах осуществления способа получения животного, отличного от человека, геном которого содержит ген Lag-3, который кодирует полипептид Lag-3, имеющий человеческую часть и эндогенную часть, модифицирование генома животного, отличного от человека, таким образом, чтобы он содержал ген Pcd1, который кодирует полипептид PD-1,
15 содержащий человеческую часть и эндогенную часть, проводят до модифицирования генома животного, отличного от человека, таким образом, чтобы он содержал ген Lag-3, который кодирует полипептид Lag-3, имеющий человеческую часть и эндогенную часть, одновременно с этим или после этого. В некоторых вариантах осуществления способа получения животного, отличного от человека, геном которого содержит ген
20 Lag-3, который кодирует полипептид Lag-3, имеющий человеческую часть и эндогенную часть, способ дополнительно предусматривает скрещивание животного, отличного от человека, геном которого содержит ген Lag-3, который кодирует полипептид Lag-3, имеющий человеческую часть и эндогенную часть, со вторым животным, отличным от человека, где указанное второе животное, отличное от человека, имеет геном,
25 содержащий ген Pcd1, который кодирует полипептид PD-1, содержащий человеческую часть и эндогенную часть.

[0036] В некоторых вариантах осуществления предусмотрено животное, отличное от человека, получаемое (созданное, полученное или образованное) по любому из способов, описанных в данном документе.

30 [0037] В некоторых вариантах осуществления предусмотрен способ оценки противоопухолевой эффективности лекарственного средства, целенаправленно воздействующего на человеческий LAG-3, при этом способ предусматривает стадии введения лекарственного средства животному, отличному от человека, описанному в данном документе, и проведения анализа для определения одного или более
35 противоопухолевых свойств лекарственного средства, целенаправленного воздействующего на человеческий LAG-3.

[0038] В некоторых вариантах осуществления предусмотрен способ оценки фармакокинетических свойств лекарственного средства, целенаправленно воздействующего на человеческий LAG-3, при этом способ предусматривает стадии
40 введения лекарственного средства животному, отличному от человека, описанному в данном документе, и проведения анализа для определения одного или более фармакокинетических свойств лекарственного средства, целенаправленного воздействующего на человеческий LAG-3.

[0039] В некоторых вариантах осуществления лекарственное средство,
45 целенаправленно воздействующее на человеческий LAG-3, представляет собой антагонист Lag-3. В некоторых вариантах осуществления лекарственное средство, целенаправленно воздействующее на человеческий LAG-3, представляет собой агонист Lag-3. В некоторых вариантах осуществления лекарственное средство, целенаправленно

воздействующее на человеческий LAG-3, представляет собой антитело к Lag-3.

[0040] В некоторых вариантах осуществления лекарственное средство, целенаправленно воздействующее на человеческий LAG-3, вводят животному, отличному от человека, описанному в данном документе, внутривенно, внутривентально или

5 подкожно.

[0041] В некоторых вариантах осуществления предусмотрено животное, отличное от человека, геном которого содержит ген Lag-3, который содержит эндогенную часть, содержащую эндогенные экзоны 1, 5, 6, 7 и 8 из Lag-3, и человеческую часть, содержащую

10

части функционально связаны с эндогенным отличным от человеческого промотором Lag-3 и где животное, отличное от человека, экспрессирует полипептид Lag-3, содержащий аминокислоты 29-260 (или 23-260 или 21-260) человеческого полипептида LAG-3.

[0042] В некоторых вариантах осуществления предусмотрена модель опухоли у

15

животного, отличного от человека, где животное, отличное от человека, экспрессирует полипептид Lag-3 и/или PD-1, описанные в данном документе.

[0043] В некоторых вариантах осуществления предусмотрена модель опухоли у животного, отличного от человека, где животное, отличное от человека, имеет геном, содержащий ген Lag-3 и/или Pdcd1, описанные в данном документе.

20

[0044] В некоторых вариантах осуществления предусмотрена модель опухоли у животного, отличного от человека, полученная путем (а) обеспечения животного, отличного от человека, геном которого содержит ген Lag-3 и/или Pdcd1, описанные в данном документе; и (b) имплантации одной или более опухолевых клеток животному, отличному от человека, из (а); с обеспечением тем самым указанной модели

25

опухоли у животного, отличного от человека.

[0045] В некоторых вариантах осуществления предусмотрено животное, отличное от человека, или клетка, отличная от человеческой, описанные в данном документе, для применения в производстве и/или разработке лекарственного средства для терапии или диагностики.

30

[0046] В некоторых вариантах осуществления предусмотрено животное, отличное от человека, или клетка, отличная от человеческой, описанные в данном документе, для применения в производстве лекарственного препарата для лечения, предупреждения или уменьшения тяжести заболевания, нарушения или состояния.

[0047] В некоторых вариантах осуществления предусмотрено применение животного, отличного от человека, или клетки, отличной от человеческой, описанных в данном документе, для производства и/или разработки лекарственного средства или вакцины для применения в медицине, как, например, для применения в качестве лекарственного

35

препарата.

[0048] В некоторых вариантах осуществления предусмотрено применение животного, отличного от человека, или клетки, отличной от человеческой, описанных в данном документе, в производстве лекарственного препарата для лечения заболевания, нарушения или состояния.

40

[0049] В некоторых вариантах осуществления предусмотрено применение животного, отличного от человека, или клетки, отличной от человеческой, описанных в данном документе, в производстве и/или разработке антитела, которое связывает молекулу контрольной точки иммунного ответа.

45

[0050] В некоторых вариантах осуществления заболевание, нарушение или состояние, описанные в данном документе, представляет собой рак или новообразование. В

некоторых вариантах осуществления заболевание, нарушение или состояние, описанные в данном документе, представляет собой аутоиммунное (или воспалительное) заболевание, нарушение или состояние. В некоторых вариантах осуществления заболевание, нарушение или состояние, описанные в данном документе, представляет собой инфекционное заболевание, нарушение или состояние.

[0051] В различных вариантах осуществления отличный от человеческого промотор Lag-3 представляет собой или содержит эндогенный, отличный от человеческого промотор Lag-3.

[0052] В различных вариантах осуществления человеческая часть (или человеческая последовательность или нуклеотидная последовательность) гена Lag-3 или Pdc1, описанных в данном документе, представляет собой или содержит последовательность, подвергнутую оптимизации кодонов для экспрессии в животном, отличном от человека (или клетке, или ткани, отличной от человеческой), описанном в данном документе.

[0053] В различных вариантах осуществления животное, отличное от человека (или клетка, или ткань, отличная от человеческой, или эмбриональная стволовая клетка, отличная от человеческой, или эмбрион, отличный от человеческого), описанное в данном документе, дополнительно экспрессирует гуманизированный полипептид PD-1, где данный гуманизированный полипептид PD-1 содержит человеческую часть и эндогенную часть. В некоторых вариантах осуществления человеческая часть полипептида PD-1, по сути, содержит внеклеточный домен человеческого полипептида PD-1; и в конкретных вариантах осуществления человеческая часть содержит аминокислоты 21-170, 26-169, 27-169, 27-145 или 35-145 человеческого полипептида PD-1. В некоторых вариантах осуществления эндогенная часть полипептида PD-1 содержит внутриклеточную часть и/или трансмембранную часть эндогенного полипептида PD-1; в некоторых вариантах осуществления эндогенная часть полипептида PD-1 содержит внутриклеточный домен эндогенного полипептида PD-1, и в определенных вариантах осуществления эндогенная часть полипептида PD-1 дополнительно, по сути, содержит трансмембранный домен эндогенного полипептида PD-1.

[0054] В различных вариантах осуществления геном животного, отличного от человека (или клетки, или ткани, отличной от человеческой, или эмбриональной стволовой клетки, отличной от человеческой, или эмбриона, отличного от человеческого), описанного в данном документе, дополнительно содержит ген Pdc1, содержащий эндогенную часть и человеческую часть, где эндогенная и человеческая части функционально связаны с отличным от человеческого промотором Pdc1. В некоторых вариантах осуществления эндогенная часть гена Pdc1 содержит эндогенные экзоны 1, 4 и 5 Pdc1. В некоторых вариантах осуществления эндогенная часть гена Pdc1 дополнительно содержит полный или неполный эндогенный экзон 3 Pdc1, например 3'-часть эндогенного экзона 3, которая кодирует аминокислоты, являющиеся частью трансмембранного домена эндогенного полипептида PD-1. В некоторых вариантах осуществления человеческая часть гена Pdc1 кодирует аминокислоты 35-145, 27-145, 27-169, 26-169 или 21-170 человеческого полипептида PD-1. В некоторых вариантах осуществления человеческая часть гена Pdc1 содержит экзон 2 гена PDCD1 человека; в некоторых определенных вариантах осуществления дополнительно содержит полный или неполный человеческий экзон 3 PDCD1, например, 5'-часть человеческого экзона 3, которая кодирует аминокислоты, являющиеся частью внеклеточного домена человеческого полипептида PD-1. В конкретных вариантах осуществления гуманизированный ген Pdc1 животного, отличного от человека, содержит экзон 1 эндогенного гена Pdc1 животного, отличного от человека, экзон 2 и часть экзона 3

(например, 5'-часть экзона 3, которая кодирует аминокислоты, являющиеся частью внеклеточного домена) гена PDCD1 человека, после которого следует часть экзона 3 (например, 3'-часть экзона 3, которая кодирует аминокислоты, являющиеся частью трансмембранного домена) и экзоны 4-5 эндогенного отличного от человеческого гена Pdc1.

[0055] В различных вариантах осуществления отличный от человеческого промотор Pdc1 представляет собой или содержит эндогенный, отличный от человеческого промотор Pdc1.

[0056] В различных вариантах осуществления человеческая часть гена Lag-3 кодирует аминокислотную последовательность иммуноглобулиноподобных (Ig-подобных) доменов 1 (D1) и 2 (D2) человеческого полипептида LAG-3, или кодирует аминокислотную последовательность человеческого полипептида LAG-3, которая отвечает за связывание МНС II.

[0057] В различных вариантах осуществления человеческая часть полипептида Lag-3 содержит аминокислотную последовательность иммуноглобулиноподобных (Ig-подобных) доменов 1 (D1) и 2 (D2) человеческого полипептида LAG-3, или содержит аминокислотную последовательность человеческого полипептида LAG-3, которая отвечает за связывание МНС II.

[0058] В различных вариантах осуществления животное, отличное от человека, описанное в данном документе, представляет собой грызуна; в некоторых вариантах осуществления мышшь; в некоторых вариантах осуществления крысу. В некоторых вариантах осуществления мышшь, описанная в данном документе, выбрана из группы, состоящей из линии 129, линии BALB/C, линии C57BL/6 и линии смешанного происхождения 129xC57BL/6; в некоторых определенных вариантах осуществления линии C57BL/6.

[0059] Используемые в данной заявке термины «приблизительно» и «примерно» используются в качестве эквивалентов. Предполагается, что все числа, используемые в данной заявке, вместе с термином «приблизительно/примерно» или без него охватывают любые нормальные отклонения, понятные специалисту в соответствующей области.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

[0060] Графические материалы, включенные в данный документ, которые содержат следующие фигуры, приведены только в иллюстративных целях, а не для ограничения.

[0061] На фигуре 1 показана схема геномной организации отличного от человеческого (например, мышшиного) и человеческого генов активации лимфоцитов-3 (Lag-3) без соблюдения масштаба. Экзоны пронумерованы над или под каждым экзонам. Нетранслируемые участки (незакрашенные рамки) также указаны для каждого гена. Иммуноглобулиноподобные домены указаны с помощью заштрихованных рамок и символической аббревиатуры «Ig» над кодирующими экзонами без соблюдения масштаба.

[0062] На фигуре 2 показано выравнивание типичных аминокислотных последовательностей человеческого LAG-3 (hLAG3) (SEQ ID NO: 6), мышшиного Lag-3 (mLag3) (SEQ ID NO: 4) и гуманизированного Lag-3 (HumLAG3) (SEQ ID NO: 8). Звездочки указывают на иммуноглобулиноподобные (Ig-подобные) домены, а подчеркнутый текст обозначает аминокислоты, кодируемые вставленными человеческими экзонами (т.е. экзонами 2, 3 и 4) LAG-3. Ig-подобные домены 1 (D1) и 2 (D2) разделяются одной аминокислотой, обозначенной косой чертой под последовательностью.

[0063] На фигуре 3 показана схема иллюстративного способа гуманизации гена

активации лимфоцитов-3 (Lag-3), отличного от человеческого, без соблюдения масштаба. Выбранные места соединения нуклеотидов отмечены линией под каждым соединением и каждое указано с помощью SEQ ID NO.

[0064] На фигуре 4 показана схема геномной организации мышинового и человеческого генов активации лимфоцитов-3 (Lag-3) без соблюдения масштаба, на которой указаны примерные местоположения зондов, используемых в анализе, описанном в примере 1.

[0065] На фигуре 5 показаны типичные гистограммы активированных спленоцитов от C57BL/6 дикого типа (дикий тип), гомозиготных гуманизированных Lag-3 (HumLAG-3), гомозиготных гуманизированных PD-1 (HumPD-1) и гомозиготных дважды гуманизированных Lag-3xPD-1 (HumPD-1xLAG-3) мышей, окрашенных антителами к человеческому LAG-3, человеческому PD-1, мышинному Lag-3 и мышинному PD-1, или окрашенных соответствующим изотопическим контрольным антителом. Положительное окрашивание обозначено закрашенными кривыми, а окрашивание изотопическими контрольными антителами обозначено незакрашенными кривыми. Все профили окрашивания представляют клетки в пределах гейтирования по CD4⁺. Средняя интенсивность флуоресценции (MFI) при окрашивании антителами на CD4⁺ Т-клеток указана для каждой гистограммы (верхняя строка: экспрессия человеческого LAG-3, 2-я строка: экспрессия мышинового Lag-3, 3-я строка: экспрессия человеческого PD-1, нижняя строка: экспрессия мышинового PD-1). Генотип мышей указан в верхней части каждой колонки. Для гуманизированных мышей PD-1 см. заявку на патент США с порядковым №14/744592, поданную 19 июня 2015 г., и международную заявку на патент №PCT/US15/036649, поданную 19 июня 2015 г.; каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки.

[0066] На фигуре 6 показан типичный средний объем опухоли (мм³±SEM) в течение 35 дней в различных группах лечения дважды гуманизированных мышей Lag-3/PD-1 (контроль, круг: человеческое изотопическое контрольное антитело, не специфическое для мышинового или человеческого LAG-3 или мышинового или человеческого PD-1; антитело к LAG3, ромб: антитело к человеческому LAG-3; антитело к PD1, шестиугольник: антитело к человеческому PD-1). Стрелки указывают на дни обработки антителами.

[0067] На фигуре 7 показаны средние объемы опухоли (мм³±SEM) в различных группах обработки дважды гуманизированных мышей Lag-3/PD-1 в различные моменты времени после имплантации опухоли в эксперименте по оценке эффективности антитела к LAG3 отдельно и в комбинации с антителом к человеческому PD-1 против развившихся опухолей MC38 (контроль, круг: человеческое изотопическое контрольное антитело, не специфическое для мышинового или человеческого LAG-3 или мышинового или человеческого PD-1; антитело к LAG3, ромб: антитело к человеческому LAG-3; антитело к PD1, шестиугольник: антитело к человеческому PD-1; антитело к LAG3 + антитело к PD-1, треугольник: комбинация антитела к человеческому LAG-3 и антитела к человеческому PD-1). Дни обработки указаны стрелками.

[0068] На фигуре 8 показаны иллюстративные последовательности гена активации лимфоцитов-3 (Lag-3) грызунов (например, крысы и мыши), человека и гуманизированные последовательности, а также иллюстративный фрагмент синтетической ДНК для гуманизации гена Lag-3, отличного от человеческого. В последовательностях мРНК кодирующая последовательность указана жирным шрифтом, а последовательные экзоны в тех случаях, когда они указаны, разделены чередующимся подчеркнутым текстом; в гуманизированных последовательностях

мРНК человеческие последовательности заключены в круглые скобки. Для аминокислотных последовательностей трансмембранные последовательности указаны подчеркнутым шрифтом; в гуманизированных аминокислотных последовательностях человеческие последовательности указаны жирным шрифтом и заключены в круглые

5

[0069] На фигурах 9А - 9D показаны последовательности соединения в определенном иллюстративном гуманизированном локусе Lag-3. На фигуре 9А показана нуклеотидная последовательность (SEQ ID NO: 12), охватывающая расположенную выше от точки вставки часть, которая указывает на эндогенную мышиную последовательность (заключенную в круглые скобки ниже), смежную с человеческой геномной последовательностью LAG-3 в точке вставки. На фигуре 9В показана нуклеотидная последовательность (SEQ ID NO: 13), охватывающая расположенную на 5'-конце самоуудаляющейся кассеты для отбора по устойчивости к неомицину часть, которая указывает на человеческую геномную последовательность LAG-3, смежную с последовательностью кассеты (ниже заключенной в круглые скобки с выделенным курсивом SalI-XhoI-совместимым концом и выделенной жирным шрифтом последовательностью loxP) ниже точки вставки. На фигуре 9С показана нуклеотидная последовательность (SEQ ID NO: 14), охватывающая расположенную ниже от точки вставки часть на 3'-конце самоуудаляющейся кассеты для отбора по устойчивости к неомицину, которая указывает на последовательность кассеты (ниже заключенную в круглые скобки с выделенным жирным шрифтом сайтом loxP, выделенным подчеркиванием сайтом распознавания I-CeuI и выделенным курсивом сайтом распознавания NheI), смежную с мышиную геномную последовательность Lag-3. На фигуре 9D показана нуклеотидная последовательность (SEQ ID NO: 15), охватывающая расположенную выше от точки вставки часть после делеции кассеты для отбора по чувствительности к неомицину (при оставшихся 77 п. о. в интроне 4), которая указывает на мышиную и человеческую геномные последовательности, расположенные рядом с оставшейся частью последовательности кассеты последовательностью loxP (ниже заключенными в круглые скобки с выделенным курсивом SalI-XhoI-совместимым концом, выделенным жирным шрифтом сайтом loxP, выделенным подчеркиванием сайтом рестрикции I-CeuI и выделенным курсивом сайтом рестрикции NheI).

10

15

20

25

30

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

[0070] Настоящее изобретение не ограничено конкретными способами и условиями эксперимента, описанными в данном документе, поскольку такие способы и условия могут изменяться. Также следует понимать, что терминология, используемая в данном документе, предназначена только для целей описания конкретных вариантов осуществления и не предназначена быть ограничивающей, поскольку объем настоящего изобретения определяется формулой изобретения.

35

[0071] Если не определено иное, все термины и фразы, используемые в данном документе, имеют значения, которые данные термины и фразы приобрели в данной области, если в контексте, в котором используется термин или фраза, четко не указано или четко не видно противоположное. Хотя при практическом осуществлении или испытании настоящего изобретения можно применять любые способы и материалы, сходные с описанными в данном документе или эквивалентные им, в данном документе описаны только конкретные способы и материалы. Все патентные и непатентные публикации, упомянутые в данном документе, включены в данный документ посредством ссылки.

40

45

[0072] Примерно, применяемое в данном документе в отношении одного или более

значений, представляющих интерес, включает в себя значение, сходное с указанным эталонным значением. В определенных вариантах осуществления термин «примерно» или «приблизительно» включает диапазон значений, находящихся в пределах 25%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% или меньше в любую сторону (большую или меньшую) от указанного эталонного значения, если иное не указано или иное не очевидно из контекста (за исключением случаев, в которых такое число будет превышать 100% от возможного значения).

[0073] Биологически активный, используемый в данном документе, включает характеристику любого средства, обладающего активностью в биологической системе *in vitro* или *in vivo* (например, в организме). Например, средство, которое в случае присутствия в организме обладает биологическим эффектом в этом организме, считается биологически активным. В конкретных вариантах осуществления, в которых белок или полипептид является биологически активным, часть этого белка или полипептида, обладающая по меньшей мере одним общим с данным белком или полипептидом видом биологической активности, обычно называется «биологически активной» частью.

[0074] Сравнимый, используемый в данном документе, включает два или более средств, объектов, ситуаций, наборов условий и т.д., которые могут не быть идентичными друг другу, но которые являются достаточно сходными для обеспечения возможности сравнения между ними, вследствие чего на основании наблюдаемых различий или сходств можно обосновано сделать выводы. Специалисту в данной области будет понятно из контекста, какая степень идентичности необходима в любых заданных обстоятельствах для двух или более таких средств, объектов, ситуаций, наборов условий и т.д., чтобы считать их сравнимыми.

[0075] Консервативный, используемый в данном документе для описания консервативной аминокислотной замены, включает замену аминокислотного остатка другим аминокислотным остатком, имеющим R-группу боковой цепи со сходными химическими свойствами (например, зарядом или гидрофобностью). Как правило, консервативная аминокислотная замена практически не будет изменять функциональные свойства белка, представляющие интерес, например, способность рецептора связываться с лигандом. Примеры групп аминокислот, которые имеют боковые цепи со сходными химическими свойствами, включают: алифатические боковые цепи, такие как у глицина, аланина, валина, лейцина и изолейцина; алифатические боковые цепи с гидроксильными группами, такие как у серина и треонина; амидосодержащие боковые цепи, такие как у аспарагина и глутамина; ароматические боковые цепи, такие как у фенилаланина, тирозина и триптофана; основные боковые цепи, такие как у лизина, аргинина и гистидина; кислые боковые цепи, такие как у аспарагиновой кислоты и глутаминовой кислоты; и серосодержащие боковые цепи, такие как у цистеина и метионина. Группы консервативных аминокислотных замен включают, например, валин/лейцин/изолейцин, фенилаланин/тирозин, лизин/аргинин, аланин/валин, глутамат/аспартат и аспарагин/глутамин. В некоторых вариантах осуществления консервативная аминокислотная замена может представлять собой замену любого нативного остатка в белке аланином, применяемую, например, в аланин-сканирующем мутагенезе. В некоторых вариантах осуществления проводят консервативную замену, которая имеет положительное значение в матрице логарифмической функции правдоподобия PAM250, раскрытой в Gonnet et al. (1992) Exhaustive Matching of the Entire Protein Sequence Database, Science 256: 1443-45, включенной в данный документ посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления замена представляет собой умеренно консервативную замену, где замена имеет неотрицательное значение в матрице логарифмической функции правдоподобия

РАМ250.

[0076] Контроль, используемый в данном документе, включает понятное в данной области значение «контроля», являющегося стандартом, с которым сравнивают результаты. Как правило, контроли применяют для повышения целостности в экспериментах путем разделения переменных для того, чтобы сделать вывод об этих переменных. В некоторых вариантах осуществления контроль представляет собой реакцию или анализ, проводимые одновременно с тестовыми реакцией или анализом для обеспечения объекта сравнения. Как используется в данном документе, «контроль» может включать «контрольное животное». «Контрольное животное» может иметь модификацию, описанную в данном документе, модификацию, отличную от описанной в данном документе, или не иметь модификации (т.е. в случае животного дикого типа). В одном эксперименте применяют «тест» (т.е. тестируемую переменную). Во втором эксперименте «контроль» (т.е. тестируемую переменную) не применяют. В некоторых вариантах осуществления контроль представляет собой исторический контроль (т.е. тест или анализ, проведенный ранее, или количество или результат, известные заранее). В некоторых вариантах осуществления контроль представляет собой или включает напечатанную или иным образом сохраненную запись. Контроль может представлять собой положительный контроль или отрицательный контроль.

[0077] Разрушение, используемое в данном документе, включает результат события гомологичной рекомбинации с молекулой ДНК (например, с эндогенной гомологичной последовательностью, такой как ген или локус гена). В некоторых вариантах осуществления разрушение может приводить к вставке, делеции, замене, замещению, миссенс-мутации или сдвигу рамки считывания в последовательности (последовательностях) ДНК или любой их комбинации или может быть представлено таковыми. Вставки могут включать вставку целых генов или фрагментов генов, например, экзонов, которые могут иметь происхождение, отличное от такого происхождения для эндогенной последовательности (например, гетерологичной последовательности). В некоторых вариантах осуществления разрушение может приводить к повышению экспрессии и/или активности гена или продукта гена (например, белка, кодируемого геном). В некоторых вариантах осуществления разрушение может приводить к снижению экспрессии и/или активности гена или продукта гена. В некоторых вариантах осуществления разрушение может приводить к изменению последовательности гена или кодируемого продукта гена (например, кодируемого белка). В некоторых вариантах осуществления разрушение может приводить к усечению или фрагментации гена или кодируемого продукта гена (например, кодируемого белка). В некоторых вариантах осуществления разрушение может приводить к удлинению гена или кодируемого продукта гена; в некоторых таких вариантах осуществления разрушение может приводить к сборке белка слияния. В некоторых вариантах осуществления разрушение может приводить к изменению уровня экспрессии, но не активности гена или продукта гена. В некоторых вариантах осуществления разрушение может приводить к изменению активности, но не уровня экспрессии гена или продукта гена. В некоторых вариантах осуществления разрушение может не оказывать значительный эффект на уровень экспрессии гена или продукта гена. В некоторых вариантах осуществления разрушение может не оказывать значительный эффект на активность гена или продукта гена. В некоторых вариантах осуществления разрушение может не оказывать значительный эффект ни на уровень экспрессии, ни на активность гена или продукта гена.

[0078] Определение, измерение, установление, оценка, анализ и анализирование

используются в данном документе взаимозаменяемо с включением любой формы измерения и включают определение присутствия или отсутствия элемента. Эти термины включают количественные, а также и/или качественные определения. Анализ может быть относительным или абсолютным. «Анализ на присутствие» может представлять собой определение количества чего-либо присутствующего и/или определение того, присутствует или отсутствует ли это.

[0079] Эндогенный локус или эндогенный ген, используемый в данном документе, включает в себя генетический локус, находящийся в родительском или эталонном организме до введения изменения, осуществления разрушения, делеции, вставки, модификации, замещения или замены, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления эндогенный локус имеет последовательность, обнаруживаемую в природе. В некоторых вариантах осуществления эндогенный локус представляет собой локус дикого типа. В некоторых вариантах осуществления эталонный организм представляет собой организм дикого типа. В некоторых вариантах осуществления эталонный организм представляет собой организм, полученный с помощью генной инженерии. В некоторых вариантах осуществления эталонный организм представляет собой организм, выведенный в лаборатории (дикого типа или сконструированный).

[0080] Эндогенный промотор, используемый в данном документе, включает в себя промотор, связанный в естественных условиях, например в организме дикого типа, с эндогенным геном.

[0081] Сконструированный: используемый в данном документе, в целом, включает аспект проведения манипуляций человеком. Например, в некоторых вариантах осуществления полинуклеотид может считаться «сконструированным» в том случае, если две или более последовательности, которые не связаны друг с другом в этом порядке в природе, подвергаются манипуляции человеком для непосредственного связывания друг с другом в сконструированном полинуклеотиде. В некоторых таких конкретных вариантах осуществления сконструированный полинуклеотид может содержать регуляторную последовательность, которая выявлена в природе в функциональной связи с первой кодирующей последовательностью, но не в функциональной связи со второй кодирующей последовательностью, соединенную человеком таким образом, что она была функционально связана со второй кодирующей последовательностью. В качестве альтернативы или дополнительно в некоторых вариантах осуществления первая и вторая последовательности нуклеиновых кислот, каждая из которых кодирует полипептидные элементы или домены, которые в природе не связаны друг с другом, могут быть связаны друг с другом в одном сконструированном полинуклеотиде. Аналогично в некоторых вариантах осуществления клетка или организм могут считаться «сконструированными» в том случае, если их обработали с тем, чтобы изменить их генетическую информацию (например, был введен новый генетический материал, который ранее не был введен, или ранее присутствующий генетический материал был изменен или удален). Как понимается специалистами в данной области и является общепринятой практикой, потомство сконструированного полинуклеотида или клетки, как правило, по-прежнему называют «сконструированным», даже если фактическую манипуляцию выполняли на предыдущем объекте. Кроме того, как будет понятно специалистам в данной области, доступны различные методологии, посредством которых можно «конструировать», как описано в данном документе. Например, в некоторых вариантах осуществления «сконструированный» может включать отбор или конструирование (например, последовательностей нуклеиновых кислот, полипептидных последовательностей, клеток, тканей и/или организмов) с

использованием компьютерных систем, запрограммированных для проведения анализа или сравнения, или иным образом для анализа, рекомендации и/или отбора последовательностей, изменений и т.д. В качестве альтернативы или дополнительно в некоторых вариантах осуществления «конструирование» может включать применение методологий химического синтеза *in vitro* и/или методик рекомбинантных нуклеиновых кислот, таких как, например, амплификация нуклеиновой кислоты (например, посредством полимеразной цепной реакции), гибридизация, мутация, трансформация, трансфекция и т.д., и/или любой из множества контролируемых методологий спаривания. Как будет понятно специалистам в данной области, множество таких общепринятых методик (например, для рекомбинантной ДНК, синтеза олигонуклеотидов и культивирования и трансформации тканей (например, электропорация, липофекция и т.д.)) хорошо известно в данной области и описано в различных общих и более специфических ссылках, которые цитируются и/или обсуждаются в настоящем описании. См., например, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989).

[0082] Ген, используемый в данном документе, содержит последовательность ДНК в хромосоме, которая кодирует продукт (например, РНК-продукт и/или полипептидный продукт). В некоторых вариантах осуществления ген содержит кодирующую последовательность (т.е. последовательность, которая кодирует конкретный продукт). В некоторых вариантах осуществления ген содержит некодирующую последовательность. В некоторых конкретных вариантах осуществления ген может содержать как кодирующую (например, экзонную), так и некодирующую (например, интронную) последовательность. В некоторых вариантах осуществления ген может содержать одну или более регуляторных последовательностей (например, промоторы, энхэнсеры и т.д.) и/или интронных последовательностей, которые, например, могут контролировать или воздействовать на один или более аспектов экспрессии генов (например, специфическую для типа клеток экспрессию, индуцируемую экспрессию и т.д.). Для ясности отметим, что используемый в настоящей заявке термин «ген» обычно включает часть нуклеиновой кислоты, которая кодирует полипептид; этот термин может необязательно охватывать регуляторные последовательности, как будет понятно из контекста специалистам в данной области. Это определение не предназначено для исключения применения термина «ген» к единицам экспрессии, не кодирующим белок, но скорее поясняет то, что в большинстве случаев термин, используемый в данном документе, включает нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид.

[0083] Гетерологичный, используемый в данном документе, включает средство или объект из другого источника. Например, при использовании по отношению к полипептиду, гену или продукту гена, присутствующему в конкретной клетке или конкретном организме, данный термин поясняет, что соответствующий полипептид, ген или продукт гена: 1) был сконструирован человеком; 2) был введен в клетку или организм (или их предшественник) человеком (например, посредством генной инженерии), и/или 3) в естественных условиях не продуцируется соответствующими клеткой или организмом (например, соответствующим типом клетки или типом организма) или не присутствует в них.

[0084] Клетка-хозяин, используемая в данном документе, включает клетку, в которую были введены гетерологичные (например, экзогенные) нуклеиновая кислота или белок. Специалистам в данной области при прочтении данного раскрытия будет понятно, что такие термины включают не только конкретную заявляемую клетку, но также используются для включения потомства такой клетки. Поскольку в последующих

поколениях вследствие влияния мутаций или окружающей среды могут происходить определенные модификации, такое потомство в действительности может не быть идентичным родительской клетке, но по-прежнему включается в объем термина «клетка-хозяин», используемого в данном документе. В некоторых вариантах осуществления

5 клетка-хозяин представляет собой или предусматривает прокариотическую или эукариотическую клетку. Как правило, клетка-хозяин представляет собой любую клетку, подходящую для приема и/или продуцирования гетерологичных нуклеиновой кислоты или белка, независимо от того, к какому царству живой природы относится клетка. Иллюстративные клетки включают клетки прокариот и эукариот

10 (одноклеточных или многоклеточных), бактериальные клетки (например, штаммы *E. coli*, *Bacillus* spp., *Streptomyces* spp. и т.д.), клетки микобактерий, клетки грибов, клетки дрожжей (например, *S. cerevisiae*, *S. pombe*, *P. pastoris*, *P. methanolica* и т.д.), растительные клетки, клетки насекомых (например, SF-9, SF-21, клетки насекомых, зараженные бакуловирусами, *Trichoplusia ni* и т.д.), клетки животных, отличных от человека, клетки

15 человека или продукты слияния клеток, такие как, например, гибридомы или квадромы. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой клетку человека, обезьяны, человекообразной обезьяны, хомяка, крысы или мыши. В некоторых вариантах осуществления клетка является эукариотической и выбрана из следующих клеток: CHO (например, CHO K1, DXB-11 CHO, Veggie-CHO), COS (например, COS-

20 7), клетки сетчатки, Vero, CV1, клетки почки (например, HEK293, 293 EBNA, MSR 293, MDCK, HaK, BHK), HeLa, HepG2, WI38, MRC 5, Colo205, HB 8065, HL-60 (например, BHK21), Jurkat, Daudi, A431 (эпидермальной), CV-1, U937, 3T3, L-клетки, клетки C127, SP2/0, NS-0, MMT 060562, клетки Сертоли, клетки BRL 3A, клетки HT1080, клетки миеломы, опухолевой клетки и линии клеток, происходящей из вышеупомянутых клеток.

25 В некоторых вариантах осуществления клетка содержит один или более вирусных генов, например, клетка сетчатки, которая экспрессирует вирусный ген (например, клетка PER.C6™). В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой или предусматривает выделенную клетку. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой часть ткани. В некоторых вариантах осуществления

30 клетка-хозяин представляет собой часть организма.

[0085] Гуманизированный: используется в данном документе в соответствии с понятным в данной области значением и включает нуклеиновые кислоты или белки, структуры (т.е. нуклеотидные или аминокислотные последовательности) которых

35 содержат части, по сути, соответствующие или идентичные структурам конкретного гена или белка, обнаруживаемого в природе у животного, отличного от человека, а также включают части, отличающиеся от обнаруживаемых в соответствующем конкретном гене или белке, отличном от человеческого, и вместо этого более близко соответствующие сравнимым структурам, обнаруживаемым в соответствующем гене или белке человека. В некоторых вариантах осуществления «гуманизированный» ген

40 представляет собой ген, который кодирует полипептид, имеющий, по сути, такую же аминокислотную последовательность, как и у полипептида человека (например, у белка человека или его части - например, у его характерной части). В виде лишь одного примера, в случае мембранного рецептора «гуманизированный» ген может кодировать полипептид, имеющий внеклеточную часть, имеющую полностью или частично такую же аминокислотную последовательность, как и у человеческой внеклеточной части, и такую же остальную часть последовательности, как и у полипептида, отличного от человеческого (например, мышинового). В некоторых вариантах осуществления гуманизированный ген содержит по меньшей мере часть последовательности ДНК

гена человека. В некоторых вариантах осуществления гуманизированный ген содержит всю последовательность ДНК гена человека. В некоторых вариантах осуществления гуманизированный белок содержит последовательность, имеющую часть, представленную в белке человека. В некоторых вариантах осуществления гуманизированный белок содержит всю последовательность белка человека и экспрессируется с эндогенного локуса животного, отличного от человека, который соответствует гомологу или ортологу гена человека.

[0086] Идентичность, используемая в данном документе применительно к сравнению последовательностей, включает идентичность, определяемую с помощью ряда различных алгоритмов, известных в данной области, которые можно применять для измерения идентичности нуклеотидных и/или аминокислотных последовательностей. В некоторых вариантах осуществления значения идентичности, описанные в данном документе, определяют с применением выравнивания ClustalW v. 1.83 (медленного), в котором используются штраф за открытие гэпа 10,0, штраф за продление гэпа 0,1, а также с применением матрицы подобия Gonnet (MACVECTOR™ 10.0.2, MacVector Inc., 2008).

[0087] *In vitro*, используемое в данном документе, включает события, которые происходят в искусственной среде, например в пробирке или реакционном сосуде, в культуре клеток и т.д., а не в многоклеточном организме.

[0088] *In vivo*, используемое в данном документе, включает события, которые происходят в многоклеточном организме, таком как человек и животное, отличное от человека. В контексте клеточных систем данный термин можно использовать с включением событий, которые происходят в живой клетке (в противоположность, например, системам *in vitro*).

[0089] Выделенный: используемое в данном документе, включает вещество и/или объект, которые были (1) отделены по меньшей мере от некоторых компонентов, с которыми они были связаны при исходном продуцировании (или в природе и/или в условиях проведения эксперимента), и/или (2) спроектированы, продуцированы, получены и/или произведены человеком. Выделенные вещества и/или объекты могут быть отделены от приблизительно 10%, приблизительно 20%, приблизительно 30%, приблизительно 40%, приблизительно 50%, приблизительно 60%, приблизительно 70%, приблизительно 80%, приблизительно 90%, приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98%, приблизительно 99% или более чем приблизительно 99% других компонентов, с которыми они были изначально связаны. В некоторых вариантах осуществления выделенные средства являются чистыми на приблизительно 80%, на приблизительно 85%, на приблизительно 90%, на приблизительно 91%, на приблизительно 92%, на приблизительно 93%, на приблизительно 94%, на приблизительно 95%, на приблизительно 96%, на приблизительно 97%, на приблизительно 98%, на приблизительно 99% или более чем на приблизительно 99%. Как используется в данном документе, вещество является «чистым», если оно по существу не содержит других компонентов. В некоторых вариантах осуществления, что будет понятно специалистам в данной области, вещество может по-прежнему считаться «выделенным» или даже «чистым» после объединения с определенными другими компонентами, такими как, например, один или более носителей или наполнителей (например, с буфером, растворителем, водой и т.д.); в таких вариантах осуществления процент выделения или чистоты вещества рассчитывают без учета таких носителей или наполнителей. В виде лишь одного примера, в некоторых

вариантах осуществления биологический полимер, такой как полипептид или полинуклеотид, встречающийся в природе, считается «выделенным», если: а) он ввиду своего происхождения или источника получения не связан с некоторыми или всеми компонентами, сопровождающими его в его нативном состоянии в природе; б) он практически не содержит других полипептидов или нуклеиновых кислот того же вида от вида, который продуцирует их в природе; или с) он экспрессируется или иным образом связан с компонентами в клетке или другой системе экспрессии, не принадлежащей к виду, который продуцирует его в природе. Таким образом, например, в некоторых вариантах осуществления полипептид, синтезируемый химическим путем или синтезируемый в другой клеточной системе, чем в системе, которая продуцирует его в природе, считается «выделенным» полипептидом. В качестве альтернативы или в дополнение в некоторых вариантах осуществления полипептид, который был подвергнут одной или более методикам очистки, может считаться «выделенным» полипептидом в той степени, в которой он был отделен от других компонентов: а) с которыми он связан в природе и/или б) с которыми он был связан при первоначальном продуцировании.

[0090] Термин «локус» или «локусы», используемый в данном документе, включает конкретное местоположение(местоположения) гена (или значительной последовательности), последовательность ДНК, последовательность, кодирующую полипептид, или положение на хромосоме генома организма. Например, «локус Lag-3» может включать конкретное местоположение гена Lag-3, последовательность ДНК Lag-3, последовательность, кодирующую Lag-3, или положение Lag-3 на хромосоме генома организма, которое было идентифицировано как такое, где находится такая последовательность. «Локус Lag-3» может содержать регуляторный элемент гена Lag-3, включая без ограничения энхансер, промотор, 5'- и/или 3'-UTR или их комбинацию. Специалисты в данной области поймут, что в некоторых вариантах осуществления хромосомы могут содержать сотни или даже тысячи генов и демонстрировать физическую совместную локализацию подобных генетических локусов при сравнении разных видов. Такие генетические локусы могут быть описаны как имеющие общую синтению.

[0091] Термин животное, отличное от человека, используемое в данном документе, включает любой позвоночный организм, который не является человеком. В некоторых вариантах осуществления животное, отличное от человека, представляет собой круглоротое, костную рыбу, хрящевую рыбу (например, акулу или ската), земноводное, пресмыкающееся, млекопитающее и птицу. В некоторых вариантах осуществления животное, отличное от человека, описанное в данном документе, представляет собой млекопитающее. В некоторых вариантах осуществления млекопитающее, отличное от человека, представляет собой примата, козу, овцу, свинью, собаку, корову или грызуна. В некоторых вариантах осуществления животное, отличное от человека, описанное в данном документе, представляет собой мелкое млекопитающее, например, из надсемейства Dipodoidea или Muroidea. В некоторых вариантах осуществления генетически модифицированное животное, описанное в данном документе, представляет собой грызуна. В некоторых вариантах осуществления грызун, описанный в данном документе, выбран из мыши, крысы и хомяка. В некоторых вариантах осуществления грызун, описанный в данном документе, выбран из надсемейства Muroidea. В некоторых вариантах осуществления генетически модифицированное животное, описанное в данном документе, относится к семейству, выбранному из Calomyscidae (например, мышевидные хомячки), Cricetidae (например, хомяки, крысы и мыши Нового света, полевки), Muridae (настоящие мыши и крысы, песчанки, иглистые мыши, косматые

хомяки), Nesomyidae (лазающие мыши, скальные мыши, белохвостые крысы, малагасийские крысы и мыши), Platanthomyidae (например, колючие соневидные хомяки) и Spalacidae (например, слепыши, бамбуковые крысы и цокоры). В некоторых определенных вариантах осуществления генетически модифицированный грызун, описанный в данном документе, выбран из настоящей мыши или крысы (семейство Muridae), песчанки, иглистой мыши и косматого хомяка. В некоторых определенных вариантах осуществления генетически модифицированная мышь, описанная в данном документе, является представителем семейства Muridae. В некоторых вариантах осуществления описанное в данном документе животное, отличное от человека, представляет собой грызуна. В некоторых определенных вариантах осуществления описанный в данном документе грызун выбран из мыши и крысы. В некоторых вариантах осуществления описанное в данном документе животное, отличное от человека, представляет собой мышь.

[0092] В некоторых вариантах осуществления описанное в данном документе животное, отличное от человека, представляет собой грызуна, который является мышью линии C57BL, выбранной из C57BL/A, C57BL/An, C57BL/GrFa, C57BL/KaLwN, C57BL/6, C57BL/6J, C57BL/6ByJ, C57BL/6NJ, C57BL/10, C57BL/10ScSn, C57BL/10Cr и C57BL/Ola. В некоторых определенных вариантах осуществления описанная в данном документе мышь представляет собой линию 129, выбранную из группы, состоящей из линии 129P1, 129P2, 129P3, 129X1, 129S1 (например, 129S1/SV, 129S1/SvIm), 129S2, 129S4, 129S5, 129S9/SvEvH, 129/SvJae, 129S6 (129/SvEvTac), 129S7, 129S8, 129T1, 129T2 (см., например, Festing et al., 1999, Mammalian Genome 10:836; Auerbach, W. et al., 2000, Biotechniques 29(5):1024-1028, 1030, 1032). В некоторых определенных вариантах осуществления описанная в данном документе генетически модифицированная мышь представляет собой помесь вышеупомянутой линии 129 и вышеупомянутой линии C57BL/6. В некоторых определенных вариантах осуществления описанная в данном документе мышь представляет собой помесь вышеупомянутых линий 129 или помесью вышеупомянутых линий BL/6. В некоторых определенных вариантах осуществления линия 129 в описанной в данном документе помеси представляет собой линию 129S6 (129/SvEvTac). В некоторых вариантах осуществления описанная в данном документе мышь представляет собой линию BALB, например линию BALB/c. В некоторых вариантах осуществления описанная в данном документе мышь представляет собой помесь линии BALB и другой вышеупомянутой линии.

[0093] В некоторых вариантах осуществления описанное в данном документе животное, отличное от человека, представляет собой крысу. В некоторых определенных вариантах осуществления описанная в данном документе крыса выбрана из крысы линии Wistar, линии LEA, линии Sprague Dawley, линии Fischer, F344, F6 и Dark Agouti. В некоторых определенных вариантах осуществления описанная в данном документе линия крыс представляет собой помесь двух или более линий, выбранных из группы, включающей Wistar, LEA, Sprague Dawley, Fischer, F344, F6 и Dark Agouti.

[0094] Нуклеиновая кислота, используемая в данном документе, в своем самом широком смысле, включает любое соединение и/или вещество, включенное или которое может быть встроенным в состав олигонуклеотидной цепи. В некоторых вариантах осуществления «нуклеиновая кислота» представляет собой соединение и/или вещество, включенное или которое может быть встроенным в состав олигонуклеотидной цепи с помощью фосфодиэфирной связи. Как будет очевидно из контекста, в некоторых вариантах осуществления «нуклеиновая кислота» включает отдельные остатки нуклеиновой кислоты (например, нуклеотиды и/или нуклеозиды); в некоторых вариантах

осуществления «нуклеиновая кислота» включает олигонуклеотидную цепь, содержащую отдельные остатки нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления «нуклеиновая кислота» представляет собой или содержит РНК; в некоторых вариантах осуществления «нуклеиновая кислота» представляет собой или содержит ДНК. В некоторых вариантах осуществления «нуклеиновая кислота» представляет собой один или более остатков природной нуклеиновой кислоты, содержит их или состоит из них. В некоторых вариантах осуществления «нуклеиновая кислота» представляет собой один или более аналогов нуклеиновой кислоты, содержит их или состоит из них. В некоторых вариантах осуществления аналог нуклеиновой кислоты отличается от «нуклеиновой кислоты» тем, что в нем не используется фосфодиэфирный остов. Например, в некоторых вариантах осуществления «нуклеиновая кислота» представляет собой одну или более «пептидных нуклеиновых кислот», которые известны из уровня техники и имеют в остове пептидные связи вместо фосфодиэфирных связей, содержит их или состоит из них, и они считаются находящимися в пределах объема настоящего изобретения. В качестве альтернативы или в дополнение в некоторых вариантах осуществления «нуклеиновая кислота» имеет одну или более фосфотиоатных и/или 5'-N-фосфорамидитных связей вместо фосфодиэфирных связей. В некоторых вариантах осуществления «нуклеиновая кислота» представляет собой один или более природных нуклеозидов (например, аденозин, тимидин, гуанозин, цитидин, уридин, дезоксиаденозин, дезокситимидин, дезоксигуанозин и дезоксицитидин), содержит их или состоит из них. В некоторых вариантах осуществления «нуклеиновая кислота» представляет собой один или более аналогов нуклеозидов (например, 2-аминоаденозин, 2-тиотимидин, инозин, пирролопиримидин, 3-метиладенозин, 5-метилцитидин, C5-пропинилцитидин, C5-пропилилуридин, 2-аминоаденозин, C5-бромурин, C5-фторуридин, C5-йодуридин, C5-пропилилуридин, C5-пропинилцитидин, C5-метилцитидин, 2-аминоаденозин, 7-дезазааденозин, 7-дезазагуанозин, 8-оксоаденозин, 8-оксогуанозин, O(6)-метилгуанин, 2-тиоцитидин, метилированные основания, интеркалированные основания и их комбинации), содержит их или состоит из них. В некоторых вариантах осуществления «нуклеиновая кислота» содержит один или более модифицированных сахарных остатков (например, 2'-фторрибозу, рибозу, 2'-дезоксиррибозу, арабинозу и гексозу) по сравнению с таковыми сахарными остатками в природных нуклеиновых кислотах. В некоторых вариантах осуществления «нуклеиновая кислота» имеет нуклеотидную последовательность, которая кодирует функциональный продукт гена, такой как РНК или белок. В некоторых вариантах осуществления «нуклеиновая кислота» предусматривает один или более интронов. В некоторых вариантах осуществления «нуклеиновую кислоту» получают посредством одного или более из выделения из природного источника, ферментативного синтеза путем полимеризации на основе комплементарной матрицы (*in vivo* или *in vitro*), воспроизводства в рекомбинантной клетке или системе и химического синтеза. В некоторых вариантах осуществления «нуклеиновая кислота» имеет длину по меньшей мере 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000 или более остатков. В некоторых вариантах осуществления «нуклеиновая кислота» является одонитевой; в некоторых вариантах осуществления «нуклеиновая кислота» является двухнитевой. В некоторых вариантах осуществления «нуклеиновая кислота» имеет нуклеотидную последовательность, содержащую по меньшей мере один элемент, который кодирует полипептид, или являющуюся комплементарной по отношению к последовательности, которая кодирует

полипептид. В некоторых вариантах осуществления «нуклеиновая кислота» обладает ферментативной активностью.

[0095] Выражение функционально связанных: используемое в данном документе, включает в себя контактное положение, в котором описанные компоненты находятся во взаимосвязи, позволяющей им функционировать надлежащим образом.

Контролирующая последовательность, «функционально связанная» с кодирующей последовательностью, лигирована таким образом, что экспрессия кодирующей последовательности достигается в условиях, совместимых с функционированием контролирующих последовательностей. «Функционально связанные» последовательности включают в себя как последовательности, контролирующие экспрессию, смежные с геном, представляющим интерес, так и последовательности, контролирующие экспрессию, действующие в транс-положении или на некотором расстоянии, осуществляя контроль над геном, представляющим интерес. Термин «последовательность, контролирующая экспрессию», используемый в данном документе, включает полинуклеотидные последовательности, необходимые для осуществления экспрессии и процессинга кодирующих последовательностей, с которыми они лигированы. «Последовательности, контролирующие экспрессию» включают: соответствующие последовательности для инициации и терминации транскрипции, промоторные и энхансерные последовательности; сигналы для эффективного процессинга РНК, такие как сигналы для сплайсинга и полиаденилирования; последовательности, стабилизирующие цитоплазматическую мРНК; последовательности, повышающие эффективность трансляции (т.е. консенсусная последовательность Козак); последовательности, повышающие стабильность белка; и, при необходимости, последовательности, усиливающие секрецию белка. Природа таких контролирующих последовательностей различается в зависимости от организма-хозяина. Например, у прокариот такие контролирующие последовательности обычно включают в себя промотор, сайт связывания рибосом и последовательность для терминации транскрипции, тогда как у эукариот такие контролирующие последовательности обычно включают в себя промоторы и последовательность для терминации транскрипции.

Термин «контролирующие последовательности» подразумевает включение компонентов, наличие которых является существенным для экспрессии и процессинга, и также может включать дополнительные компоненты, наличие которых является преимущественным, например, лидерные последовательности и последовательности-партнеры по слиянию.

[0096] Пациент или субъект, используемый в данном документе, включает любой организм, которому вводят или могут вводить предусмотренную композицию, например, для экспериментальных, диагностических, профилактических, косметических и/или терапевтических целей. Типичные пациенты включают животных (например, млекопитающих, таких как мыши, крысы, кролики, приматы, отличные от человека, и/или люди). В некоторых вариантах осуществления пациент представляет собой животное, отличное от человека. В некоторых вариантах осуществления пациент (например, пациент, являющийся животным, отличным от человека) может иметь модификацию, описанную в данном документе, модификацию, отличную от описанной в данном документе, или не иметь модификации (т.е. в случае пациента, являющегося животным дикого типа, отличным от человека). В некоторых вариантах осуществления животное, отличное от человека, страдает от одного или более нарушений или состояний или восприимчиво к ним. В некоторых вариантах осуществления у животного, отличного от человека, проявляются один или более симптомов нарушения или состояния. В некоторых вариантах осуществления у животного, отличного от человека, было

диагностировано одно или более нарушений или состояний.

[0097] Полипептид, используемый в данном документе, включает любую полимерную цепь из аминокислот. В некоторых вариантах осуществления полипептид имеет аминокислотную последовательность, встречающуюся в природе. В некоторых вариантах осуществления полипептид имеет аминокислотную последовательность, не встречающуюся в природе. В некоторых вариантах осуществления полипептид имеет аминокислотную последовательность, которая содержит части, встречающиеся в природе отдельно друг от друга (т.е. из двух или более различных организмов, например, человеческую и отличную от человеческой части). В некоторых вариантах осуществления полипептид имеет аминокислотную последовательность, которая является сконструированной в том смысле, что она разработана и/или получена в результате действий человека.

[0098] Рекомбинантный, используемый в данном документе, подразумевает включение полипептидов (например, полипептидов Lag-3, описанных в данном документе), разрабатываемых, сконструированных, полученных, экспрессируемых, создаваемых или выделяемых с помощью рекомбинантных способов, таких как полипептиды, экспрессируемые с использованием рекомбинантного вектора экспрессии, вводимого путем трансфекции в клетку-хозяина, полипептиды, выделяемые из комбинаторной библиотеки рекомбинантных человеческих полипептидов (Hoogenboom H.R., 1997, TIB Tech. 15:62-70; Azzazy H., and Highsmith W.E., 2002, Clin. Biochem. 35:425-445; Gavilondo J.V., and Larrick J.W., 2002, BioTechniques 29:128-145; Hoogenboom H., and Chames P., 2000, Immunology Today 21:371-378), антитела, выделяемые из животного (например, мыши), трансгенного по генам человеческих иммуноглобулинов (см., например, Taylor, L.D. et al., 1992, Nucl. Acids Res. 20:6287-6295; Kellermann S-A., and Green L.L., 2002, Current Opinion in Biotechnology 13:593-597; Little M. et al., 2000, Immunology Today 21:364-370; Murphy, A.J. et al., 2014, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 111(14):5153-5158) или полипептиды, получаемые, экспрессируемые, создаваемые или выделяемые любыми другими способами, предусматривающими соединение выбранных элементов последовательностей друг с другом. В некоторых вариантах осуществления один или более из таких выбранных элементов последовательностей обнаруживаются в природе. В некоторых вариантах осуществления один или более из таких выбранных элементов последовательностей разрабатывают *in silico*. В некоторых вариантах осуществления один или более из таких выбранных элементов последовательностей получают в результате мутагенеза (например, *in vivo* или *in vitro*) известного элемента последовательности, например, из природного или синтетического источника. Например, в некоторых вариантах осуществления рекомбинантный полипептид содержит последовательности, обнаруживаемые в геноме организма-источника, представляющего интерес (например, человека, мыши и т.д.). В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный полипептид имеет аминокислотную последовательность, полученную в результате мутагенеза (например, *in vitro* или *in vivo*, например, у животного, отличного от человека), так что аминокислотные последовательности рекомбинантных полипептидов представляют собой последовательности, которые хоть и происходят из последовательностей полипептидов и являются родственными им, но в естественных условиях могут не существовать в геноме животного, отличного от человека, *in vivo*.

[0099] Замещение, используемое в данном документе, включает процесс, посредством которого «замещаемую» последовательность нуклеиновой кислоты (например, ген), обнаруживаемую в локусе хозяина (например, в геноме), удаляют из этого локуса, а другую, «замещающую» нуклеиновую кислоту располагают на ее месте. В некоторых

вариантах осуществления последовательность замещающей нуклеиновой кислоты и последовательности замещаемых нуклеиновых кислот сравнимы друг с другом в том, что, например, они являются гомологичными друг другу и/или содержат соответствующие элементы (например, элементы, кодирующие белок, регуляторные элементы и т.д.). В некоторых вариантах осуществления замещаемая последовательность нуклеиновой кислоты включает в себя одно или более из промотора, энхансера, сайта донора сплайсинга, сайта акцептора сплайсинга, интрона, экзона, нетранслируемого участка (UTR); в некоторых вариантах осуществления замещающая последовательность нуклеиновой кислоты включает в себя одну или более кодирующих последовательностей.

В некоторых вариантах осуществления замещающая последовательность нуклеиновой кислоты представляет собой гомолог замещающей последовательности нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления замещающая последовательность нуклеиновой кислоты является ортологом замещаемой последовательности. В некоторых вариантах осуществления замещающая последовательность нуклеиновой кислоты представляет собой или содержит последовательность нуклеиновой кислоты человека.

В некоторых вариантах осуществления, в том числе в тех, в которых замещающая последовательность нуклеиновой кислоты представляет собой или содержит последовательность нуклеиновой кислоты человека, замещаемая последовательность нуклеиновой кислоты представляет собой или содержит последовательность от грызуна (например, мышиную или крысиную последовательность). Последовательность нуклеиновой кислоты, расположенная таким образом, может включать в себя одну или более регуляторных последовательностей, которые являются частью исходной последовательности нуклеиновой кислоты, применяемой для получения последовательности, расположенной таким образом (например, промоторы, энхансеры, 5'- или 3'-концевые нетранслируемые участки и т.д.). Например, в различных вариантах осуществления замещение представляет собой замену эндогенной последовательности гетерологичной последовательностью, что приводит к продуцированию продукта гена с последовательности нуклеиновой кислоты, расположенной таким образом (содержащей гетерологичную последовательность), но не к экспрессии с эндогенной последовательности; при этом эндогенная геномная последовательность замещается последовательностью нуклеиновой кислоты, которая кодирует полипептид, имеющий функцию, сходную с таковой у полипептида, кодируемого эндогенной последовательностью (например, эндогенная геномная последовательность кодирует полипептид Lag-3, а фрагмент ДНК кодирует один или более полных или неполных человеческих полипептидов Lag-3). В различных вариантах осуществления эндогенный ген или его фрагмент замещают соответствующим геном человека или его фрагментом. Соответствующий ген человека или его фрагмент представляет собой ген человека или его фрагмент, который является ортологом замещаемого эндогенного гена или его фрагмента или практически сходным или одинаковым с ним по структуре и/или функции.

[00100] Эталон: используемый в данном документе, описывает стандартное или контрольное средство, группу, индивидуума, популяцию, образец, последовательность или значение, с которыми сравнивают средство, животное, группу, индивидуума, популяцию, образец, последовательность или значение, представляющие интерес. В некоторых вариантах осуществления эталонные средство, группу, индивидуума, популяцию, образец, последовательность или значение тестируют и/или определяют практически одновременно с тестированием или определением средства, группы, индивидуума, популяции, образца, последовательности или значения, представляющих интерес. В некоторых вариантах осуществления эталонные средство, группа,

индивидуум, популяция, образец, последовательность или значение представляют собой исторический эталон, необязательно воплощенный в материальной форме. В некоторых вариантах осуществления эталон может относиться к контролю. Используемый в

данном документе термин «эталон» может относиться к «эталонному животному».
5 «Эталонное животное» может иметь модификацию, описанную в данном документе, модификацию, отличную от описанной в данном документе, или не иметь модификации (т.е. в случае животного дикого типа). Обычно как будет понятно специалисту в данной области, эталонные средство, животное, группу, индивидуум, популяцию, образец, последовательность или значение обычно определяют или характеризуют в условиях,
10 сравнимых с условиями, используемыми для определения или получения характеристик средства, животного (например, млекопитающего), группы, индивидуума, популяции, образца, последовательности или значения, представляющих интерес.

[00101] Выражение по сути: используемое в данном документе, включает качественное состояние проявления полной или практически полной меры или степени выраженности характеристики или свойства, представляющих интерес. Специалисту в области биологии
15 будет понятно, что биологические и химические явления редко, если это вообще происходит, продолжают до окончания и/или протекают до завершения или достижения или избегания абсолютного результата. Таким образом, термин «по сути» используется в данном документе для охвата потенциального отсутствия завершенности,
20 присущего многим биологическим и химическим явлениям. Этот термин также используется в данном документе, если речь идет о последовательности, молекуле нуклеиновой кислоты или белка или домене белка в сравнении с эталонной последовательностью, молекулой или доменом. Например, в отношении гуманизированного полипептида Lag-3, содержащего, по сути, сигнальный пептид
25 полипептида Lag-3, отличного от человеческого, фраза «по сути, сигнальный пептид полипептида Lag-3, отличного от человеческого» включает пептид, который, по сути, идентичен сигнальному пептиду полипептида Lag-3, отличного от человеческого, при этом данный пептид в некоторых вариантах осуществления по меньшей мере на 85%, 90%, 95%, 95%, 99% или 100% идентичен по последовательности с сигнальным пептидом
30 полипептида Lag-3, отличного от человеческого; и в некоторых вариантах осуществления отличается от сигнального пептида полипептида Lag-3, отличного от человеческого, не более чем на 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислоту, предпочтительно только на N- или C-конце сигнального пептида, например из-за отсутствия аминокислоты(аминокислот) или присутствия дополнительной(дополнительных) аминокислоты(аминокислот) на
35 N- или C-конце сигнального пептида. В качестве другого примера в отношении гуманизированного полипептида PD-1, содержащего, по сути, внеклеточный домен человеческого белка PD-1, фраза «по сути, внеклеточный домен человеческого белка PD-1» включает полипептид, который, по сути, идентичен внеклеточному домену человеческого белка PD-1, причем в некоторых вариантах осуществления данный
40 полипептид по меньшей мере на 85%, 90%, 95%, 95%, 99% или 100% идентичен по последовательности внеклеточному домену человеческого белка PD-1; и в некоторых вариантах осуществления отличается от внеклеточного домена человеческого белка PD-1 не более чем на 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислоту, предпочтительно только на N- или C-конце, например из-за отсутствия аминокислот или наличия дополнительных
45 аминокислот на N- или C-конце.

[00102] Выражение по сути, гомологичный, используемое в данном документе, включает сравнение между аминокислотными последовательностями или последовательностями нуклеиновых кислот. Как будет понятно специалисту в данной

области, две последовательности обычно считаются «по сути, гомологичными», если они содержат гомологичные остатки в соответствующих положениях. Гомологичные остатки могут являться идентичными остатками. В качестве альтернативы гомологичные остатки могут не являться идентичными остатками с соответствующими сходными структурными и/или функциональными характеристиками. Например, как хорошо известно специалистам в данной области, определенные аминокислоты обычно классифицируют как «гидрофобные» или «гидрофильные» аминокислоты и/или как имеющие «полярные» или «неполярные» боковые цепи. Замена одной аминокислоты другой того же типа часто может считаться «гомологичной» заменой. Типичное распределение аминокислот по категориям обобщено ниже:

	Аланин	Ala	Неполярная	Нейтральная	1,8
	Аргинин	Arg	Полярная	Положительно заряженная	-4,5
15	Аспарагин	Asn	Полярная	Нейтральная	-3,5
	Аспарагиновая кислота	Asp	Полярная	Отрицательно заряженная	-3,5
	Цистеин	Cys	Неполярная	Нейтральная	2,5
20	Глутаминовая кислота	Glu	Полярная	Отрицательно заряженная	-3,5
	Глутамин	Gln	Полярная	Нейтральная	-3,5
	Глицин	Gly	Неполярная	Нейтральная	-0,4

25

30

35

40

45

	Гистидин	His	Полярная	Положительно заряженная	-3,2
	Изолейцин	Ile	Неполярная	Нейтральная	4,5
5	Лейцин	Leu	Неполярная	Нейтральная	3,8
	Лизин	Lys	Полярная	Положительно заряженная	-3,9
	Метионин	Met	Неполярная	Нейтральная	1,9
10	Фенилаланин	Phe	Неполярная	Нейтральная	2,8
	Пролин	Pro	Неполярная	Нейтральная	-1,6
	Серин	Ser	Полярная	Нейтральная	-0,8
	Треонин	Thr	Полярная	Нейтральная	-0,7
15	Триптофан	Trp	Неполярная	Нейтральная	-0,9
	Тирозин	Tyr	Полярная	Нейтральная	-1,3
	Валин	Val	Неполярная	Нейтральная	4,2

20	Неоднозначно определенные аминокислоты	3-буквенное обозначение	1-буквенное обозначение
	Аспарагин или аспарагиновая кислота	Asx	B
	Глутамин или глутаминовая кислота	Glx	Z
25	Лейцин или изолейцин	Xle	J
	Неуказанная или неизвестная аминокислота	Xaa	X

[00103] Из уровня техники хорошо известно, что аминокислотные последовательности или последовательности нуклеиновых кислот можно сравнивать с помощью любого из разнообразных алгоритмов, в том числе алгоритмов, доступных в коммерческих компьютерных программах, таких как BLASTN для нуклеотидных последовательностей и BLASTP, BLAST с гэпами и PSI-BLAST для аминокислотных последовательностей. Примеры таких программ описаны в Altschul et al., 1990, Basic local alignment search tool, J. Mol. Biol., 215(3): 403-410; Altschul et al., 1996, Methods Enzymol. 266:160-80; Altschul et al., 1997, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402; Baxevanis et al., 1998 Bioinformatics: A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins, Wiley; и Misener et al. (eds.) (1999) Bioinformatics Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology, Vol. 132), Humana Press. В дополнение к идентификации гомологичных последовательностей, программы, упомянутые выше, обычно выдают показатель степени гомологии. В некоторых вариантах осуществления две последовательности считаются практически гомологичными, если по меньшей мере 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более их соответствующих остатков являются гомологичными на протяжении рассматриваемого фрагмента из остатков. В некоторых вариантах осуществления рассматриваемый фрагмент представляет собой полную последовательность. В некоторых вариантах осуществления рассматриваемый фрагмент содержит по меньшей мере 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 или более остатков. В некоторых вариантах осуществления рассматриваемый фрагмент содержит смежные остатки вдоль полной последовательности. В некоторых вариантах осуществления рассматриваемый фрагмент содержит прерывисто расположенные остатки вдоль полной последовательности. В

некоторых вариантах осуществления рассматриваемый фрагмент содержит по меньшей мере 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 или более остатков.

[00104] Выражение по сути, идентичный, используемое в данном документе, включает сравнение между аминокислотными последовательностями или последовательностями нуклеиновых кислот. Как будет понятно специалисту в данной области, две последовательности обычно считаются «по сути, идентичными», если они содержат идентичные остатки в соответствующих положениях. Из уровня техники хорошо известно, что аминокислотные последовательности или последовательности нуклеиновых кислот можно сравнивать с помощью любого из разнообразных алгоритмов, в том числе алгоритмов, доступных в коммерческих компьютерных программах, таких как BLASTN для нуклеотидных последовательностей и BLASTP, BLAST с гэпами и PSI-BLAST для аминокислотных последовательностей. Примеры таких программ описаны в Altschul et al., 1990, Basic local alignment search tool, J. Mol. Biol., 215(3): 403-410; Altschul et al., 1996, Methods Enzymol. 266:160-80; Altschul et al., 1997, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402; Baxevanis et al., 1998, Bioinformatics: A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins, Wiley; и Misener et al., (eds.) (1999) Bioinformatics Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology, Vol. 132), Humana Press. В дополнение к идентификации идентичных последовательностей, программы, упомянутые выше, обычно выдают показатель степени идентичности. В некоторых вариантах осуществления две последовательности считаются, по сути, идентичными, если по меньшей мере 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более их соответствующих остатков являются идентичными на протяжении рассматриваемого фрагмента из остатков. В некоторых вариантах осуществления рассматриваемый фрагмент представляет собой полную последовательность. В некоторых вариантах осуществления рассматриваемый фрагмент содержит по меньшей мере 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 или более остатков.

[00105] Выражение целенаправленно воздействующий вектор или целенаправленно воздействующая конструкция, используемые в данном документе, включает молекулу полинуклеотида, содержащую участок для целенаправленного воздействия. Участок для направленного воздействия содержит последовательность, идентичную или, по сути, идентичную последовательности в целевых клетке, ткани или животном, и обеспечивает интеграцию целенаправленно воздействующей конструкции в положение в геноме клетки, ткани или животного посредством гомологичной рекомбинации. Также включены участки для целенаправленного воздействия, на которые целенаправленно воздействуют с помощью сайтов распознавания сайт-специфической рекомбиназой (например, сайтов loxP и/или Frt). В некоторых вариантах осуществления целенаправленно воздействующая конструкция дополнительно содержит последовательность нуклеиновой кислоты или ген, представляющие особый интерес, селективируемый маркер, контрольные и/или регуляторные последовательности, а также другие последовательности нуклеиновой кислоты, обеспечивающие возможность рекомбинации, опосредованной добавлением экзогенных белков, которые способствуют или содействуют рекомбинации с вовлечением таких последовательностей. В некоторых вариантах осуществления целенаправленно воздействующая конструкция дополнительно содержит полный или неполный ген, представляющий интерес, где ген, представляющий интерес, является гетерологичным геном, который кодирует полный или неполный белок, имеющий функцию, сходную с таковой у белка, кодируемого эндогенной последовательностью. В некоторых вариантах осуществления целенаправленно воздействующая конструкция дополнительно содержит гуманизированный полный

или неполный ген, представляющий интерес, где гуманизированный ген, представляющий интерес, кодирует полный или неполный белок, имеющий функцию, сходную с такой функцией у белка, кодируемого эндогенной последовательностью. В некоторых вариантах осуществления целенаправленно воздействующая конструкция
5 дополнительно содержит сконструированный полный или неполный ген, представляющий интерес, где сконструированный ген, представляющий интерес, кодирует полный или неполный белок, имеющий функцию, сходную с такой функцией у белка, кодируемого эндогенной последовательностью.

[00106] Вариант, используемый в данном документе, включает объект,
10 демонстрирующий значительную структурную идентичность с эталонным объектом, но структурно отличающийся от эталонного объекта по наличию или уровню одного или более химических фрагментов по сравнению с эталонным объектом. Во многих вариантах осуществления «вариант» также отличается функционально от своего эталонного объекта. Как правило, то, уместно ли считать конкретный объект
15 «вариантом» эталонного объекта, зависит от степени его структурной идентичности с эталонным объектом. Как будет понятно специалистам в данной области, любой биологический или химический эталонный объект имеет определенные характерные структурные элементы. «Вариант» по определению представляет собой отличающийся химический объект, имеющий один или более общих таких характерных структурных
20 элементов. В виде лишь нескольких примеров, малая молекула может иметь характерный сердцевинный структурный элемент (например, макроциклическую сердцевину) и/или один или более характерных «подвешенных» фрагментов, так что вариант малой молекулы имеет общие с ней сердцевинный структурный элемент и характерные «подвешенные» фрагменты, но отличается по другим «подвешенным» фрагментам и/
25 или по типам связей (одинарные по сравнению с двойными, E по сравнению с Z и т.д.), присутствующих в сердцевине, полипептид может иметь характерный элемент последовательности, содержащий множество аминокислот, имеющих определенные положения по отношению друг к другу в линейном или трехмерном пространстве и/
30 или способствующих осуществлению конкретной биологической функции, нуклеиновая кислота может иметь характерный элемент последовательности, содержащий множество нуклеотидных остатков, имеющих определенные положения по отношению друг к другу в линейном или трехмерном пространстве. Например, «вариант полипептида» может отличаться от эталонного полипептида вследствие одного или более различий в аминокислотной последовательности и/или одного или более различий в химических
35 фрагментах (например, углеводах, липидах и т.д.), прикрепленных ковалентной связью к полипептидному остову. В некоторых вариантах осуществления «вариант полипептида» демонстрирует общую идентичность последовательности с эталонным полипептидом, составляющую по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% или 99%. В качестве альтернативы или в дополнение в
40 некоторых вариантах осуществления «вариант полипептида» не имеет по меньшей мере один характерный элемент последовательности, общий с эталонным полипептидом. В некоторых вариантах осуществления эталонный полипептид обладает одним или более видами биологической активности. В некоторых вариантах осуществления «вариант полипептида» обладает одним или более видами биологической активности, общими
45 с эталонным полипептидом. В некоторых вариантах осуществления у «варианта полипептида» отсутствует один или более видов биологической активности эталонного полипептида. В некоторых вариантах осуществления «вариант полипептида» демонстрирует пониженный уровень одного или более видов биологической активности

по сравнению с эталонным полипептидом. Во многих вариантах осуществления полипептид, представляющий интерес, считается «вариантом» исходного или эталонного полипептида, если полипептид, представляющий интерес, имеет аминокислотную последовательность, идентичную такой последовательности у исходной молекулы, за исключением небольшого количества изменений в конкретных положениях в последовательности. У варианта обычно заменены менее 20%, 15%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% остатков по сравнению с исходной молекулой. В некоторых вариантах осуществления «вариант» имеет 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 замененный остаток по сравнению с исходной молекулой. «Вариант» часто имеет очень небольшое количество (например, менее 5, 4, 3, 2 или 1) замененных функциональных остатков (т.е. остатков, принимающих участие в конкретной биологической активности). Кроме того, «вариант» обычно имеет не более 5, 4, 3, 2 или 1 добавления или делеции и часто не имеет добавлений или делеций по сравнению с исходной молекулой. Более того, любые добавления или делеции обычно охватывают менее приблизительно 25, приблизительно 20, приблизительно 19, приблизительно 18, приблизительно 17, приблизительно 16, приблизительно 15, приблизительно 14, приблизительно 13, приблизительно 10, приблизительно 9, приблизительно 8, приблизительно 7, приблизительно 6 и зачастую охватывают менее приблизительно 5, приблизительно 4, приблизительно 3 или приблизительно 2 остатков. В некоторых вариантах осуществления исходный или эталонный полипептид обнаруживается в природе. Как будет понятно специалистам в данной области, множество вариантов конкретного полипептида, представляющего интерес, можно зачастую обнаружить в природе, особенно если полипептид, представляющий интерес, представляет собой возбудитель инфекции в виде полипептида.

[00107] Вектор, используемый в данном документе, предусматривает молекулу нуклеиновой кислоты, способную переносить другую нуклеиновую кислоту, с которой она связана. В некоторых вариантах осуществления векторы способны к внехромосомной репликации и/или экспрессии нуклеиновых кислот, с которыми они связаны в клетке-хозяине, такой как эукариотическая и/или прокариотическая клетка. Векторы, способные управлять экспрессией функционально связанных генов, называются в данном документе «векторами экспрессии».

[00108] Дикий тип, используемый в данном документе, имеет понятное в данной области значение, которое относится к объекту, обладающему структурой и/или активностью, обнаруживаемой в природе в «нормальном» (в противоположность мутантному, болезненному, измененному и т.д.) состоянию или окружении. Специалистам в данной области будет понятно, что гены и полипептиды дикого типа часто существуют в нескольких различных формах (например, аллелях).

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ КОНКРЕТНЫХ ВАРИАНТОВ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

[00109] Настоящее изобретение предусматривает, среди прочего, улучшенных и/или сконструированных животных, отличных от человека, имеющих гуманизированный генетический материал, кодирующий полипептид гена активации лимфоцитов-3 (Lag-3), для определения терапевтической эффективности модуляторов Lag-3 (например, антител к Lag-3) для лечения рака и анализов Т-клеточных ответов и сигнальной трансдукции. Предполагается, что такие животные, отличные от человека, обеспечивают улучшение в определении терапевтической эффективности модуляторов Lag-3 и их потенциала в блокировании Lag-3. Таким образом, настоящее изобретение особенно полезно для разработки видов терапии на основе антител к Lag-3 для лечения различных видов рака и аутоиммунных заболеваний, нарушений или состояний. В частности,

настоящее изобретение охватывает гуманизацию отличного от человеческого (такого как мышинный) гена Lag-3, приводящую в результате к экспрессии гуманизированного полипептида Lag-3 на поверхности клеток животного, отличного от человека. Такие гуманизированные полипептиды Lag-3 обладают способностью обеспечивать источник

5 человеческих клеток Lag-3⁺ для определения эффективности стимулирования противоопухолевых иммунных ответов терапевтическими средствами на основе антител к Lag-3. В некоторых вариантах осуществления животные, отличные от человека, описанные в данном документе, демонстрируют усиленные иммунные ответы

10 посредством блокады передачи сигналов, опосредованной Lag-3, с помощью гуманизированного полипептида Lag-3, экспрессируемого на поверхности клеток животного, отличного от человека. В некоторых вариантах осуществления гуманизированные полипептиды Lag-3 содержат последовательность, соответствующую

15 внеклеточной части человеческого полипептида LAG-3, например внеклеточной части, которая содержит первые два Ig-подобных домена человеческого полипептида LAG-3. В некоторых вариантах осуществления гуманизированные полипептиды Lag-3 содержат последовательность, соответствующую аминокислотам 29-260 (или 23-260 или 21-260) человеческого полипептида LAG-3. В некоторых вариантах осуществления гуманизированные полипептиды Lag-3 содержат последовательность, соответствующую

20 трансмембранному домену и/или внутриклеточному хвосту отличного от человеческого (например, грызуна, такого как мышинный) полипептида Lag-3. В некоторых вариантах осуществления гуманизированный полипептид Lag-3 содержит внеклеточную часть, которая содержит первые два Ig-подобных домена человеческого полипептида LAG-3, где остальные части гуманизированного полипептида Lag-3 состоят из аминокислот

25 отличного от человеческого (например, грызуна, такого как мышинный) полипептида Lag-3. В некоторых вариантах осуществления гуманизированный полипептид Lag-3 содержит сигнальный пептид, который, по сути, идентичен сигнальному пептиду эндогенного полипептида Lag-3, отличного от человеческого; внеклеточный домен, который содержит человеческую часть и часть, отличную от человеческой, где

30 человеческая часть содержит первые два Ig-подобных домена человеческого полипептида LAG-3, а часть, отличная от человеческой, содержит последние два Ig-подобных домена эндогенного полипептида Lag-3, отличного от человеческого; и трансмембранные, и внутриклеточные домены эндогенного полипептида Lag-3, отличного от человеческого. В некоторых вариантах осуществления животные, отличные

35 от человека, описанные в данном документе, содержат гуманизированный ген Lag-3, который содержит генетический материал от животного, отличного от человека, и гетерологичного вида (например, человека). В некоторых вариантах осуществления животные, отличные от человека, описанные в данном документе, содержат гуманизированный ген Lag-3, где гуманизированный ген Lag-3 содержит экзоны 2-4

40 гена LAG-3 человека. В некоторых определенных вариантах осуществления животные, отличные от человека, описанные в данном документе, содержат гуманизированный ген Lag-3, где гуманизированный ген Lag-3 содержит ~1741 п. о. гена LAG-3 человека, соответствующие экзонам 2-4 и части интрона 4 (например, ~68 п. о.) гена LAG-3 человека. В некоторых вариантах осуществления животное, отличное от человека, описанное в данном документе, содержит гуманизированный ген Lag-3, где

45 гуманизированный ген Lag-3 содержит экзон 1 эндогенного гена Lag-3 отличного от человека животного, экзоны 2-4 гена LAG-3 человека и экзоны 5-8 эндогенного гена Lag-3 отличного от человека животного, где гуманизированный ген Lag-3 размещен в эндогенном локусе Lag-3 и функционально связан с эндогенным промотором Lag-3 в

локусе.

[00110] Различные аспекты настоящего изобретения подробно описаны в следующих разделах. Использование разделов не подразумевает ограничения настоящего изобретения. Каждый раздел можно применять в отношении любого аспекта настоящего изобретения. В настоящей заявке использование «или» означает «и/или», если не указано иное.

Ген активации лимфоцитов-3 (Lag-3)

[00111] Ген активации лимфоцитов-3 (Lag-3, также называемый CD223) представляет собой трансмембранный рецептор, экспрессируемый на активированных CD4 и CD8 Т-клетках, $\gamma\delta$ -Т-клетках, естественные киллеры с признаками Т-клеток естественных киллеров, В-клетках, естественных клетках-киллерах, плазматоидных дендритных клетках и регуляторных Т-клетках. Lag-3, являющийся представителем суперсемейства иммуноглобулинов, по структуре похож на CD4 и содержит четыре внеклеточных Ig-подобных домена (также известных как домены D1, D2, D3 и D4, см. звездочки в выравнивании последовательности на фигуре 2). Lag-3 ослабляет иммунный ответ и, как сообщалось, связывает молекулы главного комплекса гистосовместимости (МНС) II класса (которые, как полагают, связываются за счет взаимодействий с доменами D1 и D2 Lag-3) и приводит к доставке отрицательных сигналов в клетки, экспрессирующие Lag-3, и снижению антиген-зависимых ответов CD4 и CD8 Т-клеток. В настоящее время МНС II является единственным известным партнером по связыванию для Lag-3. Сообщалось также, что Lag-3 отрицательно регулирует способность Т-клеток пролиферировать, продуцировать цитокины и лизировать клетки-мишени, что называется истощением Т-клеток. Кроме того, сообщалось, что Lag-3 играет роль в повышении функции регуляторных Т-клеток (Treg) (Pardoll, D.M., 2012, Nat. Rev. Cancer 12:252-64).

[00112] Т-клеточные ко-стимуляторные и ко-ингибиторные молекулы (совместно называемые ко-сигнальными молекулами) играют решающую роль в регуляции активации Т-клеток, дифференциации подмножества, эффекторной функции и выживаемости (Chen, L. and D.V. Flies, 2013, Nat. Rev. Immunol. 13:227-42). После распознавания комплексов когнатный пептид-МНС на антигенпрезентирующих клетках с помощью рецептора Т-клеток, ко-сигнальные рецепторы совместно локализуются с рецепторами Т-клеток в иммунном синапсе, где они синергически действуют с сигналами TCR для стимуляции или ингибирования активации и функции Т-клеток (Flies, D.V. et al., 2011, Yale J. Biol. Med. 84:409-21). Конечный иммунный ответ регулируется балансом между ко-стимулирующими и ко-ингибирующими сигналами, которые названы «контрольными точками иммунного ответа» (Pardoll, D.M., выше). Такие «контрольные точки иммунного ответа» можно охарактеризовать как молекулы, действующие в иммунной системе для усиления либо уменьшения сигналов, особенно сигналов Т-клеток. Lag-3 функционирует в качестве одной из многих «контрольных точек иммунного ответа» в опосредовании толерантности периферических Т-клеток.

[00113] Для разработки применимых на практике видов целенаправленно воздействующей терапии для лечения людей-пациентов в будущем необходимо более обстоятельное и доскональное понимание функций, опосредованных Lag-3, и сигнального пути Lag-3 в противоопухолевом, ауто- и противои инфекционном иммунитете.

Последовательности Lag-3

[00114] Иллюстративные последовательности гена активации лимфоцитов-3 (Lag-3) грызунов (например, крысы и мыши), человека и гуманизированные последовательности

представлены на фигуре 8. Иллюстративный фрагмент синтетической ДНК для гуманизации гена Lag-3, отличного от человеческого, также представлен на фигуре 8. В последовательностях мРНК кодирующая последовательность указана жирным шрифтом, а последовательные экзоны в тех случаях, когда они указаны, разделены чередующимся подчеркнутым текстом; в гуманизованных последовательностях мРНК человеческие последовательности заключены в круглые скобки. Для аминокислотных последовательностей трансмембранные последовательности указаны подчеркнутым шрифтом; в гуманизованных аминокислотных последовательностях человеческие последовательности указаны жирным шрифтом и заключены в круглые скобки.

ДНК-конструкции

[00115] Как правило, молекулу полинуклеотида, содержащую полный или неполный ген Lag-3, вставляют в вектор, предпочтительно ДНК-вектор, для того, чтобы реплицировать молекулу полинуклеотида в подходящей клетке-хозяине.

[00116] В зависимости от размера ген Lag-3 или последовательность, кодирующую Lag-3, можно клонировать непосредственно из источников кДНК, доступных от коммерческих поставщиков, или сконструировать *in silico* на основе опубликованных последовательностей, доступных в GenBank. В качестве альтернативы библиотеки бактериальной искусственной хромосомы (ВАС) могут обеспечивать гетерологичные последовательности Lag-3 из генов, представляющих интерес (например, гетерологичного гена Lag-3). Библиотеки ВАС содержат вставки со средним размером 100-150 т.о. и способны нести вставки размером до 300 т.о. (Shizuya, H. et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A. 89:8794-7; Swiatek, P.J. and T. Gridley, 1993, Genes Dev. 7:2071-84; Kim, U.J. et al., 1996, Genomics 34:213-8; включенные в данный документ посредством ссылки). Например, человеческие и мышинные геномные библиотеки ВАС были сконструированы и являются коммерчески доступными (например, Invitrogen, Карлсбад, Калифорния). Кроме того, геномные библиотеки ВАС могут служить источником гетерологичных последовательностей Lag-3, а также участков контроля транскрипции.

[00117] В качестве альтернативы гетерологичные последовательности Lag-3 можно выделить, клонировать и/или перенести из дрожжевых искусственных хромосом (УАС). Полный гетерологичный ген или локус можно клонировать и помещать в один или более УАС. Если используют несколько УАС и они содержат участки перекрывающихся гомологий, их можно рекомбинировать внутри штаммов дрожжей-хозяев с получением единой конструкции, представляющей полный локус. Участки УАС можно дополнительно модифицировать с помощью кассет для отбора млекопитающих путем переоснащения для содействия в введении конструкций в эмбриональные стволовые клетки или эмбрионы способами, известными в данной области и/или описанными в данном документе.

[00118] Иллюстративные последовательности мРНК и аминокислотные последовательности для применения в конструировании гуманизованного гена Lag-3 у животного, отличного от человека, представлены в данном документе, например на фигуре 8. Другие гетерологичные последовательности Lag-3 также можно найти в базе данных GenBank или в других базах данных последовательностей, известных в данной области.

[00119] Конструкции ДНК, содержащие последовательности Lag-3, описанные в данном документе, в некоторых вариантах осуществления содержат человеческие геномные последовательности LAG-3, кодирующие внеклеточную часть человеческого полипептида LAG-3, например по меньшей мере аминокислоты 29-260 (или 23-260 или

21-260) человеческого полипептида LAG-3, функционально связанные с регуляторными последовательностями, отличными от человеческих (например, промотор грызунов), для экспрессии в трансгенном животном, отличном от человека. В некоторых вариантах осуществления конструкции ДНК, содержащие последовательности Lag-3, описанные в данном документе, содержат человеческие геномные последовательности LAG-3, кодирующие по меньшей мере аминокислоты 29-260 человеческого полипептида LAG-3, функционально связанные с отличным от человеческого промотором Lag-3, и один или более экзонов Lag-3, отличных от человеческих (например, эндогенные экзоны Lag-3). Человеческие и/или отличные от человеческих последовательности Lag-3, включенные в описанные в данном документе конструкции ДНК, могут быть идентичными или, по сути, идентичными человеческим и/или отличным от человеческих последовательностям Lag-3, обнаруженным в природе (например, геномным), искусственными (например, синтетическим) последовательностями, или могут быть сконструированы человеком. В некоторых вариантах осуществления последовательности Lag-3 являются синтетическими по происхождению и содержат последовательность или последовательности, которые находятся в гене LAG-3 человека, обнаруженном в природе. Например, ДНК-конструкция может содержать синтетическую ДНК, которая соответствует экзонам 2-4 гена LAG-3 человека и которая кодирует внеклеточную часть человеческого полипептида LAG-3, например, по меньшей мере аминокислоты 29-260 человеческого полипептида LAG-3, функционально связанную с отличными от человеческих регуляторными (например, промотор) и кодирующими последовательностями (например, один или более экзонов, отличных от человеческих) Lag-3 таким образом, что полипептид Lag-3, имеющий человеческую и отличную от человеческой части, кодируется полученной ДНК-конструкцией. В некоторых вариантах осуществления последовательности Lag-3 содержат последовательность, естественным образом связанную с гетерологичным геном Lag-3 (т.е. геном LAG-3 человека). В некоторых вариантах осуществления последовательности Lag-3 содержат последовательность, которая естественным образом не связана с гетерологичным геном Lag-3 (т.е. геном LAG-3 человека). В некоторых вариантах осуществления последовательности Lag-3 содержат последовательность, которая оптимизирована для экспрессии у животного, отличного от человека. В некоторых вариантах осуществления каждая из гетерологичных последовательностей Lag-3, функционально связанных с отличными от человеческих последовательностями Lag-3, кодирует часть полипептида Lag-3, который в природе представлен в отдельных полипептидах. Если дополнительные последовательности применимы в оптимизации экспрессии гетерологичных последовательностей Lag-3, то такие последовательности можно клонировать с использованием существующих последовательностей в качестве зондов. Дополнительные последовательности, необходимые для максимальной экспрессии гетерологичного гена Lag-3 или гетерологичной последовательности, кодирующей Lag-3, можно получить из геномных последовательностей или других источников в зависимости от требуемого результата.

[00120] ДНК-конструкции можно получить при помощи способов, известных в данной области. Например, ДНК-конструкцию можно получить как часть большей плазмиды. Такой препарат позволяет эффективно клонировать и отбирать правильные конструкции, что известно в данной области. ДНК-фрагменты, содержащие одну или более нуклеотидных кодирующих последовательностей, описанных в данном документе, можно расположить между подходящими сайтами рестрикции на плазмиде так, что их можно легко выделить из оставшихся плазмидных последовательностей для включения

в требуемое животное.

[00121] Различные способы, используемые для получения плазмид и организмов-хозяев, которые их содержат, известны в данной области. Для других подходящих систем экспрессии как для прокариотических, так и для эукариотических клеток, а также для общих процедур рекомбинации см. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed., ed. by Sambrook, J. et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press: 1989.

Получение животных, отличных от человека, с гуманизированным геном активации лимфоцитов-3

[00122] Предусмотрены животные, отличные от человека, которые экспрессируют гуманизированные полипептиды Lag-3 на поверхности клеток животных, отличных от человека, в результате генетической модификации эндогенного локуса (например, локуса Lag-3), кодирующего полипептид Lag-3, у животного, отличного от человека. Подходящие примеры, описанные в данном документе, включают грызунов, в частности, мышей.

[00123] Гуманизированный ген Lag-3 в некоторых вариантах осуществления содержит генетический материал от гетерологичного вида (например, человека), где гуманизированный ген Lag-3 кодирует полипептид Lag-3, который содержит часть, кодируемую генетическим материалом от гетерологичного вида. В некоторых вариантах осуществления гуманизированный ген Lag-3, описанный в данном документе, содержит геномную ДНК от гетерологичного вида, которая кодирует внеклеточную часть полипептида Lag-3, экспрессируемую на плазматической мембране клетки. Также предусмотрены животные, отличные от человека, эмбрионы, клетки и целенаправленно воздействующие конструкции для получения животных, отличных от человека, эмбрионов, отличных от человеческих, и клеток, содержащих указанный гуманизированный ген Lag-3.

[00124] В некоторых вариантах осуществления эндогенный ген Lag-3 подвергают делеции. В некоторых вариантах осуществления эндогенный ген Lag-3 изменяют, при этом часть эндогенного гена Lag-3 замещают гетерологичной последовательностью (например, полной или неполной последовательностью LAG-3 человека). В некоторых вариантах осуществления весь или, по сути, весь эндогенный ген Lag-3 замещают гетерологичным геном (например, геном LAG-3 человека). В некоторых вариантах осуществления часть гетерологичного гена Lag-3 вставляют в эндогенный ген Lag-3, отличный от человеческого, в эндогенном локусе Lag-3. В некоторых вариантах осуществления гетерологичный ген представляет собой ген человека. В некоторых вариантах осуществления модификацию или гуманизацию проводят в отношении одной из двух копий эндогенного гена Lag-3, что приводит к получению животного, отличного от человека, являющегося гетерозиготным относительно гуманизированного гена Lag-3. В других вариантах осуществления предусмотрено животное, отличное от человека, являющееся гомозиготным по гуманизированному гену Lag-3.

[00125] В различных аспектах животное, отличное от человека, содержит полный или неполный ген LAG-3 человека в эндогенном локусе Lag-3, отличным от человеческого. Таким образом, такие животные, отличные от человека, могут быть описаны как имеющие гетерологичный ген Lag-3. Замещенный, вставленный, модифицированный или измененный ген Lag-3 в эндогенном локусе Lag-3 или полипептид, экспрессируемый с такого гена, можно выявить с применением разнообразных способов, включающих, например, ПЦР, вестерн-блоттинг, Саузерн-блоттинг, полиморфизм длин рестрикционных фрагментов (RFLP) или анализ с приобретением или потерей аллеля. В некоторых вариантах осуществления животное,

отличное от человека, является гетерозиготным относительно гуманизованного гена Lag-3.

[00126] В различных вариантах осуществления гуманизованный ген Lag-3, описанный в данном документе, содержит экзоны 2-4 гена LAG-3 человека.

5 [00127] В различных вариантах осуществления гуманизованный ген Lag-3, описанный в данном документе, предусматривает ген Lag-3, который имеет второй, третий и четвертый экзоны, каждый из которых имеет последовательность, которая по меньшей мере на 50% (например, на 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% и больше) идентична второму, третьему
10 и четвертому экзонам, представленным в SEQ ID NO: 5.

[00128] В различных вариантах осуществления гуманизованный ген Lag-3, описанный в данном документе, предусматривает ген Lag-3, который имеет второй, третий и четвертый экзоны, каждый из которых имеет последовательность, по сути, идентичную или идентичную второму, третьему и четвертому экзонам, представленным
15 в SEQ ID NO: 5.

[00129] В различных вариантах осуществления гуманизованный ген Lag-3, описанный в данном документе, содержит последовательность, которая по меньшей мере на 50% (например, на 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или больше) идентична SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO:
20 10 или SEQ ID NO: 11.

[00130] В различных вариантах осуществления гуманизованный ген Lag-3, описанный в данном документе, содержит последовательность, которая, по сути, идентична или идентична SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 11.

[00131] В различных вариантах осуществления гуманизованный ген Lag-3,
25 описанный в данном документе, представляет собой или содержит SEQ ID NO: 10.

[00132] В различных вариантах осуществления гуманизованный ген Lag-3, описанный в данном документе, представляет собой или содержит SEQ ID NO: 11.

[00133] В различных вариантах осуществления гуманизованный ген Lag-3, описанный в данном документе, содержит экзоны 1, 5, 6, 7 и 8 гена Lag-3, отличного
30 от человеческого, например эндогенного гена Lag-3 животного, отличного от человека.

[00134] В различных вариантах осуществления гуманизованный ген Lag-3, описанный в данном документе, содержит первый, пятый, шестой, седьмой и восьмой экзоны, каждый из которых имеет последовательность, которая по меньшей мере на 50% (например, на 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%,
35 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или больше) идентична первому, пятому, шестому, седьмому и восьмому экзонам, представленным в SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3.

[00135] В различных вариантах осуществления гуманизованный ген Lag-3, описанный в данном документе, содержит первый, пятый, шестой, седьмой и восьмой экзоны, каждый из которых имеет последовательность, которая, по сути, идентична
40 или идентична первому, пятому, шестому, седьмому и восьмому экзонам, представленным в SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3.

[00136] В различных вариантах осуществления гуманизованный ген Lag-3, описанный в данном документе, содержит 5'-нетранслируемый участок и 3'-нетранслируемый участок гена Lag-3, отличного от человеческого, например,
45 эндогенного гена Lag-3 животного, отличного от человека.

[00137] В различных вариантах осуществления гуманизованный ген Lag-3, описанный в данном документе, содержит 5'-нетранслируемый участок и 3'-нетранслируемый участок, каждый из которых имеет последовательность, которая по

меньшей мере на 50% (например, на 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или больше) идентична 5'-нетранслируемому участку и 3'-нетранслируемому участку, представленному в SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3.

5 [00138] В различных вариантах осуществления гуманизированный ген Lag-3, описанный в данном документе, содержит 5'-нетранслируемый участок и 3'-нетранслируемый участок, каждый из которых имеет последовательность, которая, по сути, идентична или идентична 5'-нетранслируемому участку и 3'-нетранслируемому участку, представленному в SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3.

10 [00139] В различных вариантах осуществления гуманизированный ген Lag-3, описанный в данном документе, содержит нуклеотидную кодирующую последовательность (например, последовательность кДНК), которая по меньшей мере на 50% (например, на 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или больше) идентична нуклеотидной кодирующей последовательности, представленной в SEQ ID NO: 7.

15 [00140] В различных вариантах осуществления гуманизированный ген Lag-3, описанный в данном документе, содержит нуклеотидную кодирующую последовательность (например, последовательность кДНК), которая, по сути, идентична или идентична нуклеотидной кодирующей последовательности, представленной в SEQ ID NO: 7.

20 [00141] В различных вариантах осуществления гуманизированный ген Lag-3, описанный в данном документе, кодирует полипептид Lag-3, имеющий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 50% (например, на 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или больше) идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 8.

25 [00142] В различных вариантах осуществления гуманизированный ген Lag-3, описанный в данном документе, кодирует полипептид Lag-3, имеющий аминокислотную последовательность, которая практически идентична или идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 8.

30 [00143] В различных вариантах осуществления гуманизированный полипептид Lag-3, продуцируемый животным, отличным от человека, описанным в данном документе, имеет внеклеточную часть, причем эта внеклеточная часть содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 50% (например, на 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или больше) идентична аминокислотным остаткам 29-260 из SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 8.

35 [00144] В различных вариантах осуществления гуманизированный полипептид Lag-3, продуцируемый животным, отличным от человека, имеет внеклеточную часть, которая, по сути, идентична внеклеточной части (например, внеклеточной части, которая содержит первые два Ig-подобных домена) человеческого полипептида LAG-3. В некоторых вариантах осуществления внеклеточная часть человеческого полипептида LAG-3 представлена аминокислотными остатками 21-260, 23-260 или 29-260 человеческого полипептида LAG-3, такого как человеческий полипептид LAG-3, изложенный в SEQ ID NO: 6.

40 [00145] В различных вариантах осуществления гуманизированный полипептид Lag-3, продуцируемый животным, отличным от человека, описанным в данном документе, имеет внеклеточную часть, причем эта внеклеточная часть содержит аминокислотную последовательность, которая, по сути, идентична или идентична аминокислотным остаткам 29-260 из SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 8.

[00146] В различных вариантах осуществления гуманизированный полипептид Lag-3, продуцируемый животным, отличным от человека, описанным в данном документе, имеет внеклеточную часть, причем эта внеклеточная часть содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 50% (например, на 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или больше) идентична аминокислотным остаткам 23-260 из SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 8.

[00147] В различных вариантах осуществления гуманизированный полипептид Lag-3, продуцируемый животным, отличным от человека, описанным в данном документе, имеет внеклеточную часть, причем эта внеклеточная часть содержит аминокислотную последовательность, которая, по сути, идентична или идентична аминокислотным остаткам 23-260 из SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 8.

[00148] В различных вариантах осуществления гуманизированный полипептид Lag-3, продуцируемый животным, отличным от человека, описанным в данном документе, имеет внеклеточную часть, причем эта внеклеточная часть содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 50% (например, на 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или больше) идентична аминокислотным остаткам 21-260 из SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 8.

[00149] В различных вариантах осуществления гуманизированный полипептид Lag-3, продуцируемый животным, отличным от человека, описанным в данном документе, имеет внеклеточную часть, причем эта внеклеточная часть содержит аминокислотную последовательность, которая, по сути, идентична или идентична аминокислотным остаткам 21-260 из SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 8.

[00150] В различных вариантах осуществления гуманизированный полипептид Lag-3, продуцируемый животным, отличным от человека, описанным в данном документе, имеет трансмембранную часть и цитоплазматическую часть полипептида Lag-3, отличного от человеческого, например трансмембранный и цитоплазматический домены эндогенного полипептида Lag-3 животного, отличного от человека. В некоторых вариантах осуществления последовательности трансмембранного и цитоплазматического доменов полипептида Lag-3, отличного от человеческого, представляют собой последовательности, показанные на фигуре 8. В некоторых вариантах осуществления гуманизированный полипептид Lag-3, продуцируемый животным, отличным от человека, описанным в данном документе, также имеет внеклеточную часть, содержащую последних два Ig-подобных домена полипептида Lag-3, отличного от человеческого.

[00151] В различных вариантах осуществления гуманизированный полипептид Lag-3, продуцируемый животным, отличным от человека, описанным в данном документе, имеет аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 50% (например, на 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или больше) идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8.

[00152] В различных вариантах осуществления гуманизированный полипептид Lag-3, продуцируемый животным, отличным от человека, описанным в данном документе, имеет аминокислотную последовательность, которая, по сути, идентична или идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8.

[00153] Предусмотрены композиции и способы для получения животных, отличных от человека, которые экспрессируют гуманизированный полипептид Lag-3, в том числе конкретные полиморфные формы, аллельные варианты (например, с различиями по отдельным аминокислотам) или изоформы, полученные в результате альтернативного

сплайсинга, в том числе композиции и способы для получения животных, отличных от человека, которые экспрессируют такие полипептиды под контролем человеческой промоторной и человеческой регуляторной последовательностей. В некоторых вариантах осуществления также предусмотрены композиции и способы для получения животных, отличных от человека, которые экспрессируют такие белки под контролем промотора, отличного от человеческого, и регуляторной последовательности, отличной от человеческой. В некоторых вариантах осуществления также обеспечиваются композиции и способы для получения животных, отличных от человека, которые экспрессируют такие белки под контролем эндогенного промотора и эндогенной регуляторной последовательности. В некоторых определенных вариантах осуществления эндогенные промоторы и эндогенные регуляторные последовательности представляют собой эндогенные промоторы грызунов и эндогенные регуляторные последовательности грызунов. Способы включают вставку генетического материала, кодирующего полный или неполный человеческий полипептид LAG-3, в точное местоположение в геноме животного, отличного от человека, которое соответствует эндогенному гену Lag-3, за счет чего создают гуманизированный ген Lag-3, который экспрессирует белок Lag-3, являющийся полностью или частично человеческим. В некоторых вариантах осуществления способы включают вставку геномной ДНК, соответствующей экзонам 2, 3 и 4 гена LAG-3 человека, в эндогенный ген Lag-3 животного, отличного от человека, за счет чего создают гуманизированный ген, который кодирует полипептид Lag-3, содержащий человеческую часть, содержащую аминокислоты, кодируемые вставленными экзонами.

[00154] При необходимости кодирующий участок генетического материала или полинуклеотидной(полинуклеотидных) последовательности(последовательностей), кодирующую полный или неполный человеческий (или гуманизированный) полипептид Lag-3, можно модифицировать с тем, чтобы она содержала кодоны, оптимизированные для экспрессии в клетках животного, отличного от человека (см., например, патенты США №№5670356 и 5874304). Кодон-оптимизированные последовательности представляют собой синтетические последовательности и предпочтительно кодируют идентичный полипептид (или биологически активный фрагмент полноразмерного полипептида, обладающий практически такой же активностью, как и полноразмерный полипептид), кодируемый исходным полинуклеотидом, не являющимся кодон-оптимизированным. В некоторых вариантах осуществления кодирующий участок генетического материала, кодирующий полный или неполный человеческий (или гуманизированный) полипептид Lag-3, может предусматривать измененную последовательность для оптимизации частоты использования кодонов для конкретного типа клеток (например, клетки грызуна). Например, кодоны геномной ДНК, соответствующие экзонам 2, 3 и 4 гена LAG-3 человека, подлежащим вставке в эндогенный ген Lag-3 животного, отличного от человека (например, грызуна), можно оптимизировать для экспрессии в клетке животного, отличного от человека. Такая последовательность может быть описана как последовательность, подвергнутая оптимизации кодонов.

[00155] Способы получения трансгенных животных, отличных от человека, в том числе нокауты и нокины, хорошо известны в данной области (см., например, Gene Targeting: A Practical Approach, Joyner, ed., Oxford University Press, Inc. (2000)). Например, получение трансгенных грызунов может необязательно подразумевать разрушение генетических локусов одного или более эндогенных генов грызуна (или сегментов гена) и введение одного или более гетерологичных генов (или последовательностей),

кодирующих Lag-3) в геном грызуна, в некоторых вариантах осуществления в том же местоположении, что и эндогенный ген грызуна (или сегменты гена).

[00156] В некоторых вариантах осуществления гетерологичные (или гуманизированные) гены Lag-3 или гетерологичные последовательности, кодирующие Lag-3, описанные в данном документе, случайным образом вводят в геном грызуна. В таких вариантах осуществления грызунов, имеющих, содержащих или иным образом несущих случайно введенные гетерологичные (или гуманизированные) гены Lag-3 или гетерологичные последовательности, кодирующие Lag-3, можно охарактеризовать как имеющие гетерологичный трансген Lag-3 или гетерологичную трансгенную конструкцию Lag-3. Как правило, трансген и/или трансгенная конструкция содержит, среди прочих, последовательность нуклеиновой кислоты (кодирующую, например, полный или неполный полипептид, представляющий интерес), которую человек вводит в клетку, отличную от человеческой (например, эмбриональную стволовую клетку грызуна) при помощи способов, описанных в данном документе, или известных в данной области. Кроме того, трансген может быть частично или полностью гетерологичным, т.е. чужеродным, для животного, отличного от человека, или клетки, в которую его вводят. Трансген может дополнительно содержать одну или более последовательностей регуляции транскрипции и любую другую нуклеиновую кислоту, такую как интроны или промоторы, которые могут быть необходимы для экспрессии выбранной последовательности нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления гетерологичные (или гуманизированные) гены Lag-3 или гетерологичные последовательности, кодирующие Lag-3, описанные в данном документе, вводят в эндогенный ген Lag-3 в геноме грызуна; в некоторых определенных вариантах осуществления эндогенный локус гена Lag-3 изменяют, модифицируют или конструируют с тем, чтобы он содержал человеческие последовательности (или фрагменты гена) Lag-3, функционально связанные с одной или более отличными от человеческих последовательностями (или фрагментами гена) Lag-3.

[00157] В подходе с гуманизированным геном Lag-3 используют относительно минимальную модификацию эндогенных белковых взаимодействий и передачи сигнала, и в результате это приводит к естественной сигнальной трансдукции, опосредованной Lag-3, у животного, отличного от человека, в различных вариантах осуществления, поскольку геномные последовательности Lag-3 модифицированы в одном фрагменте и таким образом сохраняют нормальные функциональные свойства благодаря включению необходимых регуляторных последовательностей. Таким образом, в таких вариантах осуществления модификация гена Lag-3 не влияет на другие окружающие гены или другие эндогенные гены, взаимодействующие с Lag-3 (например, молекулы МНС класса II). Дополнительно в различных вариантах осуществления модификация не влияет на сборку функционального трансмембранного полипептида Lag-3 на клеточной мембране и сохраняет нормальные эффекторные функции посредством связывания и последующей сигнальной трансдукции с помощью цитоплазматической части полипептида, которая не подвергнута влиянию модификации.

[00158] Схематическая иллюстрация (без соблюдения масштаба) геномной организации эндогенного мышинового гена Lag-3 и гена LAG-3 человека приведена на фигуре 1. Иллюстративный способ гуманизации эндогенного мышинового гена Lag-3 с использованием геномного фрагмента, содержащего экзоны 2, 3 и 4 и часть интрона 4 (например, приблизительно 68 п. о.) гена LAG-3 человека, приведен на фигуре 3. Как проиллюстрировано, фрагмент синтетической ДНК размером 1741 п. о., соответствующий экзонам 2, 3 и 4 и части интрона 4 гена LAG-3 человека, вставляют

в место последовательности локуса эндогенного мышинового гена Lag-3 размером 1750 п. о. с помощью целенаправленно воздействующей конструкции. Фрагмент синтетической ДНК размером 1741 п. о. можно клонировать непосредственно из человеческой ДНК или синтезировать из исходной последовательности (например, имеющей № доступа в GenBank NM_002286.5, SEQ ID NO: 9). Эта геномная ДНК содержит часть гена, которая кодирует по меньшей мере аминокислотные остатки 29-260 (или 23-260 или 21-260) человеческого полипептида LAG-3, отвечающие за связывание с лигандом.

[00159] Животное, отличное от человека (например, мышь), имеющее гуманизированный ген Lag-3 в эндогенном локусе Lag-3, можно получить любым способом, известным в данной области. Например, можно получить целенаправленно воздействующий вектор, с помощью которого вводят полный или неполный ген LAG-3 человека вместе с селективным маркерным геном. На фигуре 3 проиллюстрирован целенаправленно воздействующий вектор, который содержит эндогенный локус Lag-3 генома мыши, содержащий вставку фрагмента синтетической ДНК размером 1741 п. о., который соответствует экзонам 2-4 и первым 68 п. о. интрона 4 гена LAG-3 человека. Как проиллюстрировано, целенаправленно воздействующая конструкция содержит 5'-гомологичный участок, содержащий последовательность выше экзона 2 (т.е. экзон 1 и т.д.) эндогенного мышинового гена Lag-3 (~46 т.о.), после которого расположены фрагмент синтетической ДНК размером 1741 п. о., кассету для отбора по устойчивости к лекарственному средству (например, ген устойчивости к неомицину, фланкированный с обеих сторон последовательностями loxP; ~5 т.о.) и 3'-гомологичный участок, содержащий остальную часть последовательности эндогенных мышинных экзонов 5-8 эндогенного мышинового гена Lag-3 (~53 т.о.). Целенаправленно воздействующая конструкция содержит самоудаляющуюся кассету для отбора по чувствительности к лекарственному средству (например, ген устойчивости к неомицину, фланкированный последовательностями loxP; см. патенты США №№8697851, 8518392 и 8354389, все из которых включены в данный документ посредством ссылки). При электропорации в эмбриональных стволовых клетках создают модифицированный эндогенный ген Lag-3, в котором происходит замена 1750 п. о. эндогенного мышинового гена Lag-3 дикого типа на 1741 п. о. гена LAG-3 человека (т.е. экзоны 2-4 и первые 68 п. о. интрона 4), которые содержатся в целенаправленно воздействующем векторе. Создают гуманизированный ген Lag-3, что приводит к получению клетки или животного, отличного от человека, которые экспрессируют гуманизированный полипептид Lag-3, содержащий аминокислоты, кодируемые фрагментом синтетической ДНК размером 1741 п. о. (т.е. экзонами 2-4 и первыми 68 п. о. интрона 4 гена LAG-3 человека). Кассету для отбора по устойчивости к лекарственному средству удаляют способом, зависимым от развития, т.е. у потомства, происходящего от мышей, клетки зародышевой линии которых содержат гуманизированный ген Lag-3, описанный выше, будет утрачиваться селективируемый маркер из дифференцированных клеток в ходе развития (см. нижнюю часть фигуры 3).

[00160] В некоторых вариантах осуществления животное, отличное от человека, имеющее гуманизированный ген Lag-3, описанный в данном документе, можно охарактеризовать как трансгенное по гуманизированному гену Lag-3 или трансгенное по Lag-3 животное, отличное от человека. Такие описания используются в данном документе взаимозаменяемо и относятся к любому животному неприродного происхождения, отличному от человека, в котором одна или более клеток животного, отличного от человека, содержат гетерологичную последовательность нуклеиновой

кислоты Lag-3 и/или полную или неполную последовательности, кодирующие Lag-3, описанные в данном документе. В некоторых вариантах осуществления гетерологичную последовательность нуклеиновой кислоты Lag-3 и/или полную или неполную последовательности, кодирующие Lag-3, вводят в клетку прямо или опосредованно, путем введения в клетку-предшественника, путем преднамеренной генетической манипуляции, например с помощью микроинъекции, или путем инфицирования рекомбинантным вирусом. В таких вариантах осуществления генетическая манипуляция не включает классические методики скрещивания, а скорее направлена на введение рекомбинантной(рекомбинантных) молекулы(молекул) ДНК, которые содержат гетерологичную последовательность нуклеиновой кислоты Lag-3 и/или полную или неполную последовательности, кодирующие Lag-3, описанные в данном документе. Такая молекула может быть интегрирована в хромосому или может быть внехромосомно реплицирующейся ДНК. Описанные в данном документе трансгенные животные, отличные от человека, включают животных, которые являются гетерозиготными или гомозиготными по гетерологичной последовательности нуклеиновой кислоты Lag-3 и/или полной или неполной последовательностей, кодирующих Lag-3, и/или животных, которые имеют одну или более копий гетерологичной последовательности нуклеиновой кислоты Lag-3 и/или полной или неполной последовательностей, кодирующих Lag-3, описанных в данном документе.

[00161] Трансгенное животное-родоначальника, отличное от человека, можно идентифицировать на основе присутствия гуманизированного гена Lag-3 в его геноме и/или экспрессии полипептидов Lag-3, содержащих аминокислоты, кодируемые вставленным генетическим материалом, в тканях или клетках животного, отличного от человека. Затем трансгенное животное-родоначальника, отличное от человека, можно использовать для разведения дополнительных животных, отличных от человека, несущих гуманизированный ген Lag-3, создавая тем самым ряд животных, отличных от человека, каждое из которых несет одну или более копий гуманизированного гена Lag-3. Более того, трансгенных животных, отличных от человека, несущих гуманизированный ген Lag-3, можно дополнительно скрестить с другими трансгенными животными, отличными от человека, несущими другие трансгены (например, гены человеческого иммуноглобулина), если это необходимо.

[00162] Трансгенных животных, отличных от человека, можно также получить с тем, чтобы они содержали выбранные системы, которые позволяют регулировать экспрессию гуманизированного гена Lag-3 (или гуманизированного трансгена Lag-3) или управлять ею. Иллюстративные системы предусматривают систему рекомбиназ Cre/loxP из бактериофага P1 (см., например, Lakso, M. et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89:6232-6236) и систему рекомбиназ FLP/Frt из *S. cerevisiae* (O'Gorman, S. et al, 1991, Science 251:1351-1355). Таких животных можно получить путем разработки «дважды» трансгенных животных, например путем спаривания двух трансгенных животных, при этом одно содержит трансген, содержащий выбранную модификацию (например, гуманизированный ген или трансген Lag-3), а другое содержит трансген, кодирующий рекомбиназу (например, рекомбиназу Cre).

[00163] Животных, отличных от человека, описанных в данном документе, можно получить, как описано выше, или с использованием способов, известных в данной области, таким образом, чтобы они содержали дополнительные человеческие или гуманизированные гены, зачастую в зависимости от предполагаемого применения животного, отличного от человека. Генетический материал таких дополнительных человеческих или гуманизированных генов можно вводить посредством дальнейшего

изменения генома клеток (например, эмбриональных стволовых клеток), имеющих генетические модификации, как описано выше, или с помощью методов скрещивания, известных в данной области, с другими генетически модифицированными линиями, при желании. В некоторых вариантах осуществления животных, отличных от человека, описанных в данном документе, получают таким образом, чтобы они дополнительно содержали один или более человеческих или гуманизированных генов, выбранных из белка запрограммированной гибели клетки-1 (PD-1), лиганда-1 белка запрограммированной гибели клетки-1 (PD-L1) и ассоциированного с цитотоксическим Т-лимфоцитом белка-4 (CTLA-4). В некоторых вариантах осуществления животных, отличных от человека, описанных в данном документе, можно получить путем введения целенаправленно воздействующего вектора, описанного в данном документе, в клетку из модифицированной линии. В некоторых вариантах осуществления животных, отличных от человека, описанных в данном документе, получают таким образом, чтобы они дополнительно содержали человеческий или гуманизированный ген белка запрограммированной гибели клетки-1 (Pdc1). В некоторых вариантах осуществления животные, отличные от человека, описанные в данном документе, содержат гуманизированный ген Lag-3, описанный в данном документе, и генетический материал от гетерологичного вида (например, от людей), где генетический материал кодирует полный или неполный один или более гетерологичных белков, выбранных из белка запрограммированной гибели клетки-1 (PD-1), лиганда-1 белка запрограммированной гибели клетки-1 (PD-L1) и ассоциированного с цитотоксическим Т-лимфоцитом белка-4 (CTLA-4). В некоторых определенных вариантах осуществления животное, отличное от человека, описанное в данном документе, содержит гуманизированный ген Lag-3, описанный в данном документе, и генетический материал от гетерологичного вида (например, от людей), где генетический материал кодирует полный или неполный гетерологичный (например, человека) полипептид PD-1. В некоторых определенных вариантах осуществления животные, отличные от человека, описанные в данном документе, дополнительно содержат ген Pdc1, который содержит эндогенную часть и человеческую часть (например, полные или неполные экзон 2 и экзон 3 гена PDCD1 человека), где человеческая часть кодирует, по сути, весь внеклеточный домен человеческого полипептида PD-1 (например, аминокислоты, соответствующие остаткам 27-169 или 26-169 человеческого полипептида PD-1), а эндогенная часть кодирует внутриклеточный домен эндогенного полипептида PD-1; в некоторых вариантах осуществления человеческая часть и эндогенная часть функционально связаны с эндогенным промотором Pdc1. В некоторых определенных вариантах осуществления животные, отличные от человека, описанные в данном документе, дополнительно содержат ген Pdc1, который содержит генетический материал, кодирующий, по сути, весь внеклеточный домен человеческого полипептида PD-1 (например, генетический материал, который кодирует аминокислоты, соответствующие остаткам 27-169 или 26-169 человеческого полипептида PD-1; см., например, SEQ ID NO: 23 из PCT/US 15/36649, поданной 19 июня 2015 г. и опубликованной как WO 2015196051, и/или SEQ ID NO: 23 из заявки на патент США №14/744592, поданной 19 июня 2015 г. и опубликованной как US 2015-0366174 A1; включенные в данный документ посредством ссылки). №№ доступа в GenBank NM_005018.2 и NP_005009.2 и UniProt ID Q15116 обеспечивают репрезентативный источник последовательностей гена PDCD1 человека и человеческого полипептида PD-1, из которых можно получить необходимую человеческую часть.

[00164] Например, описанные в данном документе животные, отличные от человека, содержащие гуманизированный ген Lag-3, описанный в данном документе, могут

дополнительно содержать (например, в результате проведения стратегий кросс-бридинга или целенаправленного воздействия на множество генов) одну или более модификаций, как описано в PCT/US 15/36649, поданной 19 июня 2015 г. и опубликованной как WO 2015196051, и в заявке на патент США №14/744592, поданной 19 июня 2015 г. и опубликованной как US 2015-0366174 A1; при этом данные заявки включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. В определенных вариантах осуществления грызуна, содержащего гуманизированный ген Lag-3, описанный в данном документе, скрещивают с грызуном, содержащим гуманизированный ген Pdc1 (например, экзон 2 и часть экзона 3 гена PDCD1 человека, функционально связанные с экзоном 1, частью экзона 3, 4 и 5 эндогенного гена Pdc1 грызуна, с тем, чтобы гуманизированный ген Pdc1 кодировал полипептид PD-1, который содержит внеклеточную часть из человеческого полипептида PD-1 (например, соответствующую аминокислотным остаткам 27-169 или 26-169) и внутриклеточную часть из полипептида PD-1 грызуна (см., например, SEQ ID NO: 5 и 6 из PCT/US 15/36649, поданной 19 июня 2015 г. и опубликованной как WO 2015196051, и/или SEQ ID NO: 5 и 6 из заявки на патент США №14/744592, поданной 19 июня 2015 г. и опубликованной как US 2015-0366174 A1; включенные в данный документ посредством ссылки). В определенных вариантах осуществления грызуна, содержащего гуманизированный ген Lag-3, описанный в данном документе, скрещивают с грызуном, содержащим гуманизированный ген Pdc1, при этом гуманизированный ген Pdc1 содержит генетический материал, который кодирует внеклеточный домен человеческого полипептида PD-1 (например, генетический материал, который кодирует аминокислоты, соответствующие остаткам 27-169 или 26-169 человеческого полипептида PD-1; см., например, SEQ ID NO: 23 из PCT/US 15/36649, поданной 19 июня 2015 г. и опубликованной как WO 2015196051, и/или SEQ ID NO: 23 из заявки на патент США №14/744592, поданной 19 июня 2015 г. и опубликованной как US 2015-0366174 A1; включенные в данный документ посредством ссылки).

[00165] В некоторых вариантах осуществления гуманизированный ген Pdc1 содержит экзон 1, отличного от человеческого (например, грызуна) Pdc1, экзон 2 человеческого PDCD1, экзон 3 (который содержит часть экзона 3 гена PDCD1 человека и часть экзона 3 отличного от человеческого (например, грызуна) гена Pdc1) и экзоны 4-5 отличного от человеческого (например, грызуна) гена Pdc1, и где в некоторых вариантах осуществления часть экзона 3 гена PDCD1 человека представляет собой 5'-часть человеческого экзона 3, который кодирует аминокислоты как часть внеклеточного домена человеческого полипептида PD-1, такие как аминокислоты последовательности стебля PD-1, и при этом часть экзона 3 отличного от человеческого гена Pdc1 представляет собой 3'-часть отличного от человеческого экзона 3, который кодирует аминокислоты как часть трансмембранного домена отличного от человеческого полипептида PD-1. В конкретных вариантах осуществления гуманизированный ген Pdc1 кодирует гуманизированный полипептид PD-1, который содержит внеклеточный домен, который, по сути, идентичен внеклеточному домену человеческого полипептида PD-1, трансмембранный домен, который, по сути, идентичен трансмембранному домену полипептида PD-1 грызуна, и внутриклеточный домен полипептида PD-1 грызуна.

[00166] Хотя варианты осуществления, в которых используют гуманизированный ген Lag-3 мыши (т.е. мышь с геном Lag-3, кодирующим полипептид Lag-3, который содержит человеческую часть и мышиную часть), широко обсуждают в данном документе, при этом также предусмотрены другие животные, отличные от человека, которые содержат гуманизированный ген Lag-3. В некоторых вариантах осуществления

такие животные, отличные от человека, содержат гуманизированный ген Lag-3, функционально связанный с промотором Lag-3 грызуна. В некоторых вариантах осуществления такие животные, отличные от человека, содержат гуманизированный ген Lag-3, функционально связанный с эндогенным промотором Lag-3; в некоторых вариантах осуществления с эндогенным промотором Lag-3 грызуна. В некоторых вариантах осуществления такие животные, отличные от человека, экспрессируют гуманизированный полипептид Lag-3 из эндогенного локуса, где гуманизированный полипептид Lag-3 содержит по меньшей мере аминокислотные остатки 29-260 (например, 29-260, 23-260 или 21-260) человеческого полипептида LAG-3. Такие животные, отличные от человека, включают любых из тех, которых можно генетически модифицировать для экспрессии полипептида Lag-3, раскрытого в данном документе, в том числе, например млекопитающих, например, мышь, крысу, кролика, свинью, бычьих (например, корову, быка, буйвола), оленя, овцу, козу, курицу, кошку, собаку, хорька, примата (например, игрунку, макака-резуса) и т.д. Например, для тех животных, отличных от человека, для которых подходящие генетически модифицируемые ES-клетки являются труднодоступными, используют другие способы для получения животного, отличного от человека, содержащего генетическую модификацию. Такие способы включают, например, модификацию генома клеток, отличных от ES-клеток (например, фибробласта или индуцированной плюрипотентной клетки), и использование переноса ядер соматических клеток (SCNT) для переноса генетически модифицированного генома в подходящую клетку, например, в знуклеированный ооцит, и вынашивание модифицированной клетки (например, модифицированного ооцита) животным, отличным от человека, в подходящих условиях с образованием эмбриона.

[00167] Способы модификации генома животного, отличного от человека (например, генома свиньи, коровы, грызуна, курицы и т.д.), включают, например, использование нуклеазы с «цинковыми пальцами» (ZFN), эффекторной нуклеазы, подобной активатору транскрипции (TALEN), или Cas-белка (т.е. системы CRISPR/Cas) для модификации генома с тем, чтобы он содержал гуманизированный ген Lag-3 и/или гуманизированный ген Pcd1.

Способы, в которых используют животных, отличных от человека, имеющих гуманизированные гены Lag-3

[00168] Применение гуманизированных мышей для биомедицинских исследований позволило понять различные аспекты функции клеток человека, в частности, иммунных клеток человека. Действительно, применение различных иммунокомпрометированных линий обеспечило ценные системы *in vivo* для исследования иммунных клеток человека. Тем не менее, в их случае не обойтись без ограничений. Например, применение этих моделей выявило явные различия в биологии млекопитающих, в частности в иммунологии млекопитающих. Применение иммунокомпрометированных мышей для оценки иммуномодуляции мишеней не является идеальным, поскольку аберрантная иммунная функция, наблюдаемая у таких мышей, часто усложняет понимание демонстрируемых фенотипов. Это особенно верно в контексте иммунного ответа на опухоли. До недавнего времени исследование иммунных ответов на опухоли (например, ответов Т-клеток) у мышей искажалось, среди прочего, несоответствием HLA из-за разных источников (т.е. доноров) привитых человеческих клеток (Shultz, L.D. et al., 2010, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 107(29): 13022-7).

[00169] Опухолевые клетки могут избегать иммунного распознавания и эффекторного ответа, за счет изменения ко-стимулирующих путей в Т-клетках. Ко-стимулирующие пути опосредуют баланс между активацией Т-клеток, толерантностью и

иммуноопосредованным повреждением тканей путем регуляции степени и продолжительности иммунного ответа в среде антигенной стимуляции. Ген активации лимфоцитов-3 (Lag-3) является отрицательным регулятором активности Т-клеток и контролирует размер пула Т-клеток памяти (Workman, C.J. et al., 2004, J. Immunol. 172:

5 5450-5). Сообщалось о функциональной роли Lag-3 на коммитированных CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетках, и при этом повышение экспрессии Lag-3 на этих клетках после взаимодействия с рецептором Т-клеток (TCR) приводит к отрицательным эффектам в отношении пролиферации, активации и продуцирования провоспалительных цитокинов Т-клеток (Huard, B. et al., 1994, Eur. J. Immunol. 24(12):3216-21; Huard, B. et al., 1994, Immunogenetics 39(3):213-7; Macon-Lemaitre, L. and F. Triebel, 2005, Immunol. 115:170-8; Goldberg, M.V. and C.G. Drake, 2011, Curr. Top. Microbiol. Immunol. 344:269-78). Сообщали, что блокада Lag-3 усиливает противоопухолевый ответ в Т-клетках (Grosso, J.F. et al., 2007, J. Clin. Invest. 117:3383-92). Другие ингибиторные рецепторы, вовлеченные в отрицательную регуляцию активности Т-клеток, включают белок запрограммированной гибели клеток-1 (PD-1) и ассоциированный с цитотоксическим Т-лимфоцитом белок-4 (CTLA-4). Наряду со своими лигандами, лигандом-1 белка запрограммированной гибели клетки-1 (PD-L1, B7-H1 или CD274) и PD-L2 (B7-DC или CD273), PD-1 обеспечивает сигнал контрольной точки, критически важный для создания и поддержания иммунной толерантности к окружающей среде и аутоантигенам (Francisco, L.M. et al., 2010, Immunol. Rev. 236:219-42). Сообщали, что PD-1, подобно Lag-3, играет роль в уклонении от противоопухолевого иммунитета, позволяя опухолевым клеткам избегать иммунного надзора иммунной системы хозяина (Zou, C. 2008, Nat. Rev. Immunol. 8:467-77).

[00170] Настоящее изобретение, среди прочего, основано на признании того, что экспрессия этих ингибиторных рецепторов связана с нарушенной антигенспецифической функцией Т-клеток в контексте рака. Настоящее изобретение также основано на признании того, что создание системы *in vivo*, в которой используются контрольные точки иммунного ответа, может быть выполнено с использованием гуманизированного гена Lag-3 и/или гуманизированного гена *Pdcd1*, описанных в данном документе. Такая улучшенная система *in vivo* позволяет разрабатывать терапевтические средства на основе антител к контрольным точкам иммунного ответа и/или схемы лечения, которые направлены на стимуляцию противоопухолевого иммунитета у пациентов с раком. Кроме того, такая улучшенная система *in vivo* также обеспечивает разработку терапевтических средств и/или схем лечения, которые направлены на увеличение активности Т-клеток при инфекционных и/или аутоиммунных заболеваниях.

35 [00171] Животные, отличные от человека, описанные в данном документе, обеспечивают улучшенную систему *in vivo* и источник биологических материалов (например, клеток), экспрессирующих человеческий (или гуманизированный) Lag-3, которые являются применимыми в ряде анализов. В различных вариантах осуществления животных, отличных от человека, описанных в данном документе, используют для разработки терапевтических средств, которые нацелены на Lag-3 и/или модулируют передачу сигнала Lag-3 (например, нарушая взаимодействия с партнерами по связыванию Lag-3, такими как молекулы МНС класса II). В различных вариантах осуществления животных, отличных от человека, описанных в данном документе, используют для скрининга и разработки кандидатных терапевтических средств (например, антител), которые блокируют взаимодействие Lag-3 человека с молекулами МНС класса II человека. В различных вариантах осуществления животных, отличных от человека, описанных в данном документе, применяют для определения профиля связывания антагонистов и/или агонистов гуманизированного Lag-3 на поверхности

клетки животного, отличного от человека, описанного в данном документе; в некоторых вариантах осуществления животных, отличных от человека, описанных в данном документе, используют для определения эпитопа или эпитопов для одного или более кандидатных терапевтических антител, которые связывают человеческий Lag-3.

5 [00172] В различных вариантах осуществления животных, отличных от человека, описанных в данном документе, используют для определения фармакокинетических профилей антител к Lag-3. В различных вариантах осуществления одно или более животных, отличных от человека, описанных в данном документе, и одно или более контрольных или эталонных животных, отличных от человека, подвергают воздействию
10 одного или более кандидатных терапевтических антител к Lag-3 в различных дозах (например, 0,1 мг/кг, 0,2 мг/кг, 0,3 мг/кг, 0,4 мг/кг, 0,5 мг/кг, 1 мг/кг, 2 мг/кг, 3 мг/кг, 4 мг/кг, 5 мг/кг, 7,5 мг/кг, 10 мг/кг, 15 мг/кг, 20 мг/кг, 25 мг/кг, 30 мг/кг, 40 мг/кг или 50 мг/кг или больше). Кандидатные терапевтические антитела можно дозировать посредством любого необходимого пути введения, включающего парентеральный и
15 непарентеральный пути введения. Парентеральные пути включают, например, внутривенный, внутриартериальный, интрапортальный, внутримышечный, подкожный, внутрибрюшинный, интраспинальный, интратекальный, интрацеребровентрикулярный, интракраниальный, интраплевральный или другие пути введения. Непарентеральные пути включают, например, пероральный, интраназальный, трансдермальный,
20 ингаляционный, ректальный, трансбуккальный, вагинальный, внутриглазной. Введение также можно осуществлять посредством непрерывной инфузии, локального введения, замедленного высвобождения из имплантатов (гелей, мембран и т.п.) и/или внутривенной инъекции. У животных, отличных от человека (гуманизированных и контрольных), отбирают кровь в различные моменты времени (например, 0 ч, 6 ч, 1 день, 2 дня, 3 дня,
25 4 дня, 5 дней, 6 дней, 7 дней, 8 дней, 9 дней, 10 дней, 11 дней или до 30 или более дней). Можно проводить различные анализы для определения фармакокинетических профилей вводимых кандидатных терапевтических антител с применением образцов, полученных от животных, отличных от человека, описанных в данном документе, в том числе без ограничения уровня общего IgG, гуморального ответа на терапевтические антитела,
30 агглютинации и т.д.

[00173] В различных вариантах осуществления животных, отличных от человека, описанных в данном документе, используют для измерения терапевтического эффекта блокирования или модулирования передачи сигналов, опосредованных Lag-3, и эффекта в отношении экспрессии генов в результате клеточных изменений. В различных
35 вариантах осуществления животное, отличное от человека, описанное в данном документе, или клетки, выделенные из него, подвергают воздействию кандидатного терапевтического средства, которое связывается с гуманизированным полипептидом Lag-3 (или человеческой частью полипептида Lag-3) на поверхности клетки животного, отличного от человека, и по истечении последующего периода времени анализируют
40 на эффекты в отношении процессов, зависящих от Lag-3, например, адгезии, апоптоза, продуцирования цитокинов, воспаления, пролиферации, аутоотолерантности и вирусной инфекции (или ответов).

[00174] Животные, отличные от человека, описанные в данном документе, экспрессируют гуманизированный полипептид Lag-3, поэтому можно создавать клетки,
45 линии клеток и культуры клеток, служащие в качестве источника гуманизированного Lag-3, для применения в анализах связывания и функциональных анализах, например, для анализа связывания или функции антагониста или агониста Lag-3, в частности, если антагонист или агонист является специфичным к последовательности или эпитопу

человеческого Lag-3 или в качестве альтернативы специфичным к последовательности или эпитопу человеческого Lag-3, которые образуют ассоциации с молекулами МНС класса II. В различных вариантах осуществления эпитопы Lag-3, которые связывают кандидатные терапевтические антитела, можно определять с применением клеток, выделенных из животных, отличных от человека, описанных в данном документе. В различных вариантах осуществления гуманизированный полипептид Lag-3, экспрессируемый животным, отличным от человека, описанным в данном документе, может содержать вариант аминокислотной последовательности. В различных вариантах осуществления животные, отличные от человека, описанные в данном документе, экспрессируют вариант гуманизованного полипептида Lag-3. В различных вариантах осуществления вариант является полиморфным в положении аминокислоты, ассоциированном со связыванием лиганда. В различных вариантах осуществления животных, отличных от человека, описанных в данном документе, используют для определения эффекта связывания лиганда посредством взаимодействия с полиморфным вариантом человеческого Lag-3.

[00175] Клетки животных, отличных от человека, описанных в данном документе, можно выделять и использовать для конкретной цели или можно поддерживать в культуре в течение многих поколений. В различных вариантах осуществления клетки животного, отличного от человека, описанного в данном документе, иммортализируют (например, посредством использования вируса) и сохраняют в культуре в течение неопределенного времени (например, в последовательных культурах).

[00176] В различных вариантах осуществления клетки и/или животных, отличных от человека, описанных в данном документе, используют в различных схемах иммунизации для определения функций, опосредованных Lag-3, в иммунном ответе на антиген. В некоторых вариантах осуществления кандидатные терапевтические средства, которые связываются с человеческим (или гуманизированным) Lag-3 или блокируют одну или более его функций, характеризуют у животного, отличного от человека, описанного в данном документе. Подходящие измерения включают различные клеточные анализы, анализы пролиферации, анализ уровня сывороточных иммуноглобулинов (например, титра антител), анализы цитотоксичности и анализы иммунопреципитации (например, получение характеристик лиганд-рецепторных взаимодействий). В некоторых вариантах осуществления животных, отличных от человека, описанных в данном документе, используют для получения характеристик функций, опосредованных Lag-3, регулирующих иммунный ответ на антиген. В некоторых вариантах осуществления антиген ассоциирован с аутоиммунным заболеванием, нарушением или состоянием. В некоторых вариантах осуществления антиген ассоциирован с воспалительным заболеванием, нарушением или состоянием. В некоторых вариантах осуществления антиген ассоциирован с раком или новообразованием (например, HPV, HCV, HIV, EBV, HHV-8, HTLV-1, MCV и т.д.). В некоторых вариантах осуществления антиген представляет собой тестовый антиген (например, овальбумин или OVA). В некоторых вариантах осуществления антиген представляет собой мишень, ассоциированную с заболеванием или состоянием, от которого страдают один или более пациентов-людей, нуждающихся в лечении.

[00177] В различных вариантах осуществления животных, отличных от человека, описанных в данном документе, используют в анализах сыворотки крови для определения титров продуцируемых аутоантител для тестирования фармакотоксикологических аспектов кандидатных терапевтических средств, целенаправленно воздействующих на человеческий Lag-3. В некоторых вариантах

осуществления продуцирование аутоантител у животных, отличных от человека, описанных в данном документе, является следствием одного или более аутоиммунных заболеваний, нарушений или состояний, индуцированных у животного, отличного от человека.

5 [00178] В различных вариантах осуществления животных, отличных от человека, описанных в данном документе, используют для стимуляции одним или более антигенами для определения терапевтического потенциала соединений или биологических средств в отношении модулирования регуляции иммунного ответа, зависимой от Lag-3, в том числе без ограничения специфических ответов на указанный антиген, зависимых от Т-
10 клеток.

[00179] В различных вариантах осуществления клетки и/или животных, отличных от человека, описанных в данном документе, используют в анализе выживаемости и/или пролиферации (например, с использованием Т- и/или В-клеток) для скрининга и разработки кандидатных терапевтических средств, модулирующих передачу сигналов, опосредованную Lag-3 человека. Активация или потеря Lag-3 играет важную роль в регуляции Т-клеточных ответов, и регуляция аутоотолерантности с помощью Lag-3 может являться следствием активации специфических эпителиальных клеток внеклеточного домена Lag-3, и поэтому кандидатных модуляторов для Lag-3 (например, антагонистов или агонистов) можно идентифицировать, характеризовать и разрабатывать с
15 использованием клеток животных, отличных от человека, описанных в данном документе, и/или животного, отличного от человека, описанного в данном документе. В некоторых вариантах осуществления клетки и/или животных, отличных от человека, описанных в данном документе, используют в анализе(анализах) выживаемости или гибели для определения эффекта в отношении пролиферации или апоптоза конкретной
20 (конкретных) клетки(клеток) (например, раковых клеток) в присутствии и в отсутствие Lag-3.

[00180] В различных вариантах осуществления клетки и/или животных, отличных от человека, описанных в данном документе, используют в ксенотрансплантации гетерологичных (например, человеческих) клеток или ткани для определения функций, опосредованных Lag-3, в физиологическом (например, иммунном) ответе на
30 трансплантированные человеческие клетки или ткань. В некоторых вариантах осуществления кандидатные терапевтические средства, которые связываются с человеческим Lag-3 или блокируют одну или более его функций, характеризуют у животного, отличного от человека, описанного в данном документе. Подходящие измерения включают различные клеточные анализы, анализы пролиферации, анализ
35 уровня сывороточных иммуноглобулинов (например, титра антител), анализы цитотоксичности и получение характеристик лиганд-рецепторных взаимодействий (анализы иммунопреципитации). В некоторых вариантах осуществления животных, отличных от человека, описанных в данном документе, используют для получения характеристик функций, опосредованных Lag-3, регулирующих иммунный ответ на антиген. В некоторых вариантах осуществления антиген ассоциирован с новообразованием. В некоторых вариантах осуществления антиген ассоциирован с аутоиммунным заболеванием, нарушением или состоянием. В некоторых вариантах осуществления антиген ассоциирован с воспалительным заболеванием, нарушением
40 или состоянием. В некоторых вариантах осуществления антиген ассоциирован с раком или новообразованием. В некоторых вариантах осуществления антиген представляет собой мишень, ассоциированную с заболеванием или состоянием, от которого страдают один или более пациентов-людей, нуждающихся в лечении.

[00181] В различных вариантах осуществления животных, отличных от человека, описанных в данном документе, используют в экспериментах по трансплантации или адоптивному переносу для определения терапевтического потенциала соединений или биологических средств в отношении модулирования регуляции, зависимой от Lag-3, новых лимфоцитов и их иммунной функции. В различных вариантах осуществления животным, отличным от человека, описанным в данном документе, трансплантируют человеческие Т-клетки; в некоторых вариантах осуществления наивные Т-клетки; в некоторых вариантах осуществления активированные Т-клетки; в некоторых вариантах осуществления регуляторные Т-клетки (Treg); в некоторых вариантах осуществления Т-клетки памяти.

[00182] В различных вариантах осуществления клетки животных, отличных от человека, описанных в данном документе, используют в анализах Т-клеток для определения терапевтического потенциала соединений или биологических средств в отношении модулирования зависимой от Lag-3 регуляции ответа и функции, зависимых от Т-клеток. Иллюстративные анализы Т-клеток включают без ограничения ELISpot, внутриклеточное окрашивание цитокинов, анализ рестрикции по антигенам главного комплекса гистосовместимости (МНС), анализы супрессии вируса, анализы цитотоксичности, анализы пролиферации и анализы супрессии регуляторными Т-клетками.

[00183] В различных вариантах осуществления клетки животных, отличных от человека, описанных в данном документе, используют в анализах трансмиграции клеток для скрининга и разработки кандидатных терапевтических средств, модулирующих человеческий Lag-3. Трансмиграция клеток включает миграцию клеток через эндотелий, и анализы трансмиграции позволяют проводить измерение взаимодействий эндотелия с лейкоцитами или опухолевыми клетками и их трансмиграции через него.

[00184] В различных вариантах осуществления клетки животных, отличных от человека, описанных в данном документе, используют в анализах роста (или пролиферации) опухолевых клеток для определения терапевтического потенциала соединений или биологических средств в отношении модулирования регуляции, зависимых от Lag-3, апоптоза и/или ингибирования опухолевых клеток.

[00185] В различных вариантах осуществления клетки животных, отличных от человека, описанных в данном документе, используют в анализах продуцирования цитокинов для определения терапевтического потенциала соединений или биологических средств в отношении модулирования регуляции, зависимой от Lag-3, высвобождения цитокинов из Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления клетки животных, отличных от человека, описанных в данном документе, используют для выявления (и/или измерения) высвобождения внутриклеточных цитокинов в результате взаимодействия гуманизованного Lag-3 с лекарственным средством, целенаправленно воздействующим на человеческий LAG-3 или на партнера по связыванию Lag-3 (например, МНС класса II).

[00186] В различных вариантах осуществления у одного или более животных, отличных от человека, описанных в данном документе, индуцируют аутоиммунное заболевание, нарушение или состояние для обеспечения системы *in vivo* для определения терапевтического потенциала соединений или биологических средств в отношении модулирования регуляции, зависимой от Lag-3, одной или более функций при аутоиммунном заболевании, нарушении или состоянии. Аутоиммунные заболевания, нарушения или состояния можно индуцировать у одного или более животных, отличных от человека, описанных в данном документе, с последующим введением одного или

более соединений или биологических средств, если это необходимо.

[00187] Животные, отличные от человека, описанные в данном документе, обеспечивают систему *in vivo* для анализа и тестирования лекарственного средства или вакцины. В различных вариантах осуществления кандидатное лекарственное средство или кандидатную вакцину можно доставлять одному или более животным, отличным от человека, описанным в данном документе, с последующим мониторингом животных, отличных от человека, для определения одного или более из иммунного ответа на лекарственное средство или вакцину, профиля безопасности лекарственного средства или вакцины или эффекта в отношении заболевания или состояния. В некоторых вариантах осуществления вакцина целенаправленно воздействует на вирус, такой как, например, вирус иммунодефицита человека (HIV) или вирус гепатита (например, HCV). Иллюстративные способы, используемые для определения профиля безопасности, включают измерения токсичности, оптимальной концентрации дозы, эффективности лекарственного средства или вакцины и возможных факторов риска. Такие лекарственные средства или вакцины можно улучшать и/или разрабатывать у таких животных, отличных от человека.

[00188] Животные, отличные от человека, описанные в данном документе, обеспечивают систему *in vivo* для оценки фармакокинетических свойств лекарственного средства, целенаправленно воздействующего на человеческий LAG-3. В различных вариантах осуществления лекарственное средство, целенаправленно воздействующее на человеческий LAG-3, можно доставлять или вводить одному или более животным, отличным от человека, описанным в данном документе, с последующим мониторингом или проведением одного или более анализов в отношении животных, отличных от человека (или клеток, выделенных из них), для определения эффекта лекарственного средства в отношении животного, отличного от человека. Фармакокинетические свойства включают без ограничения характер переработки животным лекарственного средства в различные метаболиты (или выявляемое наличие или отсутствие одного или более метаболитов лекарственных средств, в том числе токсичных метаболитов), период полувыведения лекарственного средства, уровни циркулирующего в крови лекарственного средства после введения (например, концентрацию лекарственного средства в сыворотке крови), гуморальный ответ на лекарственное средство (например, продуцирование антител к лекарственным средствам), всасывание и распределение лекарственного средства, путь введения, пути выведения и/или клиренс лекарственного средства. В некоторых вариантах осуществления мониторинг фармакокинетических и фармакодинамических свойств лекарственных средств (например, модуляторов PD-1) проводят у животных, отличных от человека, описанных в данном документе, или посредством их применения.

[00189] В некоторых вариантах осуществления проведение анализа включает определение эффекта в отношении фенотипа и/или генотипа животного, отличного от человека, которому вводят лекарственное средство. В некоторых вариантах осуществления проведение анализа включает определение изменчивости от партии к партии для модулятора Lag-3 (например, антагониста или агониста). В некоторых вариантах осуществления проведение анализа предусматривает определение различий между эффектами лекарственного средства, целенаправленно воздействующего на Lag-3, вводимого животному, отличному от человека, описанному в данном документе, и эталонному животному, отличному от человека. В различных вариантах осуществления эталонные животные, отличные от человека, могут иметь модификацию, описанную в данном документе, модификацию, отличную от описанной в данном документе

(например, в случае животного, имеющего разрушенный, содержащий делецию или по иным причинам нефункциональный ген Lag-3 и/или ген Pdcd1, или гуманизацию гена Pdcd1), или не иметь модификации (т.е. в случае животного дикого типа, отличного от человека).

5 [00190] Иллюстративные параметры, которые можно измерять у животных, отличных от человека (или в клетках, выделенных из них, и/или с их применением), для оценки фармакокинетических свойств лекарственного средства, целенаправленно
воздействующего на человеческий LAG-3, включают без ограничения агглютинацию, аутофагию, клеточное деление, клеточную гибель, комплементзависимый гемолиз,
10 целостность ДНК, титр антител, специфичных к лекарственному средству, метаболизм лекарственного средства, экспрессию генов, определяемую с помощью биочипов, метаболическую активность, митохондриальную активность, оксидативный стресс, фагоцитоз, биосинтез белка, распад белка, секрецию белка, стрессовую реакцию, концентрацию лекарственного средства в целевой ткани, концентрацию лекарственного
15 средства в нецелевой ткани, транскрипционную активность и т.п. В различных вариантах осуществления животных, отличных от человека, описанных в данном документе, используют для определения фармацевтически эффективной дозы модулятора Lag-3.

[00191] Животные, отличные от человека, описанные в данном документе, обеспечивают улучшенную систему in vivo для разработки и получения характеристик
20 кандидатных терапевтических средств для применения при раке. В различных вариантах осуществления животным, отличным от человека, описанным в данном документе, можно имплантировать опухоль с последующим введением одного или более кандидатных терапевтических средств. В некоторых вариантах осуществления кандидатные терапевтические средства могут включать полиспецифическое антитело
25 (например, биспецифическое антитело) или коктейль из антител; в некоторых вариантах осуществления использование кандидатных терапевтических средств предусматривает комбинированную терапию, такую как, например, последовательное или одновременное введение доз моноспецифических антител. Опухоль может быть предоставлено достаточное время для развития в одном или более местоположениях в организме
30 животного, отличного от человека. Пролиферацию, рост, выживаемость и т.д. опухолевых клеток можно измерять как до, так и после введения терапевтического (терапевтических) кандидатного средства(кандидатных средств). При желании у животного, отличного от человека, также можно измерять цитотоксичность терапевтических средств-кандидатов.

35 [00192] Животных, отличных от человека, описанных в данном документе, можно использовать для разработки одной или более моделей заболевания для установления или оценки эффективности кандидатных терапевтических средств и/или терапевтических режимов (например, монотерапии, комбинированной терапии, тестирования с подбором дозы и т.д.) в лечении заболеваний, нарушений или состояний, поражающих людей. У
40 животных, отличных от человека, описанных в данном документе, можно сформировать различные болезненные состояния с последующим введением одной или более кандидатных молекул (например, лекарственных средств, целенаправленно воздействующих на Lag-3) с тем, чтобы можно было определить эффективность одной или более кандидатных молекул при болезненном состоянии. В некоторых вариантах осуществления модели заболеваний включают аутоиммунные, воспалительные и/или неопластические заболевания, нарушения или состояния.

[00193] Лишь на одном примере животные, отличные от человека, описанные в данном документе, обеспечивают улучшенную животную модель для профилактической

и/или терапевтической обработки опухоли или опухолевых клеток. В различных вариантах осуществления животным, отличным от человека, описанным в данном документе, можно имплантировать одну или более опухолевых клеток с последующим введением одного или более кандидатных терапевтических средств (например, антител).

5 В некоторых вариантах осуществления введение одного или более кандидатных терапевтических средств проводят после имплантации (например, через несколько минут или часов, но обычно в тот же день) одной или более опухолевых клеток, и у животных, отличных от человека, описанных в данном документе, устанавливают эффективность одного или более терапевтических средств-кандидатов в предупреждении

10 развития плотной опухоли и/или роста опухолевых клеток у указанных животных, отличных от человека. В некоторых вариантах осуществления введение одного или более кандидатных терапевтических средств проводят после (например, через несколько дней после) имплантации одной или более опухолевых клеток и в некоторых определенных вариантах осуществления после прохождения периода времени,

15 достаточного для того, чтобы одна или более имплантированных опухолевых клеток достигли предварительно определенного размера (например, объема) у животных, отличных от человека, описанных в данном документе; и для одного или более кандидатных терапевтических средств устанавливают эффективность в лечении одной или более развившихся опухолей. Животных, отличных от человека, можно поместить

20 в различные группы обработки в зависимости от дозы таким образом, чтобы можно было определить оптимальную дозу или диапазон доз, коррелирующих с эффективным лечением развившейся опухоли.

[00194] Животные, отличные от человека, описанные в данном документе, обеспечивают систему *in vivo* для разработки и/или получения характеристик

25 комбинированных способов лечения, включающих лекарственные средства, целенаправленно воздействующие на Lag-3 и PD-1, для применения при раке. В различных вариантах осуществления животным, отличным от человека, описанным в данном документе, можно имплантировать одну или более опухолевых клеток с последующим введением лекарственных средств (например, антител), целенаправленно

30 воздействующих на человеческий LAG-3 и человеческий PD-1. В некоторых вариантах осуществления введение лекарственных средств, целенаправленно воздействующих на человеческий Lag-3 и человеческий PD-1, проводят после имплантации (например, через несколько минут, часов или дней) одной или более опухолевых клеток и оценивают эффективность комбинированной терапии у животных, отличных от человека,

35 описанных в данном документе, в предупреждении развития плотной опухоли и/или роста опухолевых клеток у указанных животных, отличных от человека. В некоторых вариантах осуществления введение лекарственных средств, целенаправленно воздействующих на человеческий LAG-3 и человеческий PD-1 проводят после прохождения периода времени, достаточного для того, чтобы одна или более

40 имплантированных опухолевых клеток достигли предварительно заданного размера (например, объема) у животных, отличных от человека, описанных в данном документе; и для комбинированной терапии устанавливают эффективность в лечении одной или более развившихся опухолей. Животных, отличных от человека, можно поместить в различные группы обработки (включая группы с монотерапией) таким образом, чтобы

45 можно было определить оптимальную схему лечения, коррелирующую с эффективным лечением развившейся опухоли.

[00195] У животных, отличных от человека, описанных в данном документе, можно сформировать различные болезненные состояния с последующим введением одной или

более кандидатных молекул (например, лекарственных средств, целенаправленно воздействующих на Lag-3) с тем, чтобы можно было определить эффективность одной или более кандидатных молекул при болезненном состоянии. В некоторых вариантах осуществления модели заболеваний включают аутоиммунные, воспалительные и/или неопластические заболевания, нарушения или состояния.

[00196] Кандидатные молекулы можно вводить животным, отличным от человека, в моделях заболеваний с помощью любого способа введения, в том числе парентеральных и непарентеральных путей введения. Парентеральные пути включают, например, внутривенный, внутриартериальный, интрапортальный, внутримышечный, подкожный, внутрибрюшинный, интраспинальный, интратекальный, интрацеребровентрикулярный, интракраниальный, интраплевральный или другие пути введения. Непарентеральные пути включают, например, пероральный, интраназальный, трансдермальный, ингаляционный, ректальный, трансбуккальный, вагинальный, внутриглазной. Введение также можно осуществлять посредством непрерывной инфузии, локального введения, замедленного высвобождения из имплантатов (гелей, мембран и т.п.) и/или внутривенной инъекции. В тех случаях, когда у животных, отличных от человека, описанных в данном документе, оценивают комбинированную терапию, кандидатные молекулы можно вводить посредством одного и того же пути введения или посредством различных путей введения. В тех случаях, когда у животных, отличных от человека, описанных в данном документе, оценивают режим дозирования, кандидатные молекулы можно вводить два раза в месяц, раз в месяц, три раза неделю, два раза в неделю, раз в неделю, один раз в сутки, с варьируемыми интервалами и/или в увеличивающихся концентрациях для определения режима дозирования, при котором у животного, отличного от человека, у которого были сформированы одна или более моделей заболеваний, демонстрируется требуемый терапевтический или профилактический эффект.

[00197] Животные, отличные от человека, описанные в данном документе, обеспечивают улучшенную систему *in vivo* для разработки и получения характеристик кандидатных терапевтических средств для применения при инфекционных заболеваниях. В различных вариантах осуществления животных, отличных от человека, описанных в данном документе, можно заразить путем введения вируса (например, M₁V, H₁V, HCV, EBV и т.д.) или патогена (например, бактерий) с последующим введением одного или более кандидатных терапевтических средств. В некоторых вариантах осуществления кандидатные терапевтические средства могут включать полиспецифическое антитело (например, биспецифическое антитело) или смесь антител; в некоторых вариантах осуществления применение кандидатных терапевтических средств включает комбинированную терапию, такую как, например, последовательное или одновременное введение доз моноспецифических антител; в некоторых вариантах осуществления кандидатные терапевтические средства могут включать вакцину. Вирусу или патогену может быть предоставлено достаточное время для развития в одном или более местоположениях или клетках в организме животного, отличного от человека, чтобы у животного, отличного от человека, развились один или более симптомов, ассоциированных с инфекцией, вызванной вирусом или патогеном. Пролиферацию и рост Т-клеток можно измерять как до, так и после введения терапевтического (терапевтических) кандидатного средства (кандидатных средств). Кроме того, у животных, отличных от человека, зараженных вирусом или патогеном, можно измерять выживаемость, проводить анализ сывороточных и/или внутриклеточных цитокинов, гистопатологическое исследование печени и/или селезенки. В некоторых вариантах

осуществления животных, отличных от человека, описанных в данном документе, используют для определения степени повреждения органов, ассоциированного с вирусной инфекцией. В некоторых вариантах осуществления животных, отличных от человека, описанных в данном документе, используют для определения профиля экспрессии цитокинов в различных органах животных, отличных от человека, зараженных конкретным вирусом.

[00198] Животных, отличных от человека, описанных в данном документе, можно использовать для оценки эффективности терапевтического лекарственного средства, целенаправленно воздействующего на клетки человека. В различных вариантах осуществления животному, отличному от человека, описанному в данном документе, трансплантируют клетки человека, и такому животному, отличному от человека, вводят кандидатное лекарственное средство, целенаправленно воздействующее на такие клетки человека. Затем определяют терапевтическую эффективность лекарственного средства путем мониторинга клеток человека у животного, отличного от человека, после введения лекарственного средства. Лекарственные средства, которые можно тестировать на животных, отличных от человека, включают в себя как низкомолекулярные соединения, т.е. соединения со значениями молекулярной массы менее 1500 кДа, 1200 кДа, 1000 кДа или 800 дальтон, так и высокомолекулярные соединения (такие как белки, например, антитела), которые оказывают предусматриваемые терапевтические эффекты для лечения заболеваний и состояний человека путем целенаправленного воздействия на клетки человека (например, путем связывания с ними и/или действия на них).

[00199] В некоторых вариантах осуществления лекарственное средство представляет собой противораковое лекарственное средство, и клетки человека представляют собой раковые клетки, которые могут представлять собой клетки первичной раковой опухоли или клетки из линий клеток, развившихся из первичной раковой опухоли. В этих вариантах осуществления животному, отличному от человека, описанному в данном документе, трансплантируют раковые клетки человека, и животному, отличному от человека, задают противораковое лекарственное средство. Эффективность лекарственного средства можно определить путем оценки ингибирования роста или метастазирования раковых клеток человека у животного, отличного от человека, в результате введения лекарственного средства.

[00200] В конкретных вариантах осуществления противораковое лекарственное средство представляет собой молекулу антитела, которая связывается с антигеном на человеческих раковых клетках. В конкретных вариантах осуществления противораковое лекарственное средство представляет собой биспецифическое антитело, которое связывается с антигеном на раковых клетках человека и с антигеном на других клетках человека, например клетках иммунной системы человека (или «иммунных клетках человека»), таких как В-клетки и Т-клетки.

Наборы

[00201] Настоящее изобретение дополнительно предусматривает упаковку или набор, содержащие один или более контейнеров, заполненных по меньшей мере одним животным, отличным от человека, клеткой, отличной от человеческой, фрагментом (или конструкцией) ДНК и/или целенаправленно воздействующим вектором, описанными в данном документе. Наборы можно использовать в любом применимом способе (например, в способе исследования). Необязательно связанным с таким контейнером (контейнерами) может быть уведомление в форме, предписанной правительственным учреждением, регулирующим производство, применение или продажу фармацевтических препаратов или биологических продуктов, при этом уведомление отражает (а) одобрение

органом по производству, применению или продаже для введения человеку, (b) указания для применения и/или договор, который регулирует передачу материалов и/или биологических продуктов (например, животного, отличного от человека, или клеток, отличных от человеческих, описанных в данном документе), между двумя или более организациями, или и первое, и второе.

[00202] Другие признаки по настоящему изобретению станут очевидными в следующих описаниях иллюстративных вариантов осуществления, которые приведены в иллюстративных целях и не предназначены для их ограничения.

ПРИМЕРЫ

[00203] Следующие примеры приведены для того, чтобы обеспечить специалистов в данной области описанием того, как создавать и применять способы и композиции по настоящему изобретению, и они не предполагают ограничение объема того, что авторы настоящего изобретения рассматривают в качестве своего изобретения. Если не указано иное, температура указана по Цельсию, а давление является атмосферным или близким к нему.

Пример 1. Гуманизация эндогенного гена активации лимфоцитов-3

[00204] В данном примере показаны иллюстративные способы гуманизации эндогенного гена активации лимфоцитов-3 (Lag-3) у млекопитающего, отличного от человека, такого как грызун (например, мышь). Способы, описанные в данном примере, можно при необходимости использовать для гуманизации эндогенного гена Lag-3 животного, отличного от человека, с помощью любой человеческой последовательности или комбинации человеческих последовательностей (или фрагментов последовательностей). В данном примере для гуманизации эндогенного гена LAG3 мыши использовали фрагмент синтетической ДНК размером 1741 п. о., содержащий экзоны 2, 3 и 4 гена Lag-3 человека, представленного в GenBank под номером доступа NM_002286.5 (SEQ ID NO: 9). Выравнивание мышинового, человеческого и иллюстративного гуманизованного белка, полученного согласно данному документу, с подчеркнутым гуманизованным участком изображено на фигуре 2. На фигуре 3 показан целенаправленно воздействующий вектор для гуманизации генетического материала, кодирующего аминокислоты 21-260 полипептида Lag-3 грызуна, который сконструировали с использованием технологии VELOCIGENE® (см., например, патент США №6586251 и Valenzuela et al., 2003, Nature Biotech. 21(6):652-659; включенные в данный документ посредством ссылки).

[00205] Вкратце, искусственную бактериальную хромосому (BAC) клона bMQ-400017 для мыши (Invitrogen) модифицировали с делецией последовательности, содержащей экзоны 2-4 (1750 п. о.) эндогенного гена Lag-3, и вставкой экзонов 2, 3 и 4 гена LAG-3 человека с использованием фрагмента синтетической ДНК размером 1741 п. о., который кодирует аминокислоты 21-260 человеческого полипептида LAG-3. Сохраняли эндогенную ДНК, содержащую экзоны 1, 5, 6, 7 и 8, а также 5'- и 3'-нетранслируемые участки (UTR). Анализ последовательности фрагмента синтетической ДНК размером 1741 п. о. (т.е. соответствующей экзонам 2-4 гена LAG3 человека) подтвердил все экзоны человеческого LAG-3 и сигналы сплайсинга. Анализ последовательности выявил, что последовательность соответствует эталонному геному и транскрипту LAG-3 NM_002286.5.

[00206] Фрагмент синтетической ДНК размером 1741 п. о. синтезировали в Genescript Inc. (Пискатауэй, Нью-Джерси) и клонировали в плазмидный вектор с геном устойчивости к ампициллину. Использовали уникальные сайты распознавания рестриктаз для лигирования самоудаляющейся кассеты для отбора по устойчивости к

неомицину размером ~4996 п. о., фланкированной сайтами распознавания рекомбиназы (loxP-hUb1-em7-Neo-pA-mPrm1-Crei-loxP; см. патенты США №№8697851, 8518392 и 8354389, которые включены в данный документ посредством ссылки). При последующем отборе использовали неомицин. Целенаправленно воздействующий вектор
 5 линеаризовали перед гомологичной рекомбинацией с ВАС-клоном мыши bMQ-400O17. По замыслу соединение между фрагментом LAG-3 человека размером 1741 п. о. и расположенным ниже мышинным размером 509 п. о. содержало часть интрона 4 гена LAG-3 человека (фигура 3). Полученный целенаправленно воздействующий вектор содержал в направлении от 5' к 3' 5'-гомологичный участок, содержащий ~46 т.о.
 10 мышинной геномной ДНК из ВАС-клона bMQ-400O17, фрагмент синтетической ДНК размером 1741 п. о. (соответствующий экзонам 2-4 и части интрона 4 гена LAG-3 человека), самоудаляющуюся кассету для отбора по чувствительности к неомицину, фланкированную сайтами loxP, и ~53 т.о. мышинной геномной ДНК из ВАС-клона bMQ-400O17.

15 [00207] Модифицированный ВАС-клон bMQ-400O17, описанный выше, использовали для электропорации эмбриональных стволовых (ES) клеток мыши, создавая модифицированные ES-клетки, содержащие эндогенный ген Lag-3, гуманизированный от экзона 2 до экзона 4, включая часть интрона 4 (т.е. с делецией 1750 п. о. эндогенного гена Lag-3 и вставкой 1741 п. о. человеческой последовательности LAG-3). Подвергнутые
 20 положительному целенаправленному воздействию ES-клетки, содержащие гуманизированный ген Lag-3, идентифицировали с помощью анализа (Valenzuela et al., выше), в котором выявляли наличие последовательностей LAG-3 человека (например, экзонов 2-4) и подтверждали потерю и/или сохранение последовательностей Lag-3 мыши (например, экзонов 2-4 и/или экзонов 1, 4, 5, 6, 7 и 8). В таблице 1 представлены
 25 праймеры и зонды, которые использовали для подтверждения гуманизации эндогенного гена Lag-3, описанной выше (фигура 4).

[00208] Нуклеотидная последовательность, охватывающая расположенную выше от точки вставки часть, содержала следующее, означающее эндогенную мышиную последовательность (ниже заключенную в круглые скобки), смежную с геномной
 30 последовательностью LAG-3 человека в точке вставки:

(CATGATGTTT

CTTTCTTAGG AAAGCCAGGG CATTTCTCTA TTCTCCAATC TCTTGGCTCA

ATGCCCTTGG CCTCTCTTTT GTTCCACTAG) TGAAGCCTCT CCAGCCAGGG

35 GCTGAGGTC CCGGTGGTG TGGGCCAG GAGGGGGCTC CTGCCAGCT CCC

(SEQ ID NO:12) (фигура 9A).

[00209] Нуклеотидная последовательность, охватывающая расположенную на 5'-конце самоудаляющейся кассеты для отбора по устойчивости к неомицину часть,
 40 содержала следующее, означающее человеческую геномную последовательность LAG-3, смежную с последовательностью кассеты (ниже заключенной в круглые скобки с выделенным курсивом SalI-XhoI-совместимым концом и выделенной жирным шрифтом

последовательностью loxP) ниже точки вставки:

TTCACATTTG

ACCACAACCTC CTTCCTGCCC CCCTTGTCAC STCCCCTAAC (*GTCGAG*
 5 **ATAACTTCG TATAATGTAT GCTATACGAA GTTAT ATGCATGGCC**
 TCCGCGCCGG GTTTTGGCGC STCCCGCGGG CGCCCCCTC CTCACGGCGA
 GCGCTGCCAC GTCAGACGAA GGGCGCAGCG AGCGTCCTGA) (SEQ ID NO:13)
 (фигура 9B).

10 [00210] Нуклеотидная последовательность, охватывающая расположенную ниже от
 точки вставки часть на 3'-конце самоудаляющейся кассеты для отбора по устойчивости
 к неомицину, содержала следующее, означающее последовательность кассеты (ниже
 заключенную в круглые скобки с выделенным жирным шрифтом сайтом loxP,
 выделенным подчеркиванием сайтом распознавания I-CeuI и выделенным курсивом
 15 сайтом распознавания NheI), смежную с мышиной геномной последовательностью Lag-
 (TTCACATTTG TCTAGTTGTG GTTTGTCCAA

ACTCATCAAT GTATCTTATC ATGTCTGGA **ATAACTTCGT ATAATGTATG**
 3: **CTATACGAAG TTAT GCTAGTAACT ATAACGGTCC TAAGGTAGCG A GCTAGC**)
 20 GACCCCCAAA ACTTTCTCAG CTGCGTGTGG TCTCACTCCA CATCACTTTG
 TTTCAGTGTC САААССАТТТ ТСТСТСТГГГ САТСТТТТАГ (SEQ ID NO:14)
 (фигура 9C).

[00211] Нуклеотидная последовательность, охватывающая расположенную выше
 25 от точки вставки часть после делеции кассеты для отбора по устойчивости к неомицину
 (при оставшихся 77 п. о. в интроне 4), содержала следующее, означающее мышиную и
 человеческую геномные последовательности, расположенные рядом с оставшейся
 частью последовательности кассеты последовательностью loxP (ниже заключенными
 в круглые скобки с выделенным курсивом SalI-XhoI-совместимым концом, выделенным
 30 жирным шрифтом сайтом loxP выделенным подчеркиванием сайтом рестрикции I-CeuI
 и выделенным курсивом сайтом рестрикции NheI):

ACGTCTCCAT CATGTATAAC STCACTGTTC TGGGTAACCT CCCCCACTCT
 GCTTCACATG TGACCACAAC TCCTTCCTGC CCCCCTTGTC ACCTCCCCT AAC
 35 (*GTCGAG* **ATAACTTCGTA TAATGTATGC TATACGAAGT TAT GCTAGT**
ACTATAACGG TCCTAAGGTA GCGA GCTAGC) GACCCCCAAA ACTTTCTCAG
 CTGCGTGTGG TCTCACTCCA CATCACTTTG TTTCAGTGTC САААССАТТТ
 ТСТСТСТГГ ГСАТСТТТТА ГСТГСТГТСТС (SEQ ID NO:15)

40 (фигура 9D).

[00212] Положительные клоны ES-клеток затем использовали для имплантации
 самкам мышей с использованием способа VELOCIMOUSE® (см., например, патент
 США №7294754 и Poueymirou et al., 2007, Nature Biotech. 25(1):91-99) для создания выводка
 детенышей, содержащих вставку экзонов 2-4 LAG-3 человека и части интрона 4 LAG-3
 45 человека в эндогенном гене Lag-3 мыши. Для мышей, содержащих гуманизированные
 экзоны 2-4 (т.е. фрагмент синтетической ДНК размером 1741 п. о.) эндогенного гена
 Lag-3, вновь проводили подтверждение и идентификацию путем генотипирования ДНК,
 выделенной из отрезанных фрагментов хвостов, с применением ранее описанного

анализа (Valenzuela et al., выше), выявившего наличие последовательностей гена LAG-3 человека (фигура 4). Детенышей генотипировали, и когорты животных, гетерозиготных по конструкции с гуманизированным геном Lag-3, отбирали для получения характеристик.

5

ТАБЛИЦА 1

Название	Праймер/зонд	Последовательность (5'-3')	
7184 mTU	Прямой	GAGGCTGCTGACGGTCAAG	(SEQ ID NO:16)
	Зонд	TTAGGCAGGTТААСТТТАТССТСAAAGCA	(SEQ ID NO:17)
	Обратный	GCCACGAAGAAGATGCACTCAAG	(SEQ ID NO:18)
7184 mTD	Прямой	GTCCCGGGTCTCTTGGAGAT	(SEQ ID NO:19)
	Зонд	CCACCCATAAACATCCCCAGGTTTCA	(SEQ ID NO:20)
	Обратный	CCGCTCATТССAAGTCAGTTC	(SEQ ID NO:21)
7184 hTU	Прямой	CGGTTGGTGGTCAAGAGAAC	(SEQ ID NO:22)
	Зонд	CGGGCTTTCTCATCCTCAACGGG	(SEQ ID NO:23)
	Обратный	GCGGGAAAGAGAATGGAGTTG	(SEQ ID NO:24)
7184 hTD	Прямой	AGCCCTGCTGTGTTGGGAAA	(SEQ ID NO:25)
	Зонд	TGTTTCCAGTGGGCTGATGAAGTC	(SEQ ID NO:26)
	Обратный	TGGCAGTCACTGTGCAAG	(SEQ ID NO:27)

10

15

Пример 2. Экспрессия гуманизированного Lag-3 на активированных Т-клетках [00213] В этом примере демонстрируется, что животные, отличные от человека (например, грызуны), модифицированные с тем, чтобы содержать гуманизированный ген Lag-3 согласно примеру 1, экспрессируют гуманизированный полипептид Lag-3 на поверхности активированных лимфоцитов. В частности, активированные Т-клетки у мышей дикого типа и мышей, гомозиготных по гуманизированному Lag-3 (как описано выше), окрашивали антителами к Lag-3 для определения экспрессии LAG-3 в Т-клетках, стимулированных антителами к CD3/CD28. Кроме того, исследовали экспрессию PD-1 и LAG-3 на Т-клетках гуманизированных мышей Lag-3, которые дополнительно содержали гуманизированный ген Pcd1 (PD-1) (дважды гуманизированные мыши Lag3xPD1).

20

25

30

35

40

45

[00214] Сначала получали дважды гуманизированные мышинные эмбриональные стволовые (ES) клетки Lag3xPD1 с использованием целенаправленно воздействующего на Lag-3 вектора, описанного выше (см. пример 1), в гуманизированных мышинных ES-клетках Pcd1 (для гуманизированных мышей PD-1 и эмбриональных стволовых клеток см. заявку на патент США с порядковым №14/744592, поданную 19 июня 2015 г. и опубликованную как US 2015-0366174 A1 (включая, в частности, пример 1), и международную заявку на патент №PCT/US 15036649, поданную 19 июня 2015 г. и опубликованную как WO 2015196051; каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки). Дважды гуманизированные мышинные ES-клетки создавали путем электропорации вектора, целенаправленно воздействующего на Lag-3, описанного в примере 1, в мышинные эмбриональные стволовые клетки C57BL/6N, содержащие гуманизированный ген Pcd1, который кодирует полипептид PD-1, имеющий человеческую часть и мышиную часть, причем эта человеческая часть включает внеклеточный домен человеческого полипептида PD-1. Дважды гуманизированные клоны ES-клеток затем использовали для имплантации самкам мышей с применением способа VELOCIMOUSE® (см., например, патент США №7294754 и Poueymirou et al., 2007, Nature Biotech. 25(1):91-99) для создания выводка детенышей, содержащих оба гуманизированных гена (т.е. Lag-3 и Pcd1). Колонию мышей увеличили путем интербридинга.

[00215] Вкратце, селезенки отбирали от дикого типа, гуманизированных мышей Lag-

3, полученных в соответствии с примером 1, гуманизированных мышей PD-1 и дважды гуманизированных мышей Lag3хPD1 (описанных выше) и обрабатывали до одноклеточных суспензий путем механической диссоциации. Клетки промывали в культуральной среде (RPMI, дополненной 10% FBS), ресуспендировали при 1×10^6 /мл, и 200 мкл (200000 клеток) высевали в 96-луночные планшеты. Клетки в выбранных лунках стимулировали антителами к CD3 и к CD28 (в обоих случаях при 1 мкг/мл) в течение 72 часов. Клетки окрашивали для FACS согласно спецификациям производителя с использованием антител, распознающих CD4 и CD8, конъюгированное антитело BV421 (Brilliant Violet 421 TM) к PD-1 человека (клон EH12.2H7, Biolegend), конъюгированное антитело BV421 к PD-1 мыши (клон J43, BD Biosciences), конъюгированное с аллофиикоцианином антитело к LAG-3 человека (клон 3DS223H, eBioscience), конъюгированное с аллофиикоцианином антитело к мышинному Lag-3 (клон C9B7W, Biolegend) или соответствующие изотипические контроли. Окрашенные клетки подвергали проточной цитометрии на LSRII, и при этом данные анализировали с помощью программного обеспечения FlowJo. CD4⁺ Т-клетки гейтировали (CD19⁻CD4⁺) для выявления экспрессии человеческого и мышинного Lag-3. Иллюстративные результаты показаны на фигуре 5.

[00216] Как показано на фигуре 5, активированные CD4⁺ Т-клетки от мышей дикого типа (фигура 5, левый столбец) демонстрировали устойчивую экспрессию мышинного PD-1 (внизу слева) и мышинного Lag-3 (2-й сверху слева), но полное отсутствие экспрессии человеческого PD-1 и человеческого LAG-3. Это показало, что антитела к человеческому PD-1 и антитела к человеческому LAG-3 перекрестно не реагируют с белками мышинного PD-1 и мышинного Lag-3 соответственно. Активированные CD4⁺ Т-клетки от однократно гуманизированных мышей Lag-3 выявляемо экспрессировали гуманизированный Lag-3 и мышинный PD-1, но не мышинный Lag-3 и человеческий PD-1 (фигура 5, второй столбец слева). Соответственно, активированные CD4⁺ Т-клетки от однократно гуманизированных мышей Pdc1 экспрессировали гуманизированный PD-1 и мышинный Lag-3, но при этом отсутствовала какая-либо экспрессия мышинного PD-1 и человеческого LAG-3 (фигура 5, третий столбец слева). Дважды гуманизированные мыши Lag3хPD1 демонстрировали экспрессию человеческих, но не мышинных белков PD-1 и Lag-3, подтверждая, что полноразмерные мышинные полипептиды PD-1 и Lag-3 у этих мышей не продуцируются.

[00217] В совокупности этот пример демонстрирует, что мыши, несущие гуманизированный ген Lag-3, как описано в примере 1, экспрессируют полипептид Lag-3, который содержит человеческую часть и эндогенную мышиную часть, причем эта человеческая часть выявляемо экспрессируется посредством распознавания антителом, которое распознает человеческий полипептид LAG-3. Этот пример также демонстрирует, что дважды гуманизированные мыши Lag3хPD1, экспрессирующие как гуманизированный PD-1, так и гуманизированный Lag-3 полипептиды, обеспечивают систему *in vivo* для тестирования эффективности антител к Lag-3 и/или антител к PD1.

Пример 3. Эффективность модуляторов LAG3 и PD-1 *in vivo*

[00218] В этом примере демонстрируется, что животных, отличных от человека (например, грызунов), модифицированных с тем, чтобы содержать гуманизированный ген Lag-3 согласно примеру 1, можно использовать в анализе *in vivo* для скрининга модуляторов как Lag-3, так и PD-1 (например, антител к Lag-3 и антител к PD-1) и определения различных характеристик, таких как, например, ингибирование роста опухоли и/или уничтожение опухолевых клеток. В данном примере антитела к Lag-3 и

антитела к PD-1 подвергают скринингу с использованием мышей, гомозиготных по гуманизации эндогенного гена Lag-3, как описано в примере 1, и гомозиготных по гуманизации эндогенного гена Pcd1, для определения эффективности моно- и комбинированной терапии с использованием антител к Lag-3 и антител к PD1.

5 [00219] Линию клеток аденокарциномы мыши MC38, происходящую из линии мышины C57BL/6, получили из депозитария Национальных институтов здравоохранения (National Health Institute). Линию клеток MC38.Ova сконструировали путем стабильной трансдукции лентивирусом с экспрессией трансмембранного антигена овальбумина цыпленка (Ova) для увеличения иммуногенности опухоли. Клеточные линии тестировали
10 в отношении патогенов человека и грызунов перед имплантацией мышам. Клетки суспендировали в 100 мкл бессывороточной среды RPMI и имплантировали подкожно в бок мыши.

[00220] Вкратце, эффективность *in vivo* антител к Lag-3 и антител к PD-1 по отдельности и в комбинации исследовали с использованием опухолей MC38.Ova,
15 имплантированных дважды гуманизированным мышам Lag3xPD1. Мышам подкожно имплантировали клетки MC38.Ova в день 0, и рандомизировали их на четыре группы обработки (n=7-12 для каждой группы обработки). Мышам вводили контрольное антитело (n=7, 25 мг/кг), антитело к Lag-3 (n=12, 25 мг/кг), антитело к PD-1 (n=12, 10 мг/кг) или комбинацию антитела к Lag-3 и антитела к PD-1 (n=12, 25 мг/кг и 10 мг/кг
20 соответственно) путем внутрибрюшинной инъекции в дни 3, 7, 10, 14 и 17. Объемы опухолей контролировали путем измерения штангенциркулем два раза в неделю в ходе всего эксперимента (32 дня), а животных без опухоли контролировали на предмет отсутствия рецидива опухоли на протяжении до 80 дней. Иллюстративные результаты показаны на фигуре 6.

25 [00221] Как показано на фигуре 6, монотерапия антителом к PD-1 приводила к ингибированию роста опухоли с регрессией опухоли у 2 из 12 (17%) животных, тогда как монотерапия антителом к Lag-3 не была значимо эффективной в данном эксперименте. Регрессию опухоли наблюдали у 1 из 12 мышей, обработанных антителом к Lag-3. В контрольной группе в день 32 не было мышей без опухоли. Для сравнения
30 комбинированная терапия антителом к Lag-3 и антителом к PD-1 продемонстрировала устойчивое ингибирование роста опухоли MC38.Ova, что приводило у 5 из 12 (42%) мышей к отсутствию опухоли к концу эксперимента (фигура 6). Ни одна из мышей без опухоли не продемонстрировала рецидив опухоли на протяжении 80 дней после имплантации, что указывало на устойчивые эффекты комбинированной иммунотерапии.

35 [00222] В отдельном эксперименте дважды гуманизированным мышам Lag3xPD1 подкожно инокулировали опухолевые клетки MC38.Ova в день 0. В день 10 отбирали мышей со средним объемом опухоли 100 мм³ и рандомизировали на четыре группы обработки. Мышам вводили антитело к Lag-3 (n=9, 25 мг/кг), антитело к PD-1 (n=10, 10 мг/кг), комбинацию антитела к Lag-3 и антитела к PD-1 (n=11, 25 мг/кг и 10 мг/кг
40 соответственно) или контрольное антитело (n=7, 25 мг/кг) путем IP-инъекции в дни 10, 14, 17, 22. Объем опухолей контролировали на протяжении 28 дней после имплантации опухоли.

[00223] Как показано на фигуре 7, обработка несущих опухоль MC38.Ova гуманизированных мышей (развившиеся опухоли) комбинацией антитела к hPD-1 и антитела к hLAG-3 вызвало активацию внутриопухолевых и периферических Т-клеток.
45 Комбинация антитела к hPD-1 и антитела к hLAG-3 продемонстрировала устойчивое ингибирование роста опухоли MC38.Ova. Комбинированная терапия у этих мышей также приводила к значительному увеличению выживаемости животных, а также

продолжительности выживания (данные не показаны).

[00224] В совокупности в данном примере демонстрируется, что животных, отличных от человека, описанных в данном документе, можно использовать для оценки эффективности лекарственных средств (например, одного или более антител), целенаправленно воздействующих на Lag-3 и/или PD-1, *in vivo*, и такие животные являются применимыми в определении различий по терапевтическому и профилактическому эффекту между монотерапией антителами к Lag-3 и/или комбинированной терапией с использованием антител к PD-1. Более того, животных, отличных от человека, описанных в данном документе, можно использовать для оценки степени, в которой лекарственные средства, целенаправленно воздействующие на Lag-3 или PD-1, могут ингибировать рост опухоли и/или опосредовать уничтожение опухолевых клеток.

ЭКВИВАЛЕНТЫ

[00225] При наличии описанных таким образом некоторых аспектов по меньшей мере одного варианта осуществления настоящего изобретения специалистам в данной области будет понятно, что различные изменения, модификации и улучшения без труда придут на ум специалистам в данной области. Подразумевается, что такие изменения, модификации и улучшения являются частью настоящего раскрытия, и подразумевается, что они находятся в пределах сущности и объема настоящего изобретения. Соответственно, вышеприведенные описание и графические материалы представлены исключительно в качестве примера, и настоящее изобретение подробно описано в нижеследующей формуле изобретения.

[00226] Порядковые термины, такие как «первый», «второй», «третий» и т.д., используемые в формуле изобретения для модификации элемента формулы изобретения, сами по себе не означают какой-либо приоритет, предшествование или порядок расположения одного элемента формулы изобретения перед другим или временной порядок, в котором осуществляют действия способа, но используются исключительно в качестве отметок для проведения различий между одним элементом формулы изобретения, имеющим определенное название, и другим элементом, имеющим такое же название (за исключением используемого порядкового термина), для проведения различий между элементами формулы изобретения.

[00227] Формы единственного числа, используемые в данном документе в описании и формуле изобретения, если четко не указано противоположное, следует понимать как охватывающие определяемые объекты в форме множественного числа. Признаки, раскрытые в пунктах формулы изобретения или частях описания, в которых содержатся «или» между одним или более членами группы, считаются охваченными, если один, более одного или все члены группы присутствуют в указанном продукте или способе, используются в них или иным образом имеют отношение к ним, если не указано противоположное или иное не очевидно из контекста. Настоящее изобретение охватывает варианты осуществления, в которых только один член группы присутствует в указанном продукте или способе, используется в них или иным образом имеет отношение к ним. Настоящее изобретение также охватывает варианты осуществления, в которых более одного или все члены группы присутствуют в указанном продукте или способе, используются в них или иным образом имеют отношение к ним. Кроме того, следует понимать, что настоящее изобретение охватывает все варианты, комбинации и перестановки, в которых одно или более ограничений, элементов, условий, описательных терминов и т.д. из одного или более перечисленных пунктов формулы изобретения входят в другой пункт формулы изобретения, зависимый от того же

основного пункта формулы изобретения (или, в зависимости от того, что применимо, любого другого пункта формулы изобретения), если не указано иное или если среднему специалисту в данной области не будет очевидным возникновение противоречия или несоответствия. В тех случаях, когда элементы представлены в виде перечней (например, в виде группы Маркуша или в аналогичном формате), следует понимать, что также раскрыта каждая подгруппа элементов, и любой(любые) элемент(элементы) можно исключить из группы. Следует понимать, что, как правило, в тех случаях, когда настоящее изобретение или аспекты настоящего изобретения рассматриваются как включающие конкретные элементы, признаки и т.д., определенные варианты осуществления настоящего изобретения или аспектов настоящего изобретения включают или включают главным образом такие элементы, признаки и т.д. В целях простоты эти варианты осуществления не были в каждом случае специально недвусмысленно изложены в данном документе. Также следует понимать, что любой вариант осуществления или аспект настоящего изобретения может быть явным образом исключен из формулы изобретения независимо от упоминания конкретного исключения в описании.

[00228] Специалистам в данной области будут понятны типичные среднеквадратические отклонения или ошибки, присущие значениям, получаемым в анализах или других процессах, описанных в данном документе. Публикации, веб-сайты и другие справочные материалы, упоминаемые в данном документе для описания предпосылок настоящего изобретения и для предоставления дополнительных подробностей, относящихся к его практическому осуществлению, включены в данный документ посредством ссылки.

(57) Формула изобретения

1. Грызун для получения гуманизованного полипептида гена активации лимфоцитов-3 (Lag-3), при этом геном грызуна содержит гуманизованный ген Lag-3 в эндогенном локусе Lag-3,

где гуманизованный полипептид Lag-3 экспрессируется из гуманизованного гена Lag-3 на поверхности активированных Т-лимфоцитов у грызуна,

где гуманизованный полипептид Lag-3 содержит (i) первые два N-концевых иммуноглобулин-подобных домена человеческого полипептида LAG-3 и (ii) трансмембранные и внутриклеточные домены эндогенного полипептида Lag-3 грызуна,

где гуманизованный ген Lag-3 функционально связан с эндогенным промотором Lag-3 грызуна в эндогенном локусе Lag-3, и

где грызун представляет собой мышь или крысу.

2. Грызун по п. 1, где гуманизованный полипептид Lag-3 содержит аминокислоты 29-260 человеческого полипептида LAG-3, где человеческий полипептид LAG-3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6.

3. Грызун по п. 1, где гуманизованный ген Lag-3 содержит эндогенные экзоны 1, 5, 6, 7 и 8 Lag-3 грызуна.

4. Грызун по п. 1, где гуманизованный ген Lag-3 содержит экзоны 2-4 гена LAG-3 человека.

5. Грызун по любому из пп. 1-4, где грызун экспрессирует гуманизованный полипептид PD-1, при этом гуманизованный полипептид PD-1 содержит внеклеточную часть человеческого полипептида PD-1 и внутриклеточную часть эндогенного полипептида PD-1.

6. Грызун по п. 5, где гуманизованный полипептид PD-1 содержит аминокислоты

35-145 указанного человеческого полипептида PD-1.

7. Грызун по п. 5, где гуманизированный полипептид PD-1 содержит трансмембранную часть эндогенного полипептида PD-1.

8. Грызун по п. 5, где гуманизированный полипептид PD-1 кодируется
5 гуманизированным геном Pcdcl1, который содержит экзон 2 и часть экзона 3 гена PDCD1 человека.

9. Выделенная клетка грызуна по п. 1 для получения гуманизированного полипептида Lag-3, причем геном выделенной клетки содержит указанный гуманизированный ген Lag-3 в эндогенном локусе Lag-3.

10. Выделенная ткань грызуна по п. 1 для получения гуманизированного полипептида Lag-3, причем геном выделенной ткани содержит указанный гуманизированный ген Lag-3 в эндогенном локусе Lag-3.

11. Способ получения грызуна, предусматривающий
модифицирование генома грызуна для содержания гуманизированного гена Lag-3
15 в эндогенном локусе Lag-3 модифицированного генома, с получением тем самым указанного грызуна,

где гуманизированный полипептид Lag-3 экспрессируется из гуманизированного гена Lag-3 на поверхности активированных Т-лимфоцитов у грызуна, и

где гуманизированный полипептид Lag-3 содержит (i) первые два N-концевых
20 иммуноглобулин-подобных домена человеческого полипептида LAG-3 и (ii) трансмембранные и внутриклеточные домены эндогенного полипептида Lag-3 грызуна,

где гуманизированный ген Lag-3 функционально связан с эндогенным промотором Lag-3 грызуна в эндогенном локусе Lag-3, и

где грызун представляет собой мышь или крысу.

12. Способ по п. 11, предусматривающий:

(a) помещение геномного фрагмента в эндогенный ген Lag-3 в эмбриональной
стволовой клетке грызуна, при этом указанный геномный фрагмент содержит
нуклеотидную последовательность, которая кодирует первые два N-концевых
иммуноглобулин-подобных домена человеческого полипептида LAG-3, с получением
30 тем самым генетически модифицированной эмбриональной стволовой клетки грызуна;
и

(b) создание грызуна с применением генетически модифицированной эмбриональной
стволовой клетки грызуна из (a).

13. Способ по п. 11, где гуманизированный ген Lag-3 содержит экзоны 2-4 гена LAG-3
35 человека.

14. Способ по п. 11, где гуманизированный ген Lag-3 кодирует по меньшей мере
аминокислоты 29-260 человеческого полипептида LAG-3, где человеческий полипептид
LAG-3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:
6.

15. Эмбриональная стволовая (ЭС) клетка грызуна для получения грызуна, который
продуцирует гуманизированный полипептид Lag-3, геном которой содержит
гуманизированный ген активации лимфоцитов-3 (Lag-3) в эндогенном локусе Lag-3,

где гуманизированный полипептид Lag-3 содержит (i) первые два N-концевых
иммуноглобулин-подобных домена человеческого полипептида LAG-3 и (ii)

45 трансмембранные и внутриклеточные домены эндогенного полипептида Lag-3 грызуна,
где гуманизированный ген Lag-3 функционально связан с эндогенным промотором
Lag-3 грызуна в эндогенном локусе Lag-3, и

где ЭС клетка грызуна представляет собой ЭС клетку мыши или ЭС клетку крысы.

16. Эмбрион грызуна для получения грызуна, который продуцирует гуманизированный полипептид Lag-3, содержащий ЭС клетку по п. 15.

17. Способ оценки противоопухолевой эффективности лекарственного средства, целенаправленно воздействующего на человеческий LAG-3, при этом способ
5 предусматривает стадии введения лекарственного средства грызуну по любому из пп. 1-8; и проведения анализа для определения одного или более противоопухолевых свойств лекарственного средства, целенаправленно воздействующего на человеческий LAG-3.

18. Способ оценки фармакокинетических свойств лекарственного средства, целенаправленно воздействующего на человеческий LAG-3, при этом способ
10 предусматривает стадии введения лекарственного средства грызуну по любому из пп. 1-8; и проведения анализа для определения одного или более фармакокинетических свойств лекарственного средства, целенаправленно воздействующего на человеческий LAG-3.

19. Способ по п. 17 или 18, где
15 (а) лекарственное средство, целенаправленно воздействующее на человеческий LAG-3, представляет собой антитело к Lag-3; и/или (б) лекарственное средство, целенаправленно воздействующее на человеческий LAG-3, вводят грызуну внутривенно, внутривентально или подкожно.

20

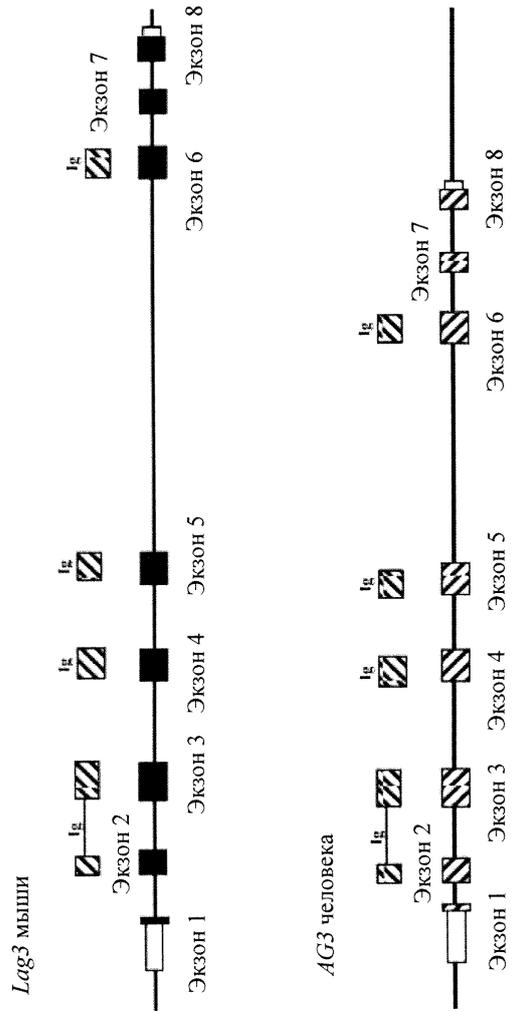
25

30

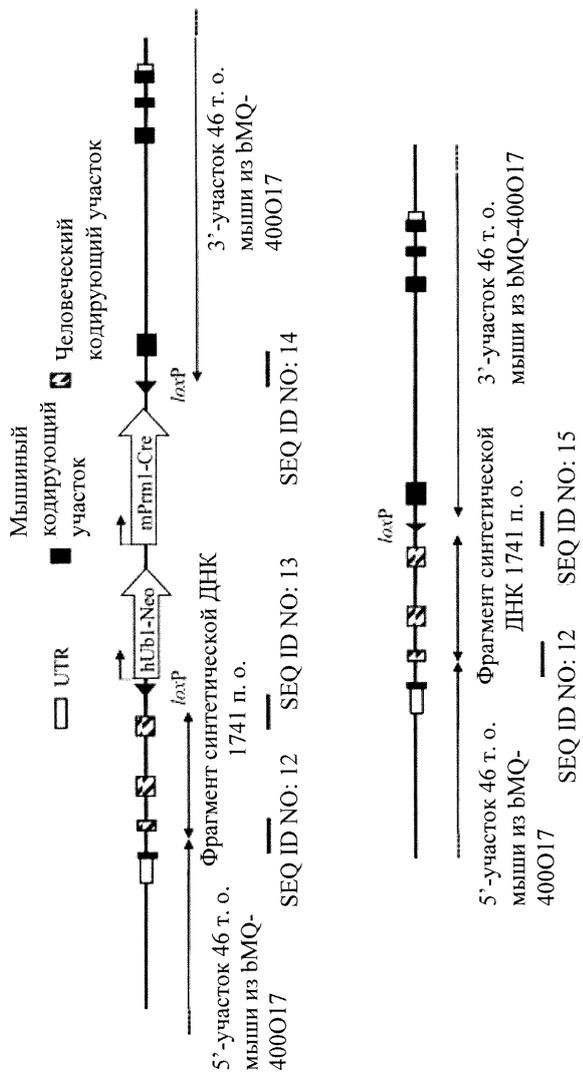
35

40

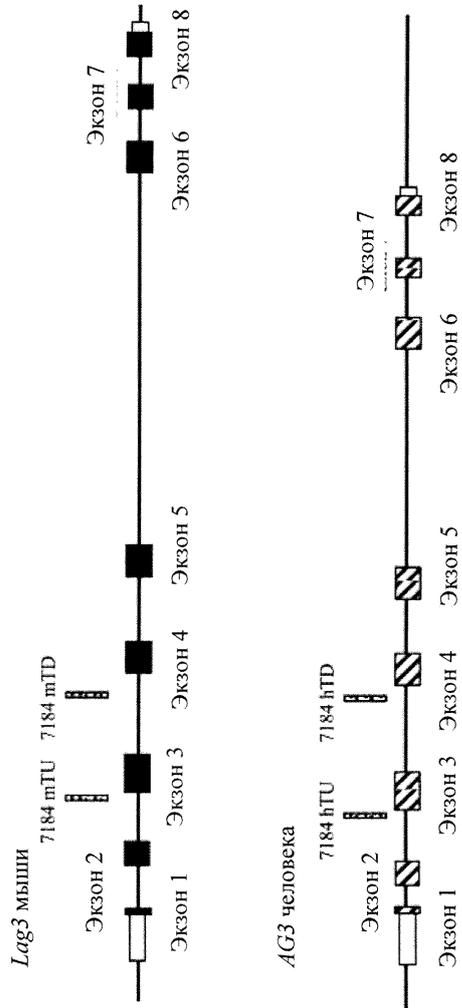
45



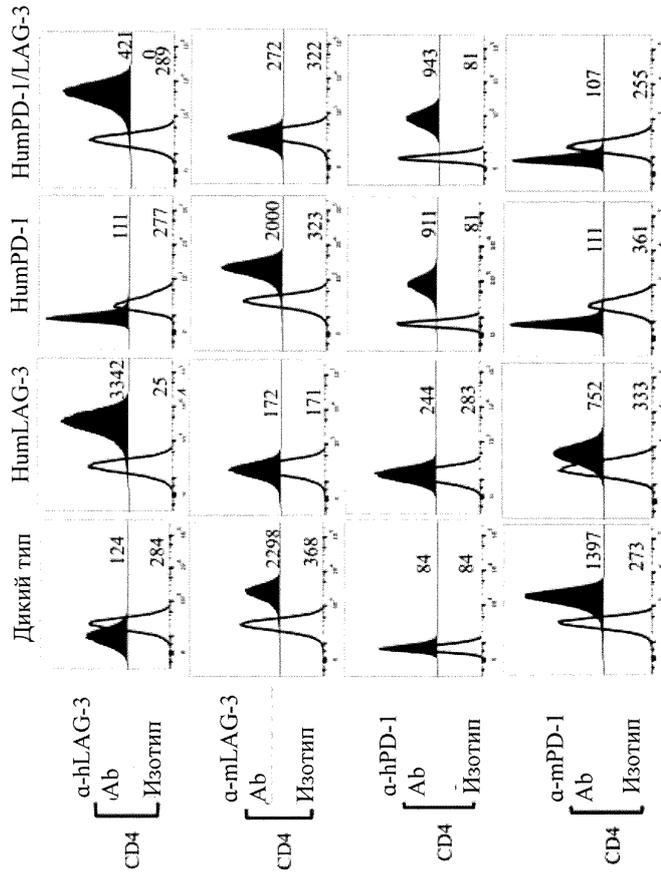
ФИГУРА 1



ФИГУРА 3

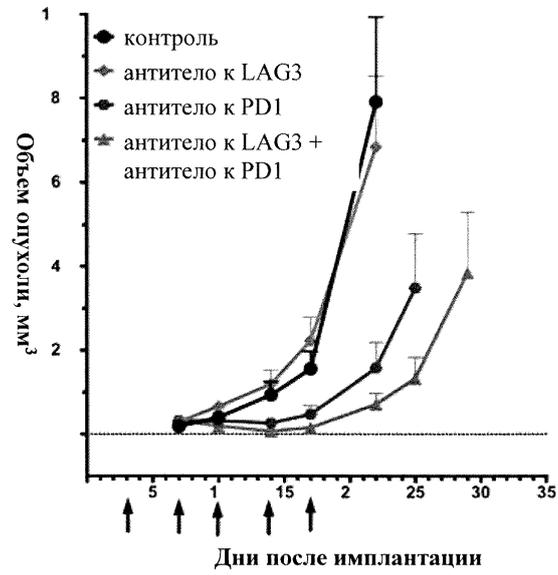


ФИГУРА 4



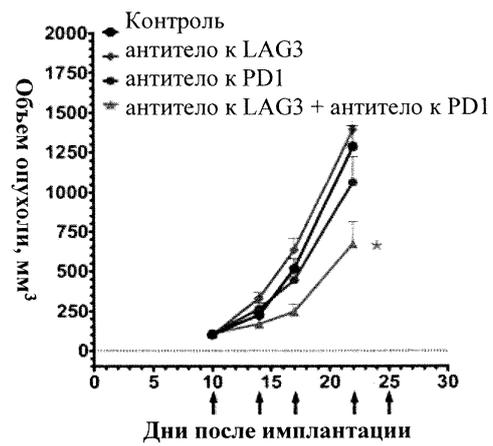
ФИГУРА 5

6/17



ФИГУРА 6

7/17



Двухфакторный дисперсионный анализ (критерий множественных сравнений Даннета), * $p < 0,05$

ФИГУРА 7

ФИГУРА 8

мРНК *Rattus norvegicus* Lag-3 (SEQ ID NO:1, эталонная последовательность NCBI NM_212513.2):

```

ACATTCTTTGCCTCACCTCCCTCCTTGTGGAATTTCTCTCTCTCTCTCTTTTTTTTTTCT
CCCAGGACCTTTTTCTGAACCTCCTTGCAGGGCCTGTGAAGCCCGGGGCCACAGAGGA
GATGAGGCAGGATCTGTTCTTGACCTTTTGTCTTGCAGCTGCTTTGGGAAGCTC
CAGTTGTGTCTTCAAGGGCTGGGAAAGAGCTCTCCGTGGTGTGGGGCCAGGAGGG
AGCTCCTGTCCATCTTCCCTGCAGCCTCGAATTTCCACCTGGATCCCAACTTTC
TGCGAAGAGGATGGGTCACTGGCAACATCGACCAGACAGTGACCAACCCGCTTC
CATCCCGGCCCTTGACCTTCTCCAGGGAATGCCCTCGACTAGGAGACACCCACCCC
ATCGCTACACGGTGTGAGTGTGGCTCCAGGAGGCCCTGCGCAGCGGGAGGCAGCC
CCTGCTATCCACCTGCAGCTGGAGAAGCGTGGCCCCAGCGCGGGGACTTCTCT
CTGTGGTTGGCCAGCTACGGCGAAAGATGGGGCGAGTACCACGCCCTTCGTGC
GCCCCCGAACCGGACTTCTCTGCAGCCTCCGCCTGCGCGTCCGGCCAGGCCCTC
GATGATTGCCAGTCCCCAGGAACCTCAAGCCGCTGATTGGGTCAATTTGAAC
GCTGCTTCAAGTGTCCATCACGTACAACCTCAAGGTTCAAGGTTGGAACCTGT
CGAGTGCCTGCCACAATTCACCCCGTCAATATCTAGCTGAAAGTTTCTCTTACT
GCCCAAGTCAGCCACTGGATTCGGGACCTGGGGCTGTGTCTCACCTACAGA
GATGGCTTCAATGTCTCCATCACGTACAACCTCAAGGTTCAAGGTTGGAACCTGT
AGCCCTTTGACAGTGTACGCTGTGAAGGTTCTAGGGTGGAGCTGCCCTGTCACT
TGCTCCCGTTGTGGGGACCCCTTCTTGTCTATTGCCAAGTGGACTCCTCCTGGG
GGAGGCTCTGAGCTCCCGTGAAGTGGAAAGAGTGGCAATTTTACCCTCAACTTGA
GAATGTGGGTGGGGCACAGGCTGGGACCTACACCTGCAGCATCCATCTGCAGGGG
CGGCAGTCAAGTGGGCTGTGACGTTGGCAGTCAACAGTGAAGTCTTAAATCCTT
CGGGTTACCTGGCTCCCGCAGAAAGCTGTATGTGAGGTAGTCCCGGCATCTGGA
GAAGGAAGATTTGTGTGGCGCCCTCAGCGATCTGTCCAGGAGTTCCTGGGCC
CTGTGCTGGAAGTTCAGGAGGCCAAGCTTCTGGCTGAGCAATGGCAGTGTAGCT
GTATGAGGGCCAGAACTTCTGGAGCAACAGTGTACACCGCAGAGTCTAGCTCA
GGCCCTGGAGTGTAAAGAAATCTCAGGTGACCTTAAAGGAGGCCATCTCTTCC
TCTCTCTATCCTTGGTGCCCTTGCCTTGTCTCTTGGTGACCGGGGCTTTGGC
TTTCACTGTGGAGAAGACAGTGTACGGAGAAGATTTCTGCCTTAGAGCATGG
GATTCGCCACCTCCGGTTCAGAGTAAGATAGAGGAGCTGGAGCGAGAACCGGAG
ACCGAGATGGAACCAGAGACAGAGCCGATCCGGAGCCTCAGCCGGAGCCCGAGC
TGGAACCAGAGTCCAGGCAGCTGTACCAGGAGCTGAGACAGCCAGCAGAGGTTCT
AGCAGCTCTGCCCGCCCGCCGCTGCCCGCCCGGAATAAACTCCCTGTACAGCAGC
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
    
```

Аминокислоты *Rattus norvegicus* Lag-3(SEQ ID NO:2, эталонная последовательность NCBI NM_997678.2):

```

MRQDLFLDLLLQLWEAPVVSNGPKELSVVWAQEGAPVHLPCSLFFPHLDPNFLRRGW
VTWQHRRPDSQPASIPALDLLQGMPSRRRHPHRYTVLSVAPGGLRSGRQPLLSHVQLEKR
GPQRGDFSLWLRPATRKDAGEYHAFVRLPDRDFSCSLRLRVGQASMIASPPGTLKPSDWWIL
NCSFSRPRDPVSVVHWFQGSRVVHNSPRHYLAESFLLLPQVSPLDSTWGCVLT YRDGFN
VSTYNLKVQGLEPVAPLTVYAAEGSRVELPCHLPPVVGTPSLLIAKWTPPGGGPELPVTGK
SGNFTLQLENVGRAQAGTYTCSIHLQGRQLSAAVTLAVITVTPKSFGLPGSPQKLLCEVPPA
SGEGRFVWRPLSRLSRSSLPVLELQEAQLLAEQWQCQLYEGQKLLGATVYTAESSGAWA
AKRISGDLKGGHLELSLILGALALFLLVTGAFGFHLWRRQLLRRRFSALEHGIRPPPQSKIE
ELEREPETEMEPETEPDPEPQPEPELEPESRQL
    
```

ФИГУРА 8 (продолжение)

МРНК *Mus musculus Lag-3* (SEQ ID NO:3, эталонная последовательность NCBI NM_008479.2):

GGGCAGTGGGGAGGAGAAGCAGAAGGACTGGGTCTGGAGGAGCAGCTCAAGTTCTAGC
TAGCTGCAGTGGGTTTGCCTGCACTCTGCCTGGGTCCAGCCGGGCCCTGTGATCATT
TCCATCTGTGTCTCCAGTCCCCTCTGGGGGTCTCTTACCCTACATTCTTTCCC
TCCGGCTCACCTCCCTCTGTAGAACTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT
CTCTCTCTCTGT
ACCTTTTCTAACCTCCCTGGAGGGCTGGGGAGGCCCGGGCCATAGAGGAGATGAGG
GAGGACCTGCTCTTGGCTTTTGTCTCTGGGACTGCTTTGGGAAGCTCCAGTTGT
GTCTTCAGGGCTGGGAAAGAGCTCCCCGTGGTGTGGGCCAGGAGGGAGCTCCC
GTCCATCTCCCTGCAGCCTCAAAATCCCCAACCTGGATCCTAACTTTCTACGAAG
AGGAGGGGTTATCTGGCAACATCAACCAGACAGTGGCCAACCCACTCCCATCCC
GCCCTTGACTTCCACAGGGGATGCCCTCGCCTAGACAACCCGCACCCGGTCTGCT
ACACGGTGTGAGCGTGGCTCCAGGAGGCCGCGCAGCGGGAGGCAGCCCCTGC
ATCCCCACGTGCAGCTGGAGGAGCGCGCCCTCCAGCGGGGACTTCTCTGTG
GTTGGCCCAAGCTCTGCGCACCGATGCGGGCGAGTACCACGCCACCGTGGCCCTC
CCGAACCGCCCTCTCTCTGAGTCTCCGCTGCGGTGGCCAGGCCCTCGATGA
TTGCTAGTCCCTCAGGAGTCTCAAGCTGTCTGATTGGGTCTTTTGAACGTCTCC
TTGAGCCGCTCTGACCGCCAGTCTCTGTGCACTGGTTCAGGGCCAGAACCGAG
TGCTGTCTACAACTCACCGCGTCAATTTTAGCTGAAACTTCTCTGTACTGCCCC
AAGTCAGCCCTGGACTCTGGGACTGGGGCTGTGTCTCACCTACAGAGATGG
CTTCAATGTCTCCATCACGTACAACCTCAAGGTTCTGGGTCTGGAGCCGTAGCCC
CTCTGACAGTGTACGCTGTGAAGGTTCTAGGGTGGAGCTGCCCTGTCAATGCCC
CCAGGAGTGGGACCCCTTCTTTGCTCATTGCCAAGTGGACTCCTCCTGGAGGAG
GTCTGAGTCCCCGTGGCTGGAAAAGAGTGGCAATTTTACCCTTACCTTGAGGCT
GTGGTCTGTGGCACAGGCTGGGACCTACACCTGTAGCATCCATCTGCAGGGACAGC
AGCTCAATGCCACTGTACGTTGGCGGTATCACAGTACTCCAAATCCTTCGGG
TTACCTGGCTCCCGGGGAAGCTGTGTGTGAGGTAACCCCGGCATCTGGAAAAG
AAAGATTTGTGTGGCTCCCCTGAAACAATCTGTCCAGGAGTTGCCCGGGCCCTGT
GCTGGAGATTGAGGAGGCCAGGCTCTTGTGTGAGCGATGGCAGTGTGAGCTGTAC
GAGGGCCAGAGGCTTCTGGAGCGACAGTGTACGCCGACAGTCTAGCTCAGCGC
CCACAGTGTAGGAGAATCTCAGGTGACCTAAAGGAGGCCATCTCGTCTCGT
CTCATCCTTGGTGCCCTCTCCCTGTCTCTTTGGTGGCCGGGGCCCTTGGCTTCA
CTGGTGGAGAAAACAGTTGCTACTGAGAAGATTTCTGCCTTAGAACATGGGATTC
AGCCATTTCCGGCTCAGAGGAAGATAGAGGAGCTGGAGCGAGAATGGAGACGGG
GATGGGACAGGAGCCGAGCCGAGCCGAGCCGAGCCACAGCTGGAGCCAGAGCCAG
GCAGCTCTGACCTGGAGCCGAGGACCCAGCAGGTCTCAGCAGCTCCGCCCGCCGCC
CGCCCGCCGAATAAACTCCCTGTGACGAGCATCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

ФИГУРА 8 (продолжение)

Аминокислоты *Mus musculus* Lag-3 (SEQ ID NO:4, эталонная последовательность NCBI NP_032505.1):

MREDLLLGFLLLGLLWEAPVSSGPGKELPVVWAQEGAPVHLPCLKSPNLDPNFLRRGGV
 IWQHQPDSGQPTPIPALDLHQGMPSRQAPGRYTVLSVAPGGLRSGRQPLPHVQLEERGL
 QRGDPSLWLRPALRTDAGEYHATVRLPNRALSCSLRLRVGQASMIASPSGVLKLSDWVLLN
 CSFSRPRDPVSVHWFQGNRVVYNSPRHFLAETFLLLPQVSPLDSTWGCVLTYRDFNV
 SITYNLKVGLPEVAPLTVYAAEGSRVELPCHLPPGVGTPSLLIAKWTPPPGGPELPAVAGK
 GNFTLHLEAVGLAQAGTYTCSHILQGGQLNATVTLAVITVTPRSFGLPGRGKLLCEVTPAS
 GKERFVWRPLNLSRSCPGPVLEIQEARLLAERWQCQLYEGQRLLGATVYAAESSGAHSA
 RRISGDLKGGHLVLVLLGALSLELLVAGAFGFHWWRKQLLLRRFSALEHGIQPFPAQRKIE
 ELERELETEMGQEPPEPEPEPQLEPEPRQL

мРНК *Homo sapiens* LAG-3 (SEQ ID NO:5, эталонная последовательность NCBI NM_002286.5):

ACAAGGGGTGAAGGCCAGAGACCAGCAGAACGGCATCCAGCCACGACGGCCACTTTC
 CTCTGTCTGCTCTCCGCCACGGCCCTGCTCTGTTCCCTGGGACACCCCCGCCCCACCTC
 CTCAGGCTGCTGATCTGCCAGCTTTCCAGCTTCCCTCTGGATTCCGGCCCTCTGGTCAT
 CCCCACCCCTCTCTCCAAGGCCCTCTCCTGGTCTCCCTTCTCTAGAACCCCTTCCCTC
 CACTCCCTCTCTGCAGAACTTCTCCTTACCCCCACCCCCACCACTGCCCCCTTTCCT
 TTTCTGACCTCCTTTTGGAGGGCTCAGCGCTGCCAGACCATAGGAGAGATGTGGGAG
 GCTCAGTTCTGGGCTTGTGTTTCTGCAGCCGTTTGGGTGGCTCCAGTGAAGCC
TCTCCAGCCAGGGGCTGAGGTCCTGGTGGTGGGCCAGGAGGGGGCTCTGCC
CAGTCCCTGCAGCCCCAATCCCCCTCCAGGATCTCAGCCTTCTGCGAAGAGC
AGGGGTCACTTGGCAGCATCAGCCAGACAGTGGCCCGCCCGCTGCCGCCCGGC
 CATCCCTGGCCCCCGGCCCTCACCCGGCGGGCCCTCCTCCTGGGGGGCCAGGC
 CCGCCCGCTACACGGTGTCTGAGCGTGGGTCCCGGAGGCCCTGCCAGCGGGAGGC
 TGCCCTGCAGCCCGCTCCAGCTGGATGAGCGCGCCGGCAGCGCGGGGACTT
 CTCGCTATGGCTGGCCAGCCCGGGCGGGACGCCGGCGAGTACCGGCCCGC
 GGTGCACCTCAGGGACCGGCCCTCCTCCTGCCGCCCTCCGTCTGCCCTGGGCCAG
 GCCTCGATGACTGCCAGCCCCCAGGATCTCTCAGAGCCTCCGACTGGGTCAATTT
GAAGTCTCCTCAGCCCGCTGACCGCCAGCCTCTGIGCATTTGGTTCGGAAAC
GGGGCCAGGGCCGAGTCCCTGTCCGGGAGTCCCCCATCACCCTTAGCGGAAAG
CTTCTCTTCTGCCCAAAGTCAAGCCCATGGACTCTGGGCCCTGGGGCTGCATCC
TCACCTACAGAGATGGCTTCAACGTCTCCATCATGTATAACCTCACTGTCTGGGT
 CTGGAGCCCCAACTCCCTTGACAGTGTACGCTGGAGCAGGTTCCAGGGTGGGGC
 TGCCCTGCCCGCTGCTGTGGTGTGGGACCCGGTCTTCTCCTCACTGCCAAGTG
 GACTCCTCCTGGGGGAGGCCCTGACCTCCTGGTACTGGAGACAATGGCGACTTT
 ACCCTTCGACTAGAGGATGTGAGCCAGGCCAGGCTGGGACCTACACCTGCCATA
 TCCATCTGCAGGAACAGCAGCTCAATGCCACTGTACATTGGCAATCATCACAGTG
ACTCCAAATCTTTGGGTCACTGGATCCTGGGGAAGCTGCTTTGTGAGGTGAC
TCCAGTATCTGGACAAGAAGCTTTGTGTGGAGCTCTCTGGACACCCCATCCAGA
GGAGTTTCTCAGGACCTTGGCTGGAGGCACAGGAGGCCAGCTCCTTCCAGCC
TGGCAATGCCAGCTGTACCAGGGGGAGAGGCTTCTGGAGCAGCAGTGTACTTC
ACAGAGTGTCTAGCCAGGTGCCCAACGCTCTGGGAGAGCCCCAGGTGCCCTCC
 CAGCAGGCCACCTCCTGCTGTTCTCATCCTTGGTGTCTTCTCTGCTCCTTTGG
 TGACTGGAGCCTTTGGCTTTCACCTTTGGAGAAGACAGTGGCGACCAAGACGATTT
TCTGCCCTAGAGCAAGGGATTACCTTCCGAGGCTCAGAGCAAGATAGAGGAGC
TGGAGCAAGAACCGGAGCCGGAGCCGGAGCCGGAACCGGAGCCCGAGCCCGAGC

ФИГУРА 8 (продолжение)

GGTGGCCGGGCCCTTTGGCTTTCACCTGGTGGAGAAAACAGTTGCTACTGAGAAGA
TTTTCTGCTTAGAACATGGGATTCAGCCATTTCCGGCTCAGAGGAAGATAGAGGA
GCTGGAGCGAGAAGTGGAGACGGAGATGGGACAGGAGCCGGAGCCCGAGCCGGA
GCCACAGCTGGAGCCAGAGCCCAGGCAGCTCTGAJCTGGAGCCGAGGCAGCCAGC
AGGTCTCAGCAGCTCCGCCGCCGCCGCCGCCGAATAAACTCCCTGTCAGCAGCA
TCAAAAAAAAAAAAAAAAAA

Иллюстративные аминокислоты гуманизованного Lag-3 (SEQ ID NO:8):

MREDLLGFLLGLLWEAPV(KPLQPGAEPVYVWAQEGAPAQLPCSPTIPLQDLSLIRRA
GVTWQHQPDSGPPAAAPGHPLAPGHPAAPSWSGPRPRRYTVLSVGPGLRSGRLPL
QPRVQLDERGRQRGDFSLWLRPARRADAGEYRAAVHLRDRALSCRLLRLGGQASMT
ASPPGSLRASDWVILNCSFSRPPDRPASVHWFRNRGQGRVPVRESPIHHHLAESFLFLPQV
SPMDSGVPWGCHLYRDFNYSIMYNLTVLJGLEPVAPLTVYAAEGSRVELPCHLPPGVGTP
SLLIAKWTTPGGGPELPAVAGKSGNFTLHLEAVGLAQAGTYTCSIHLLQGGQLNATVTLAVITV
TPKSFGLPGSRGKLLCEVTPASGKERFVWRPLNLSRSCPGPVLEIQEARLLAERWQCQLYE
GQRLLGATVYAAESSSGAHSARRISGDLKGGHLVVLVILGALSLELLVAGAFGFHWWRKQL
LLRRFSALEHGIQPFPAQRKIEFLERELETEMGQEPPEPEPEPQLEPEPRQL

Иллюстративный фрагмент синтетической ДНК для гуманизации (SEQ ID NO:9; 1741 п. о, содержащий экзоны 2–4 и часть интрона 4 гена *LAG3* человека):

TGAAGCCTCTCCAGCCAGGGGCTGAGGTCCCGGTGGTGTGGGCCAGGAGGGGGCTCCT
GCCAGCTCCCCTGCAGCCCCACAATCCCCCTCCAGGATCTCAGCCTTCTGCGAAGAGC
AGGGGTCACTTGGCAGCATCAGCCAGACAGGTATGCACCCAAACTTTGGGCAACAGGA
CCTCCGAATCCAGCACTCAACCCACACCCGTGCCGGTCTCTGTCCCCTGCCCTGAGGT
GTCACTCCCTCTGAAGCCAGTGACCCAGTCTCCCTGCCCTCGCTTGCACCGTTCTTGCCT
TTGCTCTGCAATCAGCGACCCCTACGCCAGCATCCCTTCTCTCCAGAAGTGGATGCGGC
CAGTCCAAACAGAGGGGTCCGGCGTGAGGGGACGGTTGGTGGTCAAGAGAAGTCTTGGG
GGGGCTTCTCATCTCAACGGGTGGCTGCTGCATCCTCCCGGGCTTCTTACCCTGG
AGCTTCTCAACTCCATTCTCTTCCCGCCAGTGGCCCCCGCTGCCGCCCGGGCCAT
CCCCGGCCCCGGCCCTCACCCGGCGGCCCTCCTCCTGGGGGCCAGGCCCGCCG
CTACACGGTGTGAGCGTGGGTCCCGGAGGCCCTGCGCAGCGGGAGGCTGCCCTGCAG
CCCCCGTCCAGCTGGATGAGCGCGGCCGGCAGCGCGGGACTTCTCGCTATGGCTGG
CCAGCCCGGGCGCGGGACGCCGGGAGTACCAGCCCGCGGTGCACCTCAGGGACCGC
GCCCTCTCTGCCCTCCGTCTGCGCTGGGCCAGGCCCTCGAGTATGTGGGGCGGGAC
GATGGGAGAAGGGCTGGGAGGTGGGTCCCCATCCCTGCTCCCGGGACGGGAAGG
GCTGGGGCAGAGGCTGGCCCTAGGCCCTGTCCGAGAGCTCCAGAAAGAGTAGAGGAA
GGGGTGGGGCCCTGCTGGAGTGAAGGTGCCCCGAAGCACGTGTATGGGGGGCC
TGTGGAGAGATTGTGTCACCCCGAGCTCCCTTCTCCACCCACGCGGGAGTGGCCAG
AGGGAGGGGAGGGGGGAGAGCATGGGGCTAAAGTGATTCAATTCAGATATCTGTAG
CTCAGGGGGTGGGCTTCCGGGGTTCAGGCCAGGAAAACGGCAAGGGTGGCTGATGC
CAAGTAACTCCAGGCCAGGGACGGGAAAGTGGTCTGGGGAGTCTTGGGGATCCAC
TTTATGCACCTCCAGGTGCTGGAAGCTGAGATGGGGAGAGGGTGTATGTGGGAGAGGAG
AAGACAAGTCTAAAGCCAGGTGCCGTGTTCCAGGAGCTCCGGCTTGGCAGCCCTGCTG
TGTGGGAAATGTTTCCAGTGGGCTGATGAAGTCTCTTTATCCTTGCACAGTGAAGTGC
CAGCCCCCAGGATCTCTCAGAGCCTCCGACTGGGTCATTTGAACTGCTCCTCAGCCC

ФИГУРА 8 (продолжение)

ATTTGTGTGTTTATTTATTTATTTTCATTTTAGCGTGCCTGGTGTGTTTTGCCATAGAT
 GTCTGTGTAGGGTATTGGATTCCCTGGAACTTGACCTACAGACAGTCATGAGATACCA
 TATGGGTGCTGGGAATTGAACCCAGCTCCTCTGGAAGGACAGCCAGTGTCTAATCTGC
 CATCTCTCACTGTTTATCCCTTGGCTGTTCAGCCTCCTGAGCCCTTGGTCTCTGGTGCCT
 CAGTTTCCCTAGTTTCTCTGCTTTGCTCTGTTTCTTTCTGTGTTACAGCCAAATGCCTCCT
 TCCCCCTTCTGCCCTTACTTCTTGTATGTCTCCACCCCTCTGGCCCACTGCTTACCCTTGGTA
 ACGGCTTGGCTTTTCTTCTCTCTCCAGGTCTGGAGCCCGTAGCCCTCTGACAGTGTGTA
 CGCTGTGTAAGGTTCTAGGGTGGAGCTGCCCTGTCATTTGCCCCAGGAGTGGGGACCC
 CTTCTTTGCTCATTGCCAAGTGGACTCCTCCTGGAGGAGGTCTGAGCTCCCGTGGCTG
 GAAAGAGTGGCAATTTACCCTTACCTTGGAGGCTGTGGGTCTGGCACAGGCTGGGACC
 TACACCTGTAGCATCCATCTGCAGGGACAGCAGCTCAATGCCACTGTACGTTGGCGGT
 CATCACAG

Гуманизированный аллель Lag3 после опосредованного рекомбиназой вырезания
 кассеты для отбора (SEQ ID NO: 11, человеческая последовательность указана жирным
 шрифтом в верхнем регистре, последовательность, оставшаяся после опосредованной
 рекомбиназой делеции кассеты для отбора, указана шрифтом в нижнем регистре, и
 мышиная последовательность указана обычным шрифтом в верхнем регистре):

CCATCACTTTGTATAAGGGCAGATCCCAAAGCTGCCTCAGCCTCCCTTCAACAGGG
 AGGCATGATGTTTCTTTCTTAGGAAAAGCCAGGGCATTTCTCTATTCTCCAATCTCTT
 GGCTCAATGCCCTTGGCCTCTCTTTTGTCCACTAGTGAAGCCTCTCCAGCCAGGG
 GCTGAGGTCCCGGTGGTGTGGGCCAGGAGGGGGCTCCTGCCAGCTCCCTGCA
 GCCCACAAATCCCCCTCAGGATCTCAGCCTTCTGCGAAGAGCAGGGGCACTTG
 GCAGCATCAGCCAGACAGGTATGCAACCCAAACTTTGGGCAACAGGACCTCCGAAT
 CCAGCACTCAACCCCAACCCCGTGCCTGCTCTGTCCCTGCCCTGAGGTGTAC
 TCCCTCTGAAGCCAGTGAACCCAGTCTCCCTGCCCTCGCTTGCACCGTTCCCTGCCCT
 TGCTCTGCAATCAGCGACCCCTCACGCCAGCATCCCTTCTCTCCAGAAGTGGATGCG
 GCCAGTCCAACAGAGGGGTCCGGCGTGAGGGGACGGTTGGTGGTCAAGAGAACT
 CTTGGGGCGGGCTTTCTCATECTCAACGGGTGGCTGCCTGCATCCTCCCGGGCTTC
 CTACCCCTGGAGCTTCTCAACTCCATTCTCTTTCCCGCCAGTGGCCCGCCCGCTG
 CCGCCCCCGGCCATCCCTTGGCCCCGGCCCTCACCCGGCGGGCCCTCCTCCTG
 GGGGCCAGGCCCGCCGCTACACGGTGTGAGCGTGGGTCCCGGAGGCCTGCG
 CAGCGGGAGGCTGCCCTGCAGCCCGCGTCCAGCTGGATGAGCGCGGGCCGGCA
 GCGCGGGGACTTCTCGCTATGGCTGCGCCAGCCCGGGCGGGGACGCCGGCGCA
 GTACCCGCGCCGCGGTGCACCTCAGGGACCCGCGCCCTCTCCTGCCCGCTCCGTCTG
 CGCTTGGGCCAGGCCTCGAGTATGTGGGGCGGGACGATGGGAGAAGGGCTGGGA
 GGTGGGTCCCATCCCTGCTCCTCCGGGACGCAAGGAGGGTGGGGCAGAGGCT
 GCGCCCTAGGCCCTGTCCGAGAGCTCCAGAAAGAGTAGAGGAAGGGGGTGGGGC
 GCCTGCTGGAGTGGAAAGGTGCCCCCGAAGCACGTGATGGGGGGCCCTGTGGAGA
 GATTGTGTCAACCCCGAGCTCCCTTCTCCACCCACCGGGGAGTGGCCAGAGGG
 AGGGGGAGGGGGGAGAGCATGGGGCTAAAGTGATTCAATTCAGATATCTGTAGC
 TCAGGGGGTGGGCTTCCGGGGTCCAGGCCAGGAAAACGGCAAGGGTGGCTGA
 TGCCAAGTAAACTCCAGGCCAGGGACGGGGAAAAGTGGTCTGGGGAGTCTTGGGG
 ATCCACTTTATGCACCTCCAGGTGCTGGAAGCTGAGATGGGGAGAGGGTGTATGTG
 GGAGAGGAGAAGACAAGTCTAAAGCCAGGTGCCCTGTTCCAGGAGCTTCCGGCTT
 GGCAGCCCTGCTGTGTTGGGAAATTTGTTCCAGTGGGCTGATGAAGTCTTCTTTAT
 CTTGACAGTACTGCCAGCCCCCAGGATCTCTCAGAGCCTCCGACTGGGTCA

ФИГУРА 8 (продолжение)

TTTGAAGTGCCTTCAGCCGCCCTGACCGCCCAGCCTCTGTGCATTGGTTCCGGA
ACCGGGCCAGGGCCGAGTCCCTGTCCGGGAGTCCCCCATCACCACTTAGCGGA
AAGCTTCCTCTTCCTGCCCCAAGTCAGCCCATGGAATCTGGGCCCTGGGGCTGCA
TCCTCACCTACAGAGATGGCTTCAACGTCTCCATCATGTATAACCTCACTGTTCTG
GGTAACTCCCCCACTCTGCTTCACATTTGACCACAACCTCCTTCCTGCCCCCTGT
CACCTCCCCTAACctcgagataaettegtataatgfatgetatacgaagttatgetagtaetataacggtectaaggtagcgagctag
cGACCCCCAAAACTTTCTCAGCTGCCGTGTGGTCTCACTCCACATCACTTTGTTTCAGTGTC
CAAACCATTTTCTCTCTGGGCATCTTTAGCTGCTGTCTCTTACTTTTATTTATTTATTT
GTGTGTTTATTTATTTATTTTCATTTTAGCGTGCGTTGGTGTTTTGCCTGCATAGATGCT
GTGTCAGGGTATTGGATTCCCTGGAACCTGACCTACAGACAGTCATGAGATACCATATG
GGTGCTGGGAATTGAACCCAGCTCCTCTGGAAGGACAGCCAGTGTCTAATCTGCCATC
TCTCACTGTTTATCCCTTGCTGT

ФИГУРА 9А

(CATGATGTTT CTTTCTTAGG AAAGCCAGGG CATTTCTCTA TTCTCCAATC TC TTGGCTCA ATGCCCTTGG
 CCTCTTTT GTTCCACTAG) TGAAGCCTCT CAGCCAGGG GCTGAGGTC CCGGTGGTG TGGGCCAG
 GAGGGGCTC CTGCCAGCT CCC (SEQ ID NO:12)

ФИГУРА 9В

TTСACATTTG ACCACAATC CTTCTGCCC CCTTGTСAC CTCCCCTAAC (GTCTGAG ATAACTTCCG
 TATAATGTAT GCTATACGAA GTTAT ATGATGGCC TCCGGCCGG GTTTTGGCGC CTCCC GCCGGG
 CGCCCCCTC CTCACGGCGA GCGCTGCCAC GTCAGACGAA GGGCGCAGG AGCGTCCCTGA) (SEQ ID NO:13)

ФИГУРА 9С

(TTCACTGCAT TCTAGTTGTG GTTTGTCCAA ACTCAICAAT GTATCTTATC ATGCTGGA ATAАCTTCCGT
 АТААТGТАТG СТАТАСGААG TТАТ GCTAGTAACT ATAACGGTCC TAAAGGTAGCGA GCTAGC) GACCCCAAA
 ACTTCTCAG CTGGGTGG TCTCACTCCA CATCACTTTG TTTCAGTGTC CAAACCAATTT TCTCTCTGGG
 CAICTTTTAG (SEQ ID NO:14)

ФИГУРА 9D

ACGTCCTCAT CAIGTATAAC CTCACGTGTC TGGGTAАCT CCCCАCTCT GCTTCACATTT TGACCAАAC
 TCTTCCТGC CCCCCTTGC ACCTCCCCTAAC (GTCTGAG ATAАCTTCCGTA TAAIGTATGC TATACGAAAT TAT
 GCTAGTA ACTATAACGG TCTAAGGTA GCGA GCTAGC) GACCCCAAA ACTTCTCAG CTGGGTGGG
 TCTCACTCCA CATCACTTTG TTTCAGTGTC CAAACCAATTT TCTCTCTGG GCACTTTTTA GCTGCTGTCTC (SEQ ID
 NO:15)