



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0067919
(43) 공개일자 2024년05월17일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/0786 (2010.01) A61K 39/00 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C12N 5/0645 (2023.05)
A61K 39/4614 (2023.05)
- (21) 출원번호 10-2024-7012001
- (22) 출원일자(국제) 2022년09월22일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2023년04월11일
- (86) 국제출원번호 PCT/EP2022/076456
- (87) 국제공개번호 WO 2023/046873
국제공개일자 2023년03월30일
- (30) 우선권주장
2113747.6 2021년09월27일 영국(GB)
2210102.6 2022년07월09일 영국(GB)

- (71) 출원인
유니버시티 오브 플리머쓰
영국 피엘4 8에이에이 플리머쓰 테븐 드레이크 서커스
- (72) 발명자
페예르, 기오르기
영국, 테븐 피엘6 8비유, 테리포드 플리머쓰, 리서치 웨이 14, 테리포드 리서치 패컬티 (디알에프 122) 유니버시티 오브 플리머쓰, 패컬티 오브 헬스, 스쿨 오브 바이오메디컬 사이언시스
로파테카, 저스티나
영국, 테븐 피엘6 8비유, 테리포드 플리머쓰, 리서치 웨이 14, 테리포드 리서치 패컬티 (디알에프 122) 유니버시티 오브 플리머쓰, 패컬티 오브 헬스, 스쿨 오브 바이오메디컬 사이언시스
- (74) 대리인
특허법인정진

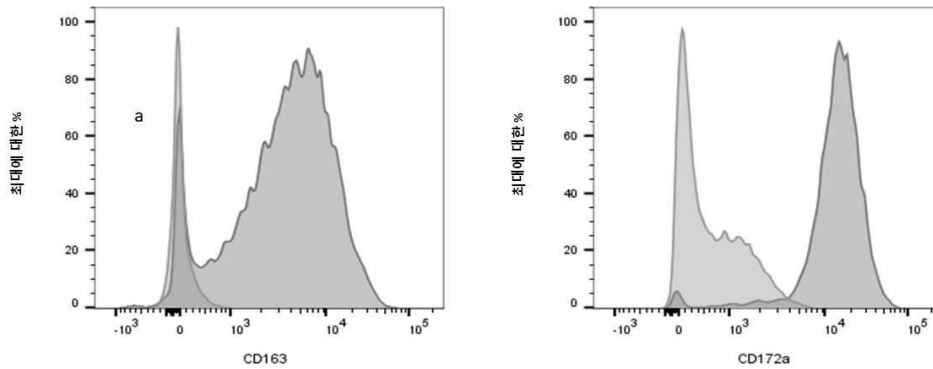
전체 청구항 수 : 총 22 항

(54) 발명의 명칭 비형질전환 대식세포 세포주의 생성 방법

(57) 요약

돼지로부터 얻은 장기 유래의 세포 제제를 GM-CSF를 첨가한 배양 배지에서 배양하여 세포 집단을 자기재생성 비형질전환 대식세포로 분화시키는 단계를 포함하는, 지속적으로 복제하는, 비형질전환 돼지 대식세포를 생산하는, 방법.

대표도 - 도1



돼지 대식세포

(52) CPC특허분류

A61K 39/4622 (2023.05)

C12N 2501/22 (2013.01)

C12N 2502/1352 (2013.01)

C12N 2510/04 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

돼지로부터 얻은 장기 유래의 세포 제제(cell preparation)를 GM-CSF가 첨가된 배양 배지에서 배양하여 세포 집단(cell population)을 자기재생성 비형질전환 대식세포(self-renewing, non-transformed macrophages)로 분화시키는 단계를 포함하는 지속적으로 복제하는, 비형질전환 돼지 대식세포(continuously replicating, non-transformed macrophages)의 생산 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,
세포 제제를 피더 세포(feeder cells)와 함께 배양하는, 방법.

청구항 3

제2항에 있어서,
피더 세포가 중간엽 피더 세포를 포함하는, 방법.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,
대식세포가 돼지 대식세포 마커 CD163 및 CD172a의 발현을 특징으로 하는, 방법.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서,
대식세포가 인테그린 알파 M(CD11b) 및/또는 MHC 클래스 II 세포 표면 수용체(HLA-DR)의 발현을 특징으로 하는, 방법.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서,
돼지 태아 비장 세포를 기반으로 하는, 방법.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항의 방법에 의해 얻을 수 있는 대식세포.

청구항 8

제7항에 있어서,
의학 및/또는 의학/약학 연구에 사용하기 위한, 대식세포.

청구항 9

제7항에 있어서,
백신 생산에 사용하기 위한, 대식세포.

청구항 10

GM-CSF 유래의, 지속적으로 복제하는, 비형질전환 돼지 대식세포 세포주.

청구항 11

제10항에 있어서,
대식세포가 돼지 대식세포 마커 CD163 및 CD172a의 발현을 특징으로 하는, 세포주.

청구항 12

지속적으로 복제하는, 비형질전환 돼지 대식세포 시스템.

청구항 13

제12항에 있어서,
돼지 대식세포 마커 CD163 및 CD172a의 발현을 특징으로 하는 시스템.

청구항 14

지속적으로 복제하는, 비형질전환 돼지 대식세포를 생산하는 방법으로서,
- 대식세포를 분화시키기 위해 GM-CSF와 함께 돼지 세포를 배양하는 단계; 및
- 부유 대식세포를 선별하고 이들을 피더 세포 배양물로 옮기는 단계
를 포함하는, 방법.

청구항 15

제14항에 있어서,
조건부 불멸화 세포주를 생성하기 위해 tsA58을 사용하여 피더 배양물로부터 부유 대식세포를 형질도입하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 16

지속적으로 복제하는, 비형질전환 돼지 대식세포를 생산하는, 방법으로서,
- 대식세포를 분화시키기 위해 GM-CSF와 함께 돼지 세포를 배양하는 단계; 및
- tsA58로 대식세포를 형질도입하여 조건부 불멸화 세포주를 생성하는 단계
를 포함하는, 방법.

청구항 17

돼지세포를 배양하여 대식세포를 분화시키는 단계; 대식세포를 형질도입하여 불멸화 세포주를 생성하는 단계를 포함하는, 지속적으로 복제하는, 비형질전환 돼지 대식세포를 생산하는, 방법.

청구항 18

제17항에 있어서,
대식세포가 tsA58을 사용하여 형질도입되는, 방법.

청구항 19

아프리카돼지열병 바이러스의 복제를 지원할 수 있는 자기재생성 비형질전환 대식세포 세포주.

청구항 20

PLTA58로 지정된 세포주.

청구항 21

돼지로부터 얻은 장기 유래의 세포 제제를 GM-CSF가 첨가된 배양 배지에서 배양하여 세포 집단을 자기재생성 비

형질전환 대식세포로 분화시키는 단계를 포함하는, 지속적으로 복제하는, 비형질전환 대식세포를 생산하는, 방법.

청구항 22

GM-CSF 의존성, 자기재생성 비형질전환 돼지 대식세포 세포주.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 일반적으로 대식세포에 관한 것이며, 특히, 이에 국한되지는 않지만, GM-CSF 의존성, 자기재생성 (self-renewing), 비형질전환 돼지 대식세포의 확립에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 대식세포는 박테리아 및 기타 유해 유기체의 검출, 식세포작용 및 파괴에 관여하는 특수화된 세포이다. 또한, 이들은 T 세포에 항원을 제시하고 다른 세포를 활성화하는 분자(사이토카인으로 알려짐)를 방출하여 염증을 개시시킬 수도 있다.

[0003] 대식세포는 감염에 대한 방어에 중요하며 시험관 내에서 (*in vitro*) 이러한 세포를 이용한 연구는 숙주-병원체 상호작용을 이해하고 백신 개발을 뒷받침하는 데 중요하다.

[0004] 대식세포는, 이들의 발달 및 기관 분포에 따라, 매우 뚜렷한 특성을 가지고 있다. 이전에는 폐포 대식세포(AM)를 포함한 모든 조직 상주 대식세포는 제한된 수명을 갖는 골수 조혈 줄기 세포(HSC) 유래 세포로 여겨졌다. 그러나 최근 연구는 대부분의 조직 상주 대식세포가 별개의 기능적으로 구별되는 배아 대식세포 유래 계통을 나타내는 것을 실증하였다(1). 대부분의 조직 상주 대식세포는 대식세포 콜로니 자극 인자(M-CSF) 구동 자기재생성 세포인 반면, AM은 과립구-대식세포 콜로니-자극 인자(GM-CSF) 의존적이고 자율적으로 성장하는 세포이다. AM은 병원체에 대한 민감성과 반응을 포함하여 대식세포 사이에서 독특한 특성을 가지고 있다(2).

[0005] 형질전환된 세포주는 초대 세포를 정확하게 나타내지 못할 수 있으므로, 대식세포는 초대 세포를 사용하여 가장 잘 조사되고 있다. 대식세포 발생기전 연구는 대부분 기관에서 직접 분리된 세포를 사용하거나 골수 전구세포 또는 말초혈액단핵세포(PBMC)에서 생체 외에서 (*ex vivo*) 생산된 M-CSF 유래 대식세포를 사용한다(3). 인간 PBMC로부터의 GM-CSF 유래 대식세포는 인간 폐 AM을 모델링하는 데 사용될 수 있다(4). 그럼에도 불구하고, 이러한 방법은 제한된 수명을 갖는 세포를 제공하고, 이용가능성이 제한되며, 유전적으로 조작하기 어렵고, 기증자 간 상당한 변동성으로 인해 사용이 제한된다.

[0006] 대식세포 시스템을 포함한 마우스 모델은 생체내 (*in vivo*) 조직 및 실험에 비교적 쉽게 접근할 수 있기 때문에 인간 및 수의학 감염을 연구하는 데 자주 사용되고 있다. 그러나, 서로 다른 포유류 종 사이의 대식세포 반응 및/또는 세포내 병원체 복제와 관련하여 상당한 차이가 있으며, 이는 무린 연구의 유용성을 제한한다(5).

[0007] 최근에 본 발명자들은 태아 간에서 무제한적인 양의 초대 세포를 제공하는 새로운 비형질전환 지속적으로 성장하는 무린 대식세포 모델(MPI 세포)을 확립했다. 이 강건한 시스템은 시험관 내에서 (*in vitro*) 다양한 호흡기 병원체에 대한 무린 AM 특이적 반응을 충실하게 재현한다(6).

[0008] 돼지에서의 대식세포 연구는 매우 중요하다(5). 돼지는 대식세포 내에서 복제되고 및/또는 대식세포 기능을 근본적으로 변화시키는 다양한 바이러스(예를 들어, 아프리카돼지열병 바이러스[ASFV], 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스[PRRSV] 및 인플루엔자 A 바이러스[IAV]) 및 박테리아(예를 들어, 마이코박테리움 아비움 (*Mycobacterium avium*) 및 살모넬라균 (*Salmonella spp.*)) 병원체에 매우 민감하다(7-9). 이러한 병원체 중 일부는 돼지에서 인간으로 확산되며 이들에게 심각한 질병을 유발한다(예를 들어, IAV)(9). 더욱이, 돼지(*swine*) 모델은, 기도의 해부학과 기능 그리고 질병 감수성이 마우스 모델에 비해 서로 훨씬 더 가깝기 때문에, 돼지와 인간 생리학의 생의학 연구에서 점점 더 많이 사용되고 있다(10).

[0009] M-CSF는 돼지 대식세포를 단핵구와 구별하는 데 사용될 수 있으며 LPS 자극 대식세포에 대한 상세한 분석은 돼지와 인간 MCSF 유래 대식세포 사이의 밀접한 기능적 관계를 보여주었다(5). 그러나, 이러한 MCSF 유래 대식세포는 골수에서 갓 분화되어야 하며 마우스 및 인간 세포와 유사하게 제한된 수명을 가지며, 이는 바이러스 백신

생산에 부적합도록 만들고 연구 및 백신 생산에 적합하고 강건한 일차 비-형질전환 연속 돼지 대식세포 세포주는 이용할 수 없다.

- [0010] 이러한 대식세포주는 IAV, ASFV 및 PRRSV와 같은 중요한 병원체를 연구하는 데 필요하다.
- [0011] 인간과 돼지는 IAV의 천연 숙주이며 질병은 이들 중 사이에서 양방향으로 퍼질 수 있다(9). IAV는 인간 사망의 주요 전염성 원인이다. AM과 선천성 면역 반응은 IAV 감염의 발병에 중요한 역할을 한다(11). 돼지는 광범위한 IAV 스트레인에 취약하며 조류 및 인간 IAV 계통 모두 돼지에서 복제되므로 이러한 병원체의 "혼합 용기(mixed vessel)"로 간주되고 동시 감염은 가장 최근의 2009년의 대유행에 관여한 삼중(조류-인간-돼지) 재배열체(reassortant) H1N1 스트레인과 같은 새로운 바이러스를 유발할 수 있다.
- [0012] ASFV와 PRRSV는 경제적으로 매우 중요한 병원체이다. 이들 바이러스는 대식세포에서만 거의 전적으로 복제되므로, 효율적인 연구 및 백신 개발을 위해서는 지속적으로 성장하는 허용(permissive) 대식세포계의 확립이 필요할 것이다(7, 8). ASFV는 돼지에서 파괴적인 에볼라병-유사 출혈 증후군을 유발한다. 이것은 감염된 거의 모든 동물을 죽게 만들고, 2018년과 2019년에는 거의 150만 마리의 돼지와 10,000마리의 멧돼지의 사망을 초래했다. 백신이 없기 때문에 질병 통제가 제한되며, 연구는 바이러스가 대식세포 기능과 상호작용하고 조절하는 방식을 더 잘 이해하기 위한 방향으로 진행되고 있다. 이는 중요한데, 항-인터페론 바이러스 유전자가 제거된 잠재적인 백신 균주는 바이러스 성장을 제한하고 정상적인 대식세포에서 효율적인 백신 생산을 방해하는 강력한 선천적 반응을 유도하기 때문이다(7).
- [0013] PRRSV는 경제적으로 가장 중요한 돼지 병원체 중 하나이고, 대부분의 돼지고기 생산 국가에 풍토성(endemic)이며, 폐 AM은 천연 감염에서 바이러스의 주요 표적이다(8). 급속하게 다양화되고 있는 2가지 구별되는 PRRSV 종이 있으며, 출현하는 고병원성 균주는 빠른 속도로 확산되어 파괴적인 영향을 미친다. 예방접종(vaccination)은 질병을 제어하는 데 핵심이지만, 이용 가능한 백신은 충분히 예방적이지 못하여 적합한 시험관내(*in vitro*) 시스템이 매우 중요한 보다 안전하고 면역원성이 높은 백신을 개발해야 할 필요성이 크다.

발명의 내용

- [0014] 본 발명은 GM-CSF 유래, 지속적, 비형질전환 돼지 대식세포계의 확립에 관한 것이다.
- [0015] 돼지로부터 얻은 장기 유래의 세포 제제(cell preparation)를 GM-CSF를 첨가한 배양 배지에서 배양하여 세포 집단(cell population)을 자기재생성 비형질전환 대식세포로 분화시키는 단계를 포함하는, 지속적으로 복제하는 비형질전환 돼지 대식세포를 생산하는, 방법.
- [0016] 본 발명의 일 양태는 돼지로부터 얻은 장기 유래의 세포 제제를 GM-CSF를 첨가한 배양 배지에서 배양하여 세포 집단을 자기재생성 비형질전환 대식세포로 분화시키는 단계를 포함하는, 지속적으로 복제하고, 비형질전환 돼지 대식세포를 생산하는, 방법을 제공한다.
- [0017] 세포 제제는 중간엽 피더 세포(feeder cells)와 같은 피더 세포와 함께 배양될 수 있다.
- [0018] 이 방법을 사용하여 제조된 대식세포는 돼지 대식세포 마커 CD163 및 CD172a의 발현을 나타낼 수 있다.
- [0019] 세포 제제는 돼지 태아 비장 세포를 기반으로 할 수 있다.
- [0020] 본 발명은 또한 본원에 기술되고/되거나 정의된 방법에 의해 획득되거나 획득 가능한 대식세포를 제공한다.
- [0021] 본 발명은 또한 의학 및/또는 의학/약학 연구에 사용하기 위해 본원에 기술된 방법에 의해 얻을 수 있는 대식세포를 제공한다.
- [0022] 본 발명은 또한 백신 생산에 사용하기 위해 본원에 기술된 방법에 의해 얻을 수 있는 대식세포를 제공한다.
- [0023] 본 발명은 또한 GM-CSF 유래의, 연속적으로 복제하는, 비형질전환 돼지 대식세포 세포주를 제공한다.
- [0024] 대식세포는 돼지 대식세포 마커 CD163 및 CD172a의 발현을 나타낼 수 있다.
- [0025] 본 발명은 또한 지속적으로 복제하고 비형질전환 돼지 대식세포 시스템을 제공한다.
- [0026] 시스템은 돼지 대식세포 마커 CD163 및 CD172a의 발현을 나타낼 수 있다.
- [0027] 본 발명의 일부 측면 및 실시양태는 GM-CSF 및 적합한 중간엽 피더 세포를 사용하여 돼지 조혈 기관으로부터 지속적으로 복제하고 비형질전환 대식세포를 얻을 수 있다는 원리 또는 관찰에 기초한다.

도면의 간단한 설명

도 1

지속적으로 성장하는 돼지 GM-CSF 유래 세포는 돼지 대식세포에 특징적인 마커를 발현한다.

스캐빈저 수용체 CD163 및 신호 조절 단백질 알파 CD172a에 대한 항체를 사용하여 FACS를 사용하여 돼지 대식세포에서 표면 마커를 검출했다. 히스토그램은 염색되지 않은 세포(파란색)와 염색된 세포(적색)를 보여준다.

도 2

매끄럽고 거친 형태의 LPS에 반응하여 돼지 대식세포의 생산된 TNF α 의 수준이 인간 대식세포의 수준과 유사하다.

도 3

인간 GMDM 및 돼지 대식세포에서의 TNF- α 반응은 소 태아 혈청(FBS)에 존재하는 LBP에 크게 의존한다. 세포를 S-LPS(100ng/ml) 및 R-LPS(100ng/ml)로 자극했다. 감염 후 16시간째에 상층액을 수집하고 TNF- α 를 ELISA로 측정했다. 막대는 3개 샘플 \pm S.E.M의 평균을 나타낸다.

도 4

반복된 LPS 자극에 대해 각각 MPI 및 돼지 대식세포에서 IL-6 및 TNF- α 생산이 감소했다(LPS 내성). (a) 세포를 자극하지 않거나(N) 50ng/ml S-LPS로 16시간 동안 자극하고(T), PBS로 세척하고 24시간 동안 배지(N) 또는 50ng/ml LPS로 보충했다(N+L 또는 T+L). 화살표는 LPS를 사용한 자극을 나타낸다. MPI(b) 및 돼지 대식세포(c)의 상층액을 ELISA로 분석했다.

도 5

다양한 조건에서 배양된 돼지 대식세포에서 S-LPS 및 IAV에 대한 비교 가능한 TNF- α 사이토카인 생산. 돼지 세포를 MOI 3으로 인플루엔자 A 바이러스 균주 Perth/16/09 및 S-LPS(100ng/ml)로 자극했다. 감염 후 16시간째에 상층액을 수집하고 TNF- α 를 ELISA로 측정했다. n=1

GM-CSF를 사용한 폐 섬유아세포 피더 배양물로부터 얻은 후 M-CSF, GM-CSF 및 GM-CSF/M-CSF 배양 돼지 대식세포의 반응 사이의 유사점.

새로 개발한 돼지 대식세포 모델과 관련된 첫 번째 질문 세트에서는 다양한 조건에서 성장하는 세포를 비교하는 것을 목표로 했다. 데이터는 이러한 돼지 대식세포가 성장 인자를 사용하여 피더 세포 없이 배양될 때 효율적으로 자극될 수 있음을 보여줍니다.

도 6

돼지 대식세포는 지질다당류로 공격한 후 초기 TNF- α 반응을 생성한다. 돼지 세포를 MOI 3으로 IAV 균주 Perth/16/09 및 S-LPS(100ng/ml)로 자극했다. 감염 후 16시간에 상층액을 수집하고 TNF- α 를 ELISA로 측정했다. n=1

S-LPS 및 IAV로 자극된 돼지 GM-CSF 유래 대식세포의 TNF- α 사이토카인 생산은 시간 의존적이다.

다음 실험에서는 다양한 시점에서 S-LPS 및 IAV로 공격받은 돼지 대식세포에서 중요한 전염증성 사이토카인 생산에 대해 관심을 가졌다. 도 6은 IAV가 아닌 S-LPS로 자극받은 돼지 대식세포에서의 초기 TNF- α 생산을 보여준다. 또한, IAV 반응은 내독소에 의해 유발된 반응에 비해 낮았다.

도 7

렌티바이러스를 발현하는 RFP로 형질도입된 돼지 및 MPI 대식세포. 이러한 데이터는 돼지 대식세포가 마우스 MPI 대식세포와 유사하게 렌티바이러스 벡터에 의한 재조합 단백질 발현을 위해 효율적으로 표적화될 수 있음을 실증한다.

도 8.

피더 세포에서 분리된 GM-CSF를 사용한 돼지 대식세포의 확장 배양. 대식세포의 특징인 다핵거대세포는 일반적인 크기의 세포에서도 확인할 수 있었다.

도 9

폐 섬유아세포 피더 세포(A)에서 성장하는 돼지 대식세포 세포 및 피더 없이 옮기고 분리된 부유 대식세포(B).

도 10

STO 섬유아세포 세포주에서 성장한 돼지 대식세포.

도 11

성장 인자(GM-CSF 및/또는 MCSF)가 있거나 없는 배양물에서 확인되는 PLTA58 세포의 인자 의존성.

도 12

불멸의 돼지 세포에 대한 FACS 데이터.

PLTA58 세포는 전형적인 돼지 대식세포 마커를 발현했다.

도 13.

박테리아 지질다당류(LPS)로 자극된 PLTA58 세포

도 14

폴리 I:C, Fsl-1 또는 R848로 자극된 PLTA58 세포.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0029] 이 시스템과 관련하여 이하의 데이터를 얻었다.
- [0030] 1. 본 발명자들은 대식세포를 분화시키기 위해 돼지 태아의 비장세포를 20 μ g/ml GM-CSF로 배양했다. 정기적인 배지 교체 및 두 가지 다른 세포 유형을 포함하는 GM-CSF 배양액의 보충 후에 개발을 진행했다. 평평하고, 중간엽 또는 섬유아세포 유사 세포는 둥글고 느슨하게 부착된 대식세포 유사 세포 상에서 덩어리로 자라고, 이들 후자 세포 중 일부는 또한 배지 내에 부유했다. GM-CSF는 비장 세포 배양물로서 두 세포 모두의 발달에 필요했으며, 이것이 없으면 생존 가능한 세포가 생산되지 못했다. 이러한 배양물은 정기적인 배지 교체로 적어도 1년 동안 유지될 수 있었다.
- [0031] 2. 부유 대식세포-유사 세포를 GM-CSF와 별도로 배양하려고 시도했다. 이들 세포는 몇 주 동안 살아 있는 동안 더 이상 증식하지 않았다. 분리된 부유세포도 MCSF 또는 GM-CSF 및 MCSF와 함께 배양했다. 이러한 MCSF 배양물은 초기에 강건한 세포 증식을 나타냈으며; 그러나 성장 후 일주일 이 지나면 세포의 증식이 중단되었다.
- [0032] 3. 부유 대식세포-유사 세포를 돼지 배아 폐 섬유아세포 배양물로 옮겼고, 비장 유래 섬유아세포가 포함된 원래 배양과 유사하게, 폐 섬유아세포 피더 세포 상단에 부착되어 증식했다. 이들은 덩어리로 자랐으며 이들 세포 중 많은 수가 배지에 부유하고 있었다. 이러한 배양물은 정기적인 배지 교체로 1년 이상 유지되었다.
- [0033] 4. 폐 섬유아세포 피더 배양물로부터의 부유 세포를 GM-CSF와 함께 그러나 피더 세포 없이 배양했다. 이들 세포는 연장된 시간 기간 동안 생존했으나 추가로 유의하게 성장하지는 않았다.
- [0034] 5. 피더 함유 배양물로부터 분리된 부유 세포는 돼지 대식세포 마커 CD163 및 CD172a를 강하게 발현한다.
- [0035] 6. 피더 함유 배양물로부터 분리된 부유 대식세포는 박테리아 내독소(LPS) 자극에 대해 강력한 사이토카인 반응을 생성한다.
- [0036] 7. 피더 함유 배양물로부터 분리된 부유 대식세포는 적어도 4회 계대 동안 돼지 GM-CSF를 사용하여 미토마이신 처리된 STO 섬유아세포 계열 피더 세포에 연속적으로 계대배양될 수 있다. 이들은 지속적으로 성장하며 대략 3-4일의 분열 시간(doubling time)을 나타낸다.
- [0037] 8. GM-CSF로 돼지 태아 골수를 배양하면, 비장에서 배양한 것과 유사한 배양물이 중간엽/섬유아세포 유사 부착 세포 및 부유 대식세포-유사 세포와 함께 발달한다. 부유 세포는 미토마이신 처리된 STO 섬유아세포 세포로 옮겨지면 GM-CSF가 있을 때 증식하지만, 비장의 유사한 세포보다 더 느리게 증식한다.
- [0038] 9. 피더 배양물로부터 분리된 부유 대식세포를 SV40 Large T 항원 tsA58 온도 민감성 돌연변이를 발현하는 2세대 렌티바이러스로 형질도입했다(Jat, P. S. & Sharp, P. A. (1989) Mol. Cell. Biol. 9, 1672-1681.). SV40 Large T 항원의 tsA58 돌연변이체는 온도민감성이고 조건부 불멸화 세포주(conditionally immortalized cell

lines)를 생성하는 데 사용할 수 있다(Jat, P. S. & Sharp, P. A. (1989) Mol. Cell. Biol. 9, 1672-1681.) 획득된 세포(PLTA58 세포로 알려짐)는 피더 세포 없이도 강건하게 자란다. 이러한 데이터는 문헌[Takenouchi et al, Front Vet Sci 2017 Aug 21;4:132]의 이전 데이터와는 상당한 차이를 나타내고, 돼지 신장 유래 대식세포의 비조건적(unconditioned) 세포 불멸화는 텔로머라제 단백질과 야생형 SV40 대형 T 항원의 결합된 발현에 의해서만 달성될 수 있다.

- [0039] 10. PLTA58 세포는 피더 세포 없이 지속적으로 성장하며, 본 발명자들은 2021년 12월에 확립 후 적어도 20회의 계대를 진행했다. 본 발명자들은 배양 1주에 T75 배양 플라스크에서 정기적으로 적어도 1천만 개의 세포를 얻을 수 있었다. 세포를 동결시켰다가 해동한 후 다시 효율적으로 배양할 수 있었다.
- [0040] 11. PLTA58 세포는 인자 의존적이며 GMCSF 및/또는 MCSF에 의해 성장이 향상된다.
- [0041] 12. PLTA58 세포는 돼지 대식세포 마커를 발현한다.
- [0042] 13. PLTA58 세포는 LPS(TLR4 리간드), Fsl-1(TLR2 리간드), 폴리I:C(TLR3 리간드) 및 R848(TLR7/8 리간드)과 같은 다양한 선천적 반응 유도 리간드로 효율적으로 자극될 수 있다.
- [0043] 14. PLTA58 세포는 아프리카돼지열병 바이러스의 복제를 지원한다.
- [0044] 본 발명의 다양한 양태 및 실시형태는 별도로 또는 함께 사용될 수 있다.
- [0045] 본 발명의 더욱 특별하고 바람직한 양태는 첨부된 독립항 및 종속항에 기재되어 있다. 종속항의 특징은 적절하게 독립항의 특징과 결합될 수 있으며, 청구항에 명시적으로 제시된 것 이외의 조합으로 결합될 수 있다.
- [0046] 본 발명은, 첨부된 도면에서, 예를 들어, 더욱 구체적으로 도시되고 설명된다.
- [0047] 예시적인 실시형태는 해당 기술분야의 통상의 기술자가 본 명세서에 설명된 시스템 및 프로세스를 구현하고 실시할 수 있도록 충분히 자세하게 설명되어 있다. 실시형태는 다양한 대안적인 형태로 제공될 수 있으며, 본 명세서에 설명된 예에 제한되는 것으로 해석되지 않아야 한다는 점을 이해하는 것이 중요하다.
- [0048] 따라서, 실시형태는 다양한 방식으로 수정될 수 있고 다양한 대안적인 형태를 취할 수 있지만, 특정 실시형태는 도면에 도시되어 있으며 예로서 아래에서 자세히 설명된다. 개시된 특정 형태로 제한하려는 의도는 없다. 오히려, 첨부된 청구범위에 속하는 모든 수정, 균등물, 대체물이 포함되어야 한다.
- [0049] 달리 정의되지 않는 한, 본 명세서에 사용된 모든 용어(기술 및 과학 용어 포함)는 해당 분야의 관행에 따라 해석되어야 한다. 일반적으로 사용되는 용어는 본 명세서에서 명시적으로 정의되지 않는 한 이상화되거나 지나치게 형식적인 의미로 해석되어서는 아니되며, 관련 기술 분야에서 관행적으로 해석되어야 한다는 것 또한 이해될 것이다.
- [0050] 설명에서, 상부, 하부, 반경 방향 및 축 방향과 같은 모든 배향에 관한 용어는 도면과 관련하여 사용되며 본 발명을 제한하는 것으로 해석되어서는 아니된다.
- [0051] 본 발명의 예시적인 실시형태가 첨부된 도면을 참조하여 본 명세서에 상세하게 개시되어 있지만, 본 발명은 도시된 정확한 실시형태에 제한되지 않으며 첨부된 청구범위 및 그의 균등물에 의해 정의된 본 발명의 범위를 벗어나지 않고 통상의 기술자에 의해 다양한 변경 및 수정이 이루어질 수 있다는 것이 이해되어야 한다.

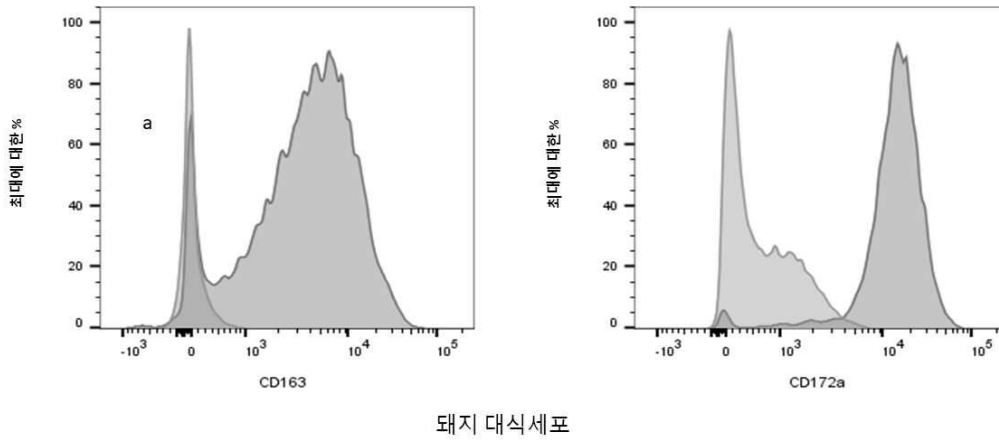
[0052] 참조문헌

1. Guilliams M, Mildner A, & Yona S (2018) Developmental and functional heterogeneity of monocytes. *Immunity* 49(4):595-613.
2. Hussell T & Bell TJ (2014) Alveolar macrophages: plasticity in a tissue-specific context. *Nature reviews immunology* 14(2):81-93.
3. Geissmann F, Gordon S, Hume DA, Mowat AM, & Randolph GJ (2010) Unravelling mononuclear phagocyte heterogeneity. *Nature Reviews Immunology* 10(6):453.
4. Akagawa KS, *et al.* (2006) Functional heterogeneity of colony-stimulating factor-induced human monocyte-derived macrophages. *Respirology* 11:S32-S36.
5. Kapetanovic R, *et al.* (2012) Pig bone marrow-derived macrophages resemble human macrophages in their response to bacterial lipopolysaccharide. *The Journal of Immunology* 188(7):3382-3394.
6. Fejer G, *et al.* (2013) Nontransformed, GM-CSF-dependent macrophage lines are a unique model to study tissue macrophage functions. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110(24):E2191-E2198.
7. Dixon L, Islam M, Nash R, & Reis A (2019) African swine fever virus evasion of host defences. *Virus research*.
8. Singleton H, Graham SP, Bodman-Smith KB, Frossard J-P, & Steinbach F (2016) Establishing porcine monocyte-derived macrophage and dendritic cell systems for studying the interaction with PRRSV-1. *Frontiers in microbiology* 7:832.
9. Nelson MI & Vincent AL (2015) Reverse zoonosis of influenza to swine: new perspectives on the human-animal interface. *Trends in microbiology* 23(3):142-153.
10. Walters EM, Wells KD, Bryda EC, Schommer S, & Prather RS (2017) Swine models, genomic tools and services to enhance our understanding of human health and diseases. *Lab animal* 46(4):167.
11. Pulendran B & Maddur MS (2015) Innate Immune Sensing and Response to Influenza. *Current topics in microbiology and immunology* 386:23.
12. Lo Iacono M, *et al.* (2018) Wharton's Jelly Mesenchymal Stromal Cells Support the Expansion of Cord Blood-derived CD34+ Cells Mimicking a Hematopoietic Niche in a Direct Cell-cell Contact Culture System. (SAGE Publications Sage CA: Los Angeles, CA).

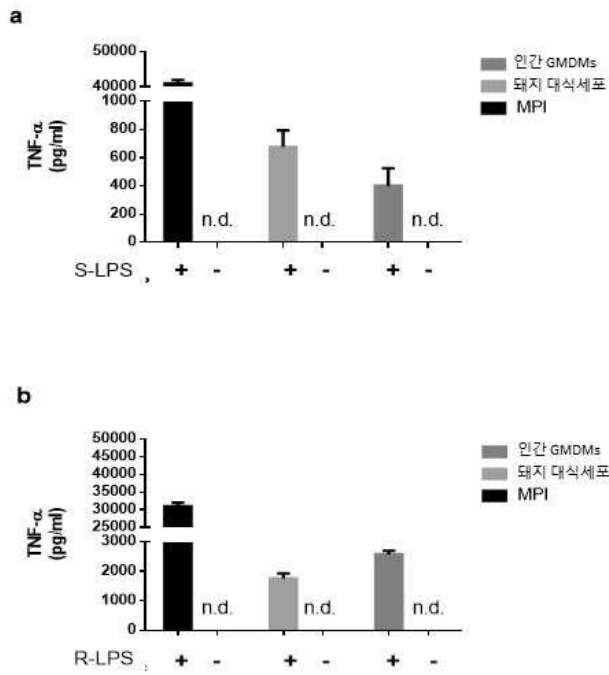
[0053]

도면

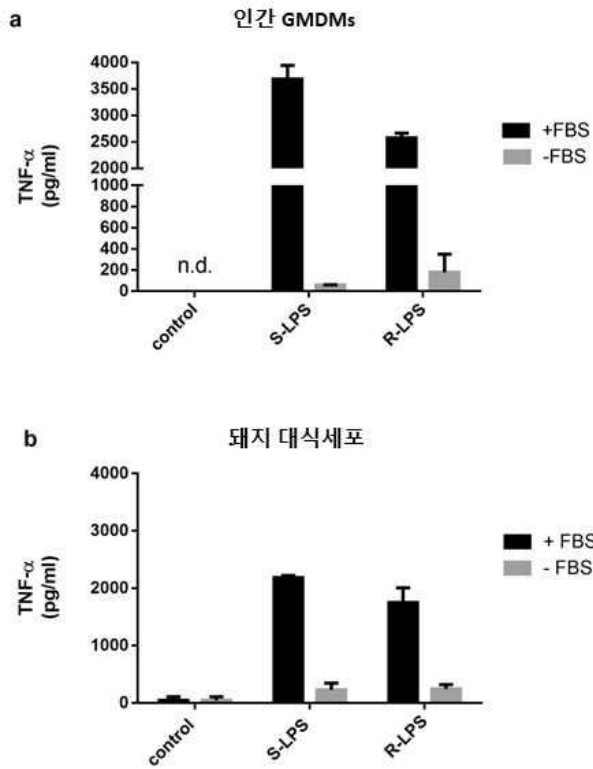
도면1



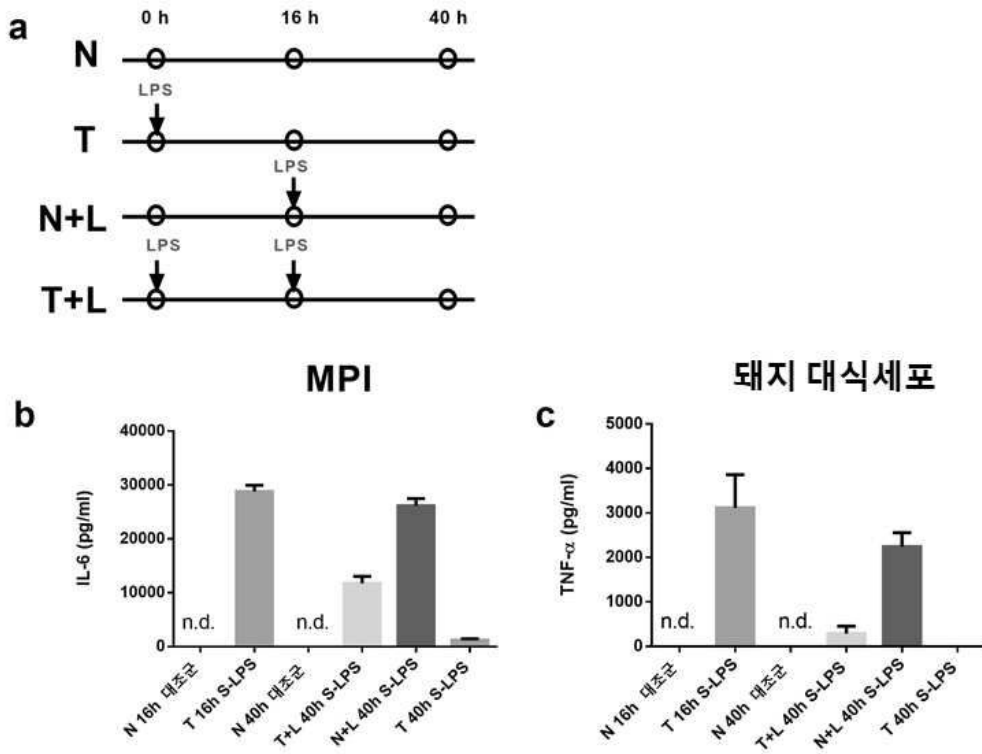
도면2



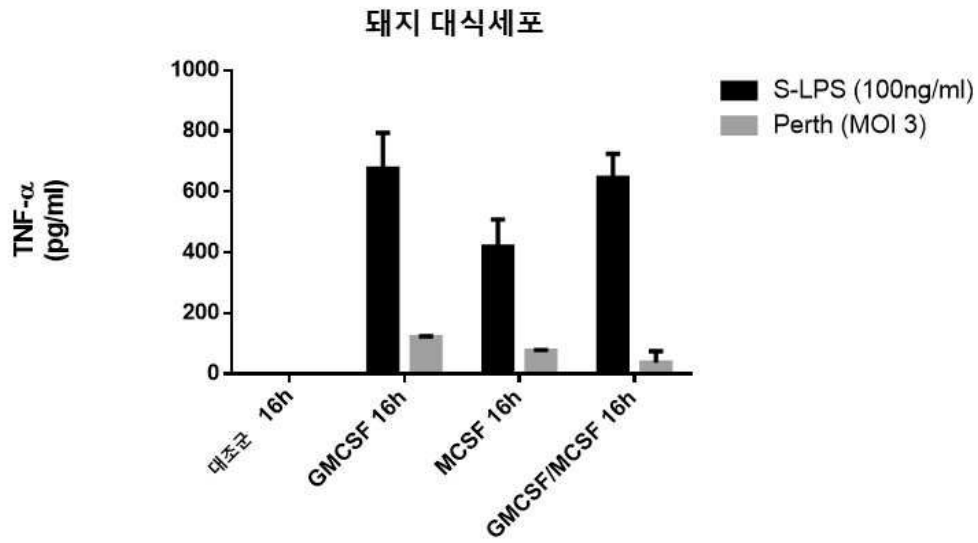
도면3



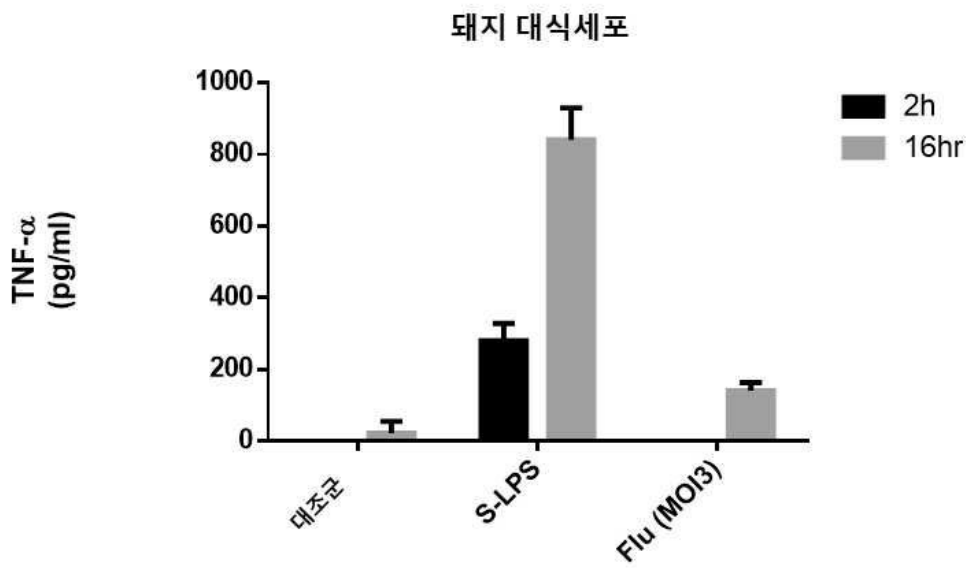
도면4



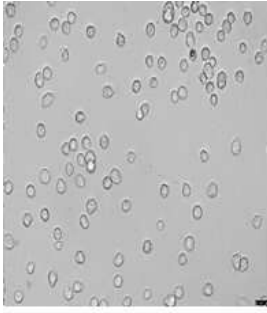
도면5



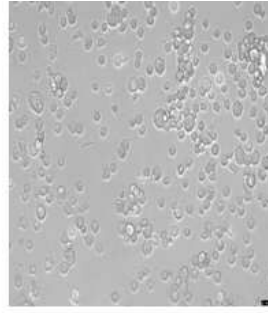
도면6



도면7

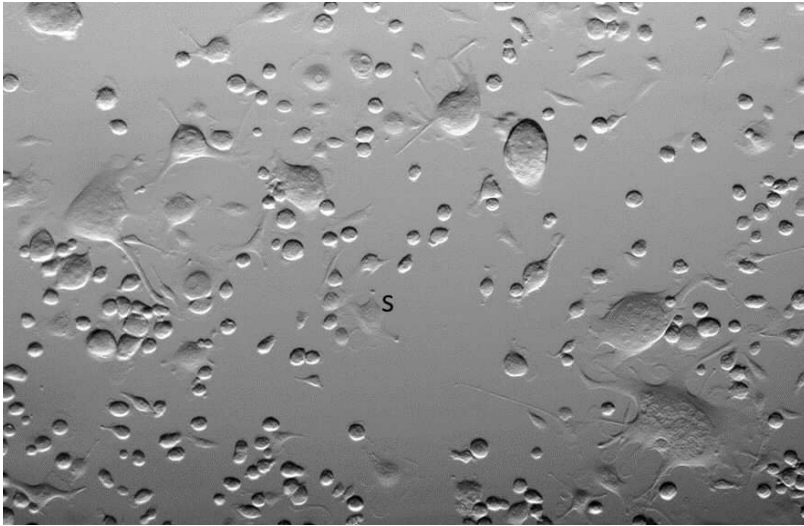


돼지 대식세포

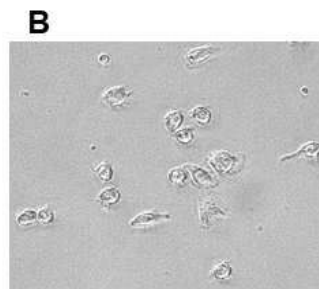
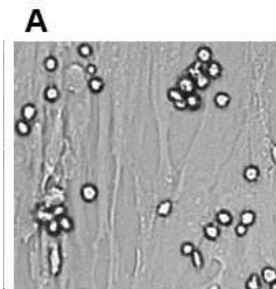


Mouse MPI 세포

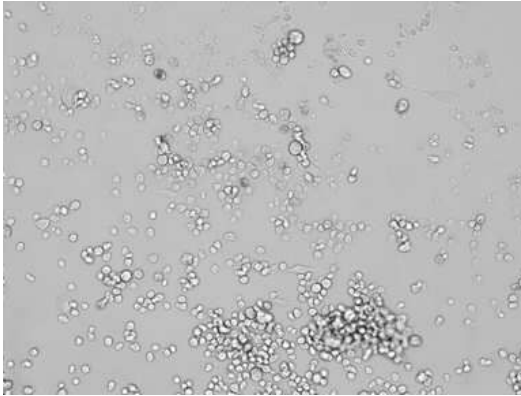
도면8



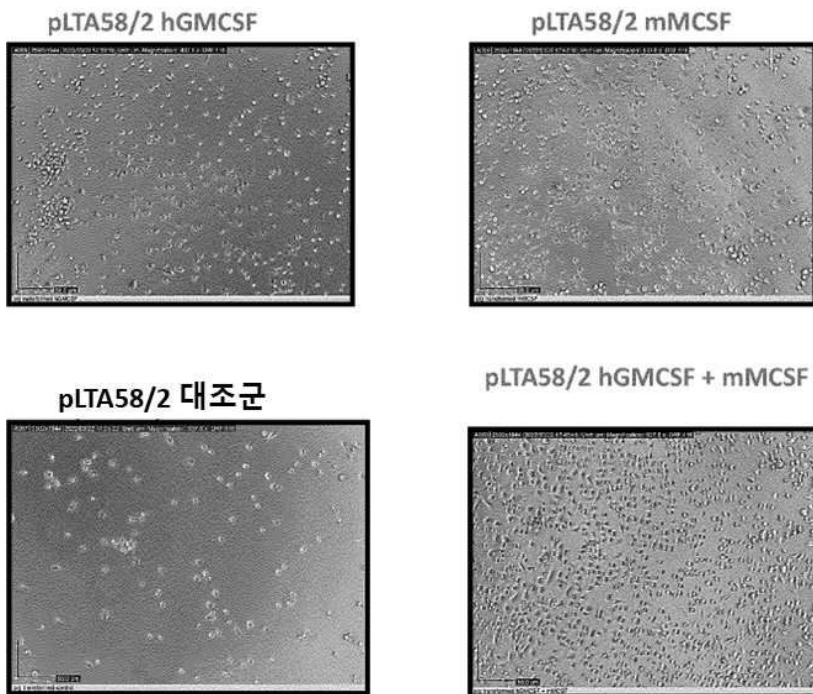
도면9



도면10



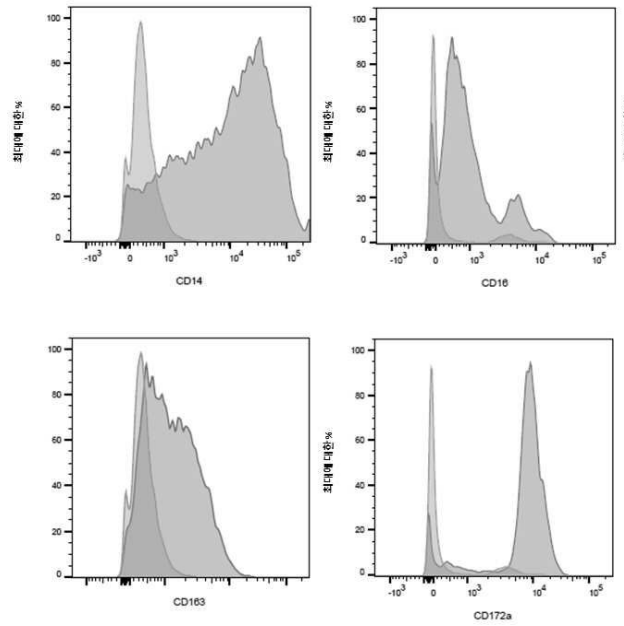
도면11



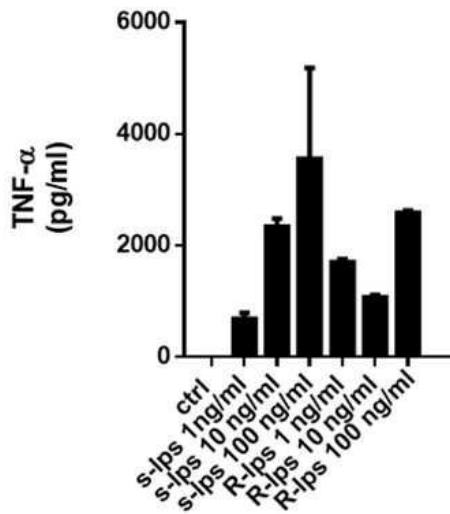
PLTA58 세포를 성장 인자 (GMCSF 및/또는 MCSF)와 함께 또는 없이 성장시켰음

도면12

PLTA58 세포는 전형적인 돼지 대식세포 마커를 발현한다

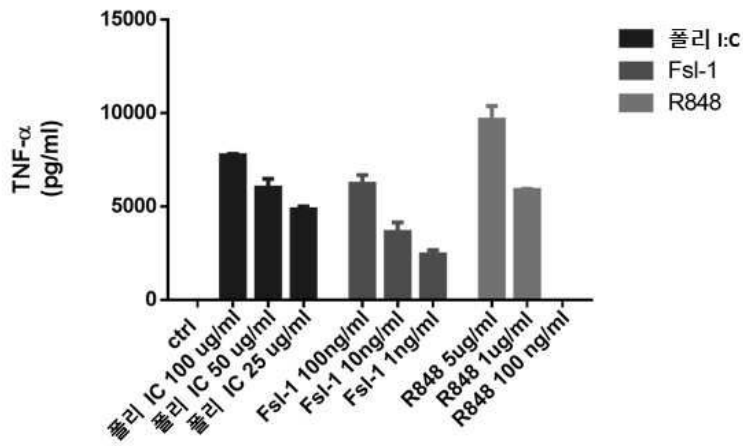


도면13



PLTA58 세포를 박테리아 지질다당류 (LPS)로 자극시켰음

도면14



PLTA58 세포를 폴리 I:C, Fsl-1 또는 R848로 자극시켰음