



등록특허 10-2645622



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년03월11일
(11) 등록번호 10-2645622
(24) 등록일자 2024년03월05일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A01K 67/027 (2024.01) *C07K 14/47* (2006.01)
C07K 14/53 (2024.01) *C07K 14/54* (2024.01)
C12N 15/85 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A01K 67/0278 (2024.01)
C07K 14/47 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2023-7036218(분할)
- (22) 출원일자(국제) 2013년09월06일
 심사청구일자 2023년11월20일
- (85) 번역문제출일자 2023년10월23일
- (65) 공개번호 10-2023-0153500
- (43) 공개일자 2023년11월06일
- (62) 원출원 특허 10-2022-7041881
 원출원일자(국제) 2013년09월06일
 심사청구일자 2022년12월26일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2013/058448
- (87) 국제공개번호 WO 2014/039782
 국제공개일자 2014년03월13일
- (30) 우선권주장
 61/698,002 2012년09월07일 미국(US)
 61/775,171 2013년03월08일 미국(US)
- (56) 선행기술조사문헌
 US20110200982 A1*
 (뒷면에 계속)
- 전체 청구항 수 : 총 6 항

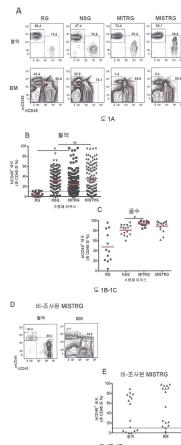
심사관 : 박영관

(54) 발명의 명칭 유전적으로 변형된 비-인간 동물 및 이것들의 사용 방법

(57) 요약

본 발명은 일반적으로 인간 폴리펩티드를 발현하는 유전적으로 변형된 비-인간 동물 및 그것들의 사용 방법에 관한 것이다.

대 표 도



(52) CPC특허분류

C07K 14/53 (2013.01)
C07K 14/5403 (2013.01)
C12N 15/8509 (2013.01)
A01K 2207/12 (2013.01)
A01K 2227/105 (2013.01)
A01K 2267/0387 (2013.01)

(72) 발명자

롱박스 안토니

미국 코네티컷 06511 뉴 하aven 콜드 스프링 스트리트 153

스트로위그 팀

미국 코네티컷 06511 뉴 하aven 텁튼 스트리트 20
월링거 팀

미국 코네티컷 06511 뉴 하aven 오랜지 스트리트 825
아파트먼트 2

머피 앤드류 제이.

미국 뉴욕 10520 크로顿-온-허드슨 뉴튼 코트 10

스티븐스 선

미국 캘리포니아 92122 샌 디에고 카미노 칼마 3954

얀코풀로스 조지

미국 뉴욕 10598 요크타운 헤이츠 밥티스트 쳐치
로드 1519

(56) 선행기술조사문헌

US20120157667 A1*
WO201204207 A3
Proc Natl Acad Sci USA vol.108 no.32
pp.13218-13223(2011)
Trends Immunol. vol.32 no.7 pp.321-327(2011)
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

명세서

청구범위

청구항 1

다음을 포함하는 마우스 배아 줄기 (ES) 세포:

프로모터에 작동 가능하게 결합된 인간 M-CSF 폴리펩티드를 암호화하는 핵산;

프로모터에 작동 가능하게 결합된 인간 IL-3 폴리펩티드를 암호화하는 핵산;

프로모터에 작동 가능하게 결합된 인간 GM-CSF 폴리펩티드를 암호화하는 핵산;

프로모터에 작동 가능하게 결합된 인간 SIRP α 폴리펩티드를 암호화하는 핵산; 및

프로모터에 작동 가능하게 결합된 인간 TPO 폴리펩티드를 암호화하는 핵산.

청구항 2

제1 항에 있어서, 마우스 ES 세포는 게놈에

마우스 M-CSF 유전자 자리에서 인간 M-CSF 폴리펩티드를 암호화하는 핵산으로의 마우스 M-CSF 유전자의 대체;

마우스 IL-3 유전자 자리에서 인간 IL-3 폴리펩티드를 암호화하는 핵산으로의 마우스 IL-3 유전자의 대체;

마우스 GM-CSF 유전자 자리에서 인간 GM-CSF 폴리펩티드를 암호화하는 핵산으로의 마우스 GM-CSF 유전자의 대체;

인간 SIRP α 폴리펩티드를 암호화하는 핵산의 삽입; 및

마우스 TPO 유전자 자리에서 인간 TPO 폴리펩티드를 암호화하는 핵산으로의 마우스 TPO 유전자의 대체

를 포함하는 것을 특징으로 하는 마우스 ES 세포.

청구항 3

제1 항에 있어서, 마우스 ES 세포는 재조합 활성화 유전자 2 (Rag-2) 유전자 네아웃 및 IL2 수용체 감마 사슬 (IL2rg) 유전자 네아웃을 포함하는 것을 특징으로 하는 마우스 ES 세포.

청구항 4

제2 항에 있어서, 마우스 ES 세포는 재조합 활성화 유전자 2 (Rag-2) 유전자 네아웃 및 IL2 수용체 감마 사슬 (IL2rg) 유전자 네아웃을 포함하는 것을 특징으로 하는 마우스 ES 세포.

청구항 5

제1 항 내지 제4 항 중 어느 한 항의 마우스 ES 세포를 포함하는 마우스 배아.

청구항 6

유전적으로 변형된 마우스를 제조하는 방법으로서, 유전적으로 변형된 마우스는 프로모터에 작동 가능하게 결합된 인간 M-CSF 폴리펩티드를 암호화하는 핵산; 프로모터에 작동 가능하게 결합된 인간 IL-3 폴리펩티드를 암호화하는 핵산; 프로모터에 작동 가능하게 결합된 인간 GM-CSF 폴리펩티드를 암호화하는 핵산; 프로모터에 작동 가능하게 결합된 인간 SIRP α 폴리펩티드를 암호화하는 핵산; 및 프로모터에 작동 가능하게 결합된 인간 TPO 폴리펩티드를 암호화하는 핵산을 포함하며,

방법은 제5 항의 마우스 배아로부터 유전적으로 변형된 마우스를 제조하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

발명의 설명

기술 분야

관련 출원에 대한 교차-참조

[0001] 본 출원은 2012년 9월 7일에 출원된 미국 가출원 일련 번호 제61/698,002호, 및 2013년 3월 8일에 출원된 미국 가출원 일련 번호 제61/775,171호에 대한 이익을 주장하며, 이것들 각각의 내용은 그 전문이 본원에 참고로 포함된다.

배경 기술

[0003] 생체 의학적 연구의 목적은 인간 생리학의 더 나은 이해를 얻고 이 지식을 사용하여 인간 질환을 예방하거나, 치료하거나 치유하는 것이다. 인간 대상체에서의 실험에 대한 실용적 및 윤리적 장벽으로 인해, 많은 연구들이 마우스와 같은 소동물 모델에서 실행된다. 하지만, 마우스는 사람이 아니며 동물 실험으로부터 얻은 지식이 인간에게 항상 적용 가능한 것은 아니다. 이 맥락에서, 인간 혈액-림프구 시스템 (hemato-lymphoid system; HHS)으로 다시 채워진 마우스는 인간 혈액 생성(hematopoiesis) 및 생체 내 면역 기능의 연구에 유용한 소동물 모델을 제공한다.

[0004] HHLS 마우스는 인간 조혈모세포 및 전구세포 (hematopoietic stem and progenitor cell; HSPC) 및/또는 태아 조직의, 면역 반응의 선천적 및 후천적 팔이 없는 수령체 마우스로의 이식에 의해 발생된다. HHLS 마우스의 최초 모델은 1980년대 후반에 개발되었고 (Mosier et al, 1988, *Nature* 335:256-259; McCune et al, 1988, *Science* 241: 1632-1639; Kamel-Reid and Dick, 1988, *Science* 242: 1706-1709), 그 이후로 일련의 개선이 진행되고 있다 (Legrand et al, 2006, *Journal of Immunology* 176:2053-2058; Shultz et al, 2007, *Nature Reviews Immunology* 7: 118-130). 인간 조혈모세포 이식(hematopoietic engraftment)에 대한 수령체로서 현재 사용되는 마우스의 계통은 세 가지 특징을 공유한다. 첫 번째로, 그것들은 PRKDC 단백질을 암호화하는 유전자에서 *Scid* 돌연변이 (Mosier et al, 1988, *Nature* 335:256-259; McCune et al, 1988, *Science* 241: 1632-1639), 또는 두 개의 *Rag* 유전자 중 하나의 결실 (Shultz et al, 2000, *Journal of Immunology* 164:2496-2507; Traggiai et al, 2004, *Science* 304: 104-107)로 인해 B 및 T 세포가 없다. 두 번째로, 시토킨 수용체의 공통 감마 사슬 (γ_c)을 암호화하는 *Il2rg* 유전자의 결실 또는 돌연변이는 IL-15 신호전달을 폐지하고 NK 세포의 부재를 초래한다 (Traggiai et al, 2004, *Science* 304: 104-107; Ito et al. 2002, *Blood* 100:3175-3182). 세 번째로, 마우스 대식세포에서 발현된 SIRPA 수용체와 인간 세포 상의 CD47 리간드 사이의 상호작용은 마우스 대식세포에게 억제 신호를 제공하고 인간 이종 이식(xenograft)에 대한 식세포 내성을 부여한다 (Takenaka et al, 2007, *Nature Immunology* 8: 1313-1323; Takizawa & Manz, 2007, *Nature Immunology* 8: 1287-1289). 마우스 세포에서 발현되는 SIRPA 및 인간 CD47 사이에서 종 간 상호작용은 *Sirpa* 유전자에서 자연적 다형성을 함유하는 NOD 유전적 배경을 사용할 때 (Takenaka et al, 2007, *Nature Immunology* 8: 1313-1323; Takizawa & Manz, 2007, *Nature Immunology* 8: 1287-1289; Legrand et al, 2011, *Proc Natl Acad Sci USA* 108: 13224-13229) 또는 인간 SIRPA 유전자의 BAC-트랜스제닉(transgenic) 발현에 의해 (Strowig et al, 2011, *Proc Natl Acad Sci USA* 108: 13218-13223) 달성된다. 인간 HSPC 이식 시, 높은 수준의 인간 조혈성 세포 이식은 수령체로서 NOD *Scid* $\gamma_c^{-/-}$ (NOG (Ito et al. 2002, *Blood* 100:3175-3182) 또는 NSG (Ishikawa et al, 2005, *Blood* 106: 1565-

1573)) 또는 hSIRPA^{tg} RAG2^{-/-} γ_c ^{-/-} (SRG (Strowig et al, 2011, Proc Natl Acad Sci USA 108: 13218-13223)) 마우스를 사용할 때 달성된다.

[0005]

인간 다중-계통 조혈성 발달이 이 수령체 계통에서 관찰되지만, 대부분 인간 세포 타입의 말기 분화, 항상성 및 /또는 작용기 기능은 차선의 것이다. 이 상태는 마우스 조직에 의해 분비되는 시토킨과 조혈성 세포에서 발현되는 인간 수용체 사이에서 교차-반응성이 감소되거나 없기 때문인 것으로 가정되어 왔다 (Manz, 2007, *Immunity* 26:537-541; Willinger et al, 2011, *Trends in Immunology* 32:321-327). 이 한계를 피하기 위해, 여러 전략이 마우스 숙주에서 인간 시토킨을 전달하기 위해 개발되었다. 이 방법들은 재조합 시토킨의 주사 (Lapidot et al, 1992, *Science* 255: 1137-1141; van Lent et al, 2009, *J. Immunol* 183:7645-7655), 시토킨-암호화 cDNA의 랜티바이러스 전달 (O'Connell et al, 2010, *PLoS One* 5(8):e12009), 플라스미드 DNA의 유체 역학 주사 (Chen et al, 2009, *Proc Natl Acad Sci USA* 106:21783-21788), cDNA의 트랜스제닉 발현 (Nicolini et al, et al, 2004, *백혈병* 18(2):341-347; Brehm et al, 2012, *Blood* 119:2778-2788; Takagi et al., 2012, *Blood* 119:2768-2777) 또는 시토킨-암호화 유전자의 넥-인(knock-in) 대체 (Rongvaux et al, 2011, *Proc Natl Acad Sci USA* 108:2378-2383; Willinger et al, 2011, *Proc Natl Acad Sci USA* 108:2390-2395; Rathinam et al, 2011, *Blood* 118:3119-3128)을 포함한다. 후자의 방법은 인간 유전자의 더 생리학적인 발현의 이점을 갖는다. 게다가, 인간 시토킨이 마우스 수용체에 완전히 교차-반응하지 않으면, 그것은 마우스 세포 집단의 결함을 유도하고 인간 세포에게 추가의 경쟁적 이점을 부여할 수 있다. 넥-인 유전자 대체 전략을 사용하여, 트롬보포이에틴 (Tpo)을 암호화하는 유전자의 인간화는 기능적 인간 조혈모세포의 더 나은 유지 및 골수에서 증가된 이식을 초래하였고 (Rongvaux et al, 2011, *Proc Natl Acad Sci USA* 108:2378-2383); 인터류킨-3 및 GM-CSF를 암호화하는 유전자 (*Il3* 및 *Csf2*)의 대체는 마우스 폐포 대식세포 (AM)의 손실 및 기능적인 인간 AM의 발달을 유발하였고 (Willinger et al, 2011, *Proc Natl Acad Sci USA* 108:2390-2395); *Csf1* 유전자의 치환은, M-CSF를 암호화하며, 다수의 조직에서 증가된 수의 인간 단핵구를 발생시켰다 (Rathinam et al, 2011, *Blood* 118:31 19-3128).

[0006]

인간 및 마우스 혈액-림프구 시스템은 많은 양태에서 다르다 (Haley, 2003, *Toxicology* 188:49-71; Mestas & Hughes, 2004, *J Immunol* 172:2731-2738). 두 종 간의 큰 차이점 중 하나는 백혈구 세포 (WBC) 분화에 있다. 인간 혈액은 골수 세포가 풍부하며 총 WBC 중 50-75%에 해당한다. 반대로, 마우스 혈액은 림프구가 지배하며 WBC 중 단 20-30%가 골수 계통의 것이다. 이 종 차이는 기능적 및 진화적 중요성이 이해되지 않았으며, NOG/NSG 또는 SRG와 같은 통상적인 HHLS 마우스에서 반복되지 않는다. 정말로, 인간 골수 발달은 특히 이 숙주들에서 결함이 있으며, 골수 세포는 인간 WBC 중 단 5-10%에 해당한다.

[0007]

인간 면역 시스템을 가진 마우스의 하나의 적용은 인간 백신의 개발 및 테스트이다. 역사적으로, 생체 내 면역 반응의 유발은 상대적으로 비효율적이었다 (2004, Traggiai et al, *Science* 304: 104-107; 2002, Ito et al, *Blood* 100:3175-3182; 2005, Ishikawa et al, *Blood* 106: 1565-1573; 2005, Shultz et al, *J Immunol* 174:6477-6489; 2006, Baenziger et al, *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 15951-15956). 여러 연구는 감염에 대하여 성공적인 병원체-특이적 면역 반응을 보고하였다. 약 50%의 마우스가 뎅구 바이러스(dengue virus) 감염 시 바이러스-특이적 IgM 및 IgG를 생산하는 것으로 보고되었지만 (2007, Kuruvilla et al, *Virology* 369: 143-152), 다른 연구들은 HIV 및 EBV 감염 후 항원-특이적 IgM 및 IgG를 생산하는 마우스 중 20% 이하의 빈도를 보고하였다 (2006, Baenziger et al, *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 15951-15956; 2008, Yajima et al, *J Infect Dis* 198:673-682). 보조제 및 항원으로 면역화 시, 항원-특이적 면역글로불린(immunoglobulin)의 종류 변환 (class switching)은 또한 역사적으로 비효율적이며 면역화된 동물의 일부만이 항원 특이적 IgG 반응을 나타낸다 (2004, Traggiai et al, *Science* 304: 104-107; 2002, Ito et al, *Blood* 100:3175-3182; 2005, Ishikawa et al, *Blood* 106: 1565-1573; 2005, Shultz et al, *J Immunol* 174:6477-6489; 2009, Watanabe et al, *Int Immunopharmacol* 21:843-858; 2010, Becker et al, *PLoS ONE* 5). 이 연구들은 NSG 및 BALB/c RAG2^{-/-} γ_c ^{-/-} 마우스 및 다른 보조제/항원 조합을 포함하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008]

업계에는 인간 조혈성 세포의 이식을 지지하고 지속시킬 수 있는 인간화된 비-인간 동물이 필요하다. 본 발명은 업계의 이 충족되지 않은 요구를 해결한다.

과제의 해결 수단

[0009]

본 발명은 일반적으로 인간 M-CSF, 인간 IL-3, 인간 GM-CSF, 인간 SIRPA 또는 인간 TPO 중 적어도 하나를 발현하는 유전적으로 변형된 비-인간 동물, 뿐만 아니라 그것들의 사용 방법에 관한 것이다. 따라서, 한 구체예에서, 본 발명은 인간 M-CSF, 인간 IL-3, 인간 GM-CSF, 인간 SIRPA 및 인간 TPO로 구성된 군 중 적어도 하나를 암호화하는 적어도 하나의 핵산을 포함하는 게놈을 포함하는 유전적으로 변형된 비-인간 동물이며, 적어도 하나의 핵산은 프로모터에 작동 가능하게 결합되고, 동물은 인간 M-CSF, 인간 IL-3, 인간 GM-CSF, 인간 SIRPA 및 인간 TPO로 구성된 군으로부터 선택된 적어도 하나의 폴리펩티드를 발현한다. 또 다른 구체예에서, 본 발명은 유전적으로 변형된 비-인간 동물이며, 인간 M-CSF를 암호화하는 핵산, 인간 IL-3를 암호화하는 핵산, 인간 GM-CSF를 암호화하는 핵산, 인간 SIRPA를 암호화하는 핵산 및 인간 TPO를 암호화하는 핵산을 포함하는 게놈을 포함하며, 인간 M-CSF, 인간 IL-3, 인간 GM-CSF, 인간 SIRPA 및 인간 TPO를 암호화하는 핵산 각각은 프로모터에 작동 가능하게 결합되고, 동물은 인간 M-CSF 폴리펩티드, 인간 IL-3 폴리펩티드, 인간 GM-CSF 폴리펩티드, 인간 SIRPA 폴리펩티드 및 인간 TPO 폴리펩티드를 발현한다. 일부 구체예에서, 유전적으로 변형된 비-인간 동물은 면역 결핍이다. 일부 구체예에서, 유전적으로 변형된 비-인간 동물은 재조합 활성화 유전자 2를 발현하지 않는다 (Rag-2/-). 일부 구체예에서, 유전적으로 변형된 비-인간 동물은 IL2 수용체 감마 사슬을 발현하지 않는다 (감마 사슬-/-). 일부 구체예에서, 유전적으로 변형된 비-인간 동물은 Rag-2를 발현하지 않고 유전적으로 변형된 비-인간 동물은 IL2 수용체 감마 사슬을 발현하지 않는다 (Rag-2/- 감마 사슬-/-). 일부 구체예에서, 유전적으로 변형된 비-인간 동물은 설치류이다. 일부 구체예에서, 유전적으로 변형된 비-인간 동물은 마우스이다. 한 구체예에서, 유전적으로 변형된 비-인간 동물은 또한 적어도 하나의 인간 조혈성 세포를 포함한다. 한 구체예에서, 유전적으로 변형된 비-인간 동물은 또한 적어도 하나의 인간 암 세포를 포함한다. 일부 구체예에서, 인간 암 세포는 백혈병 (leukemia) 세포 또는 흑색종 (melanoma) 세포이다.

[0010]

또 다른 구체예에서, 본 발명은 유전적으로 변형된 비-인간 동물에서 조혈모세포 및 전구세포 (HSPC) 이식 방법인데, 동물은 인간 M-CSF, 인간 IL-3, 인간 GM-CSF, 인간 SIRPA 및 인간 TPO로 구성된 군 중 적어도 하나를 발현하며, 방법은 인간 M-CSF, 인간 IL-3, 인간 GM-CSF, 인간 SIRPA 및 인간 TPO로 구성된 군 중 적어도 하나를 발현하는 유전적으로 변형된 동물에게 적어도 하나의 HSPC를 투여하는 단계를 포함한다. 일부 구체예에서, HSPC는 인간 HSPC이다. 한 구체예에서, 유전적으로 변형된 비-인간 동물은 설치류다. 한 구체예에서, 유전적으로 변형된 비-인간 동물은 마우스다. 한 구체예에서, 유전적으로 변형된 비-인간 동물은 면역 결핍이다. 한 구체예에서, 유전적으로 변형된 면역 결핍 비-인간 동물은 재조합 활성화 유전자 2를 발현하지 않는다 (Rag-2/-). 한 구체예에서, 유전적으로 변형된 면역 결핍 비-인간 동물은 내인성 IL2 수용체를 발현하지 않는다 (감마 사슬-/-). 한 구체예에서, 유전적으로 변형된 면역 결핍 비-인간 동물은 내인성 Rag-2를 발현하지 않고 내인성 감마 사슬을 발현하지 않는다 (Rag-2/- 감마 사슬-/-). 한 구체예에서, 유전적으로 변형된 동물은 인간 암 세포를 포함한다. 한 구체예에서, 인간 암 세포는 백혈병 세포 또는 흑색종 세포이다.

[0011]

또 다른 구체예에서, 본 발명은 유전적으로 변형된 Rag-2/-, 감마 사슬-/- 마우스로서 인간 M-CSF, 인간 IL-3, 인간 GM-CSF, 인간 SIRPA 및 인간 TPO로 구성된 군 중 적어도 하나를 암호화하는 적어도 하나의 핵산을 포함하는 게놈을 가지며, 적어도 하나의 핵산은 적어도 하나의 프로모터에 작동 가능하게 결합되고, 마우스는 인간 M-CSF, 인간 IL-3, 인간 GM-CSF, 인간 SIRPA 및 인간 TPO로 구성된 군으로부터 선택된 적어도 하나의 폴리펩티드를 발현한다. 한 구체예에서, 유전적으로 변형된 비-인간 동물은 인간 M-CSF를 암호화하는 핵산, 인간 IL-3를 암호화하는 핵산, 인간 GM-CSF를 암호화하는 핵산, 인간 SIRPA를 암호화하는 핵산 및 인간 TPO를 암호화하는 핵산을 가진 게놈을 포함하는데, 인간 M-CSF, 인간 IL-3, 인간 GM-CSF, 인간 SIRPA 및 인간 TPO를 암호화하는 각각의 핵산은 프로모터에 작동 가능하게 결합되고, 동물은 인간 M-CSF 폴리펩티드, 인간 IL-3 폴리펩티드, 인간 GM-CSF 폴리펩티드, 인간 SIRPA 폴리펩티드 및 인간 TPO 폴리펩티드를 발현한다. 한 구체예에서, 유전적으로 변형된 비-인간 동물은 설치류다. 한 구체예에서, 유전적으로 변형된 비-인간 동물은 마우스다. 한 구체예에서, 유전적으로 변형된 비-인간 동물은 인간 조혈성 세포를 포함한다. 한 구체예에서, 유전적으로 변형된 비-인간 동물은 인간 암 세포를 포함한다. 일부 구체예에서, 인간 암 세포는 백혈병 세포 또는 흑색종 세포이다.

도면의 간단한 설명

[0012]

본 발명의 바람직한 구체예의 하기 상세한 설명은 첨부된 도면과 함께 읽을 때 더 잘 이해될 것이다. 본 발명을 설명할 목적을 위해서, 현재 바람직한 구체예는 도면에 나타난다. 하지만, 본 발명이 도면에 나타난 구체예의 정확한 배열 및 수단에 제한되지 않는 것으로 이해되어야 한다.

도 1은, 도 1A-1B를 포함하며, MISTRG 마우스가 높은 수준의 인간 조혈모세포 이식을 지지한다는 것을 나타내는 실험의 결과를 도시한다. 지시된 계통의 X-선에 미리 길들여진 새로 태어난 마우스는 100,000 인간 태아 간-(FL-)CD34⁺ 세포의 간장 내 주사에 의해 이식되었다. 인간 이식 수준 (hCD45 세포)은 7-9주 후 혈액에서, 및 10-12주 후 BM에서 측정되었다. (도 1A) 지시된 수령체 마우스의 혈액 및 BM에서 마우스 및 인간 CD45⁺ 세포 빈도의 대표적인 유동 세포 분석. 게이팅된(gated) 영역 옆의 숫자는 총 CD45 세포 사이의 퍼센트를 나타낸다. (도 1B) 19번의 독립적인 실험의 혈액 이식 수준 (% hCD45⁺ 세포)의 조합된 데이터. 각 실험에서, 단일 FL-CD34⁺ 세포 샘플은 분열되었고 각각의 계통의 마우스로 주사되었다. 각 부호는 개개의 마우스를 나타내고 빨간 막대는 평균 값을 나타낸다 (n=56-155; ns, 유의하지 않음; * p<0.05 터키 테스트(Tukey test) (완전한 통계적 분석을 위해 도 6 참조). 회색 가로줄은 10% hCD45⁺ 세포를 나타낸다. (도 1C) 패널 (도 6B)로부터 마우스 (도 6C)의 대표적인 서브세트(subset)의 BM에서 이식 수준 (n=12-16; * p<0.05 터키 테스트; 또한 도 6D-6E 참조). (도 1D) 200,000개의 FL-CD34⁺ 세포의 비-조사된 새로 태어난 MISTRG 마우스로의 간장 내 주사 후 3개월에 혈액 및 BM에서 hCD45⁺ 세포 이식의 대표적인 유동 세포 분석. (도 1E) (도 1D)에서와 같이 이식된 MISTRG 마우스의 혈액 및 BM에서 인간 CD45⁺ 세포 이식 수준 (n=16). 이 경우에, 모든 마우스(혈액 hCD45⁺ < 10%를 가진 마우스 포함)의 BM이 나타난다.

도 2는, 도 2A-2K를 포함하며, MISTRG 마우스가 림프 조직 및 비-림프 조직에서 효과적인 골수 발달 및 유지를 지지한다는 것을 나타내는 실험의 결과를 예측한다. (도 2A) 신생아로서 X-선에 미리 길들여진 후 FL-CD34 세포의 간장 내 주사에 의해 이식된 지시된 수령체 마우스의 혈액에서 인간 조혈성 세포 (hCD45⁺) 중에서 인간 골수 세포 (hCD33⁺) 퍼센트. 각 부호는 개개의 마우스를 나타내고 빨간 막대는 평균 값을 나타낸다 (n=20-113; 통계적 분석은 도 7A에 나타난다). (도 2B) 같은 마우스에서 인간 WBC 조성을 (n=20-113 마우스/군; n=8 인간 기증자; 오차 막대는 SEM을 나타낸다). (도 2C) 지시된 수령체 마우스의 비-림프 조직에서 인간 골수 세포 (hCD68⁺)의 면역조직학적 염색. 검은 막대는 20 μ m를 나타내고, 나타난 이미지는 군 당 적어도 세 마리의 분석된 마우스를 대표한다. (도 2D 및 도 2E) 인간 단핵구 서브세트의 대표적인 유동 세포 분석 (도 2D) 및 빈도 (도 2E)로서, 수령체 마우스 혈액의 hCD45⁺CD33⁺ 세포 중에서 CD14 및 CD16의 발현에 의해 확인된다 (n=8-12 마우스/군; 오차 막대는 SEM을 나타낸다). (도 2F 및 도 2G) MITRG 수령체의 BM으로부터 분리되고 시험관 내에서 LPS (도 2F) 또는 R848 (도 2G)로 자극된 인간 단핵구에 의한 시토킨 생산 (오차 막대는 3배수의 SD; 3번의 독립적인 실험의 대표를 나타낸다). (도 2H) MITRG 마우스 혈액에 존재하는 인간 세포에 의한 GFP-발현 대장균 (E.coli)의 시험관 내 식균작용(phagocytosis) (n=7). (도 2I, 2J, 2K) LPS 처리된 (도 2I; 90분, n=15-18), 리스테리아 모노사이토제네스(Listeria monocytogenes) (도 2J; 제2 일, n=6-15) 또는 인플루엔자 A/PR8 H1N1 (도 2K; 제3 일, n=3-5)으로 감염된 마우스의 혈청에서 ELISA에 의해 또는 폐에서 RT-PCR에 의해 측정된 생체 내 시토킨 생산. (도 2A, 2J, 2K) 일원(one way) ANOVA에 이어 터키 사후(posthoc) 테스트에 의해 계산된 p-값 (* p<0.05); (도 2I) 로그10-전환된 값에서 언페어드 스튜던트 t-테스트(unpaired Student's t-test)에 의해 계산된 p-값.

도 3은, 도 3A-3J를 포함하며, MISTRG 마우스가 인간 NK 세포의 발달 및 기능을 효과적으로 지지한다는 것을 나타내는 실험의 결과를 도시한다. (도 3A) 이식된 NSG, MITRG, 및 MISTRG 마우스의 간에서 인간 IL-15 및 IL-15R α mRNA 발현의 정량적 RT-PCR 분석 (n=7-8; 일원 ANOVA에 의해 계산된 p-값; *, p<0.05 터키 사후 테스트). 발현은 마우스 Hprt로 표준화되었다. (도 3B) 이식된 MITRG의 골수로부터 정제된 인간 세포군에서 인간 IL-15 및 IL-15R α mRNA 발현의 정량적 RT-PCR 분석 (n=4-5, 오차 막대는 SEM을 나타낸다). 발현은 인간 HPRT로 표준화되었고 hCD14⁺hCD16⁻ 세포와 비교하여 나타난다. (도 3C 및 도 3D) 이식된 NSG, MITRG, 및 MISTRG에서 인간 NK 세포 (hNKp46⁺hCD3⁻)의 대표적인 유동 세포 분석 (hCD45⁺hCD45⁻ 세포에서 게이팅됨(gated), 림프구 게이트; 명시된 영역 옆의 숫자는 세포의 퍼센트를 나타낸다) (도 3C) 및 무명수또는 빈도 (도 3D) (n=8-16; 일원 ANOVA에 의해 계산된 p-값; *, p<0.05 터키 사후 테스트). (도 3E) 식세포를 고갈시키기 위해 연속 3일 동안 리포솜-캡슐화된 클로드로네이트가 처리되지 않거나 처리된 채로 둔 이식된 MISTRG 마우스의 인간 간 NK (hNKp46⁺hCD3⁻) 및 T 세포 (hCD3+, 대조군으로 나타남)의 무명수 (n=8; 언페어드 스튜던트 t-테스트에 의해 계산된 p-값; ns, 유의하지 않음). (도 3F) 표지된 LCL721.221 (HLA 등급 I 음성) 및 LCL721.45 (등급 I 양성)

세포가 1:1 비율로 정맥 내 주사되었고, 비장에서 12시간 후에 회수된 표지된 세포 중에서, HLA 등급 I 양성 또는 음성의 비율은 특이적 NK 세포 독성을 계산하기 위해 사용되었다 (n=8, 언페어드 스튜던트 t-테스트에 의해 계산된 p-값). (도 3G) 리스테리아 감염 후 2일에 NSG 및 MISTRG 마우스의 간에서 인간 IFN γ mRNA 발현의 정량적 RT-PCR 분석 (n=8-9, 언페어드 스튜던트 t-테스트에 의해 계산된 p-값). 발현은 마우스 *Hprt*로 표준화되었다. (도 3H 및 도 3I) 감염되지 않은 또는 리스테리아-감염된 NSG 및 MISTRG 마우스의 IFN γ -발현 및 탈과립 (CD107a $^+$) 인간 간 NK 세포의 대표적인 유동 세포 분석 (도 3H) 및 빈도 (도 3I) (n=4-11; 일원 ANOVA에 의해 계산된 p-값). 결과는 두 번 (도 3A, 3E-3I), 세 번 (도 3B), 또는 네 번 (도 3C, 3D)의 실험으로부터 조합된다.

도 4는, 도 4A-4F를 포함하며, MISTRG의 인간 골수 세포가 종양에 침투하여 그것의 성장을 지지한다는 것을 나타내는 실험의 결과를 도시한다. 인간 흑색종 세포주 Me290은 이식된 비-이식된 NSG 및 MISTRG 마우스의 측면에서 이식되었다. 일부 마우스에 VEGF-억제자 AvastinTM이 처리되었다. 종양은 11일 후 분석을 위해 측정되었고 절개되었다. (도 4A) 종양에서 인간 조혈성 세포의 침투, 인간 조혈성 마커 (PTPRC, CD45를 암호화함) 및 골수 마커 (ITGAM, CD11b를 암호화함)를 암호화하는 mRNA의 발현에 의해 결정됨 (n=6-7; 언페어드 스튜던트 t-테스트에 의해 계산된 p-값). (도 4B 및 도 4D) NSG, MISTRG 및 환자의 종양에서 인간 골수 세포 마커의 대표적인 면역조직화학법 사진. (도 4C) CD163 $^+$ 세포의 밀도의 정량 (n=3 샘플/군, 계수된 3개의 슬라이드/샘플). (도 4E 및 도 4F) 마우스의 지시된 군에서 종양의 대표적 사진 (도 4E) 및 부피 (도 4F) (n=7-24 마우스/군), p-값은 스튜던트 t-테스트 (도 4A) 또는 일원 ANOVA (도 4C, 4E)에 이어서 터키 사후 테스트 (* p<0.05)에 의해 계산되었다.

도 5는 HSC 기능 및 골수 발달에 수반된 시토킨을 도시한다. 골수 세포로의 조혈모세포 발달의 개략도 및 이 공정을 조절하는 것으로 알려져 있는 시토킨의 비-소모적 목록. 명암은 인간과 마우스 시토킨 사이의 아미노산 동일성의 퍼센트를 나타낸다. 아미노산 동일성의 퍼센트는 종 간 단백질 보존의 가장 객관적인 측정값이지만, 생체 내 기능적 종 간 교차-반응성과 항상 관련된 것은 아니다. 검은 직사각형은 MISTRG, HSC, 조혈모세포에서 유전적으로 인간화된 시토킨; MPP, 다분화능 전구세포; CMP, 공통 골수 전구세포; GMP, 과립구/대식세포 전구세포; MEP, 거핵구/적혈구 전구세포를 나타낸다.

도 6은, 도 6A-6E를 포함하며, 수령체 마우스에서 이식 수준의 통계적 분석의 결과를 도시한다. (도 6A) 도 1A에서 제공된 데이터 (수령체 마우스의 혈액에서 hCD45 $^+$ 세포의 퍼센트)의 통계적 분석 (일원 ANOVA에 이어서 터키 사후 테스트; ns, 유의하지 않음). (도 6B) 이식 후 7-9주에 혈액에서 적어도 10%의 hCD45 $^+$ 세포의 이식 수준에 도달하는 수령체 마우스의 수. (도 6C) BM의 분석을 위해 도 1C에서 사용된 마우스의 혈액 이식 수준. (도 6D) 도 6A와 유사한, 도 1C에서 제공된 데이터 (수령체 마우스의 BM에서 hCD45 $^+$ 세포의 퍼센트)의 통계적 분석. (도 6E) 도 1C에서 나타난 수령체 마우스의 BM (2개의 대퇴골 및 2개의 경골)에서 hCD45 $^+$ 세포의 무명수. MISTRG의 BM에서 세포의 감소된 수는 상기 시기 (이식 10-12주)에 마우스의 더 작은 크기로 인한 것이며 도 10에서 상세히 설명된 빈혈증(anemia)의 최초 임상적 징후에 의해 유발된다.

도 7은, 도 7A-7H를 포함하며, MISTRG 마우스에서 향상된 인간 골수 발달을 평가하는 실험의 결과를 도시한다. (도 7A) 도 2A에서 제공된 데이터 (수령체 마우스의 혈액에서 hCD33 $^+$ 세포의 퍼센트)의 통계적 분석 (일원 ANOVA에 이어서 터키 사후 테스트; ns, 유의하지 않음). (도 7B 및 도 7C) 수령체 마우스의 BM에서 인간 골수 세포 (hCD33 $^+$)의 빈도 (도 7B) 및 통계적 분석 (도 7C). (도 7D) MISTRG의 혈액에서 인간 림프 및 골수 계통의 대표적인 유동 세포 분석. (도 7E 및 도 7F) MISTRG 및 인간 기증자의 BM (도 7E) 및 혈액 (도 7F)의 인간 단핵구 (CD33^{hi}SSC^{lo}CD66 $^-$) 및 과립구 (CD33 $^+$ SSC^{hi}CD66 $^+$)의 대표적인 유동 세포 분석. (도 7G 및 도 7H) 수령체 마우스의 폐 (도 7G) 및 간 (도 7H)에서 인간 골수 세포 (hCD33 $^+$)의 무명수 (n=8-12; 일원 ANOVA에 이어서 터키 사후 테스트에 의해 계산된 p-값, * p<0.05).

도 8은, 도 8A 및 8B를 포함하며, MISTRG 마우스에서 인간 단핵구 서브세트의 향상된 발달을 나타내는 실험의 결과를 도시한다. (도 8A) 인간 단핵구 서브세트의 대표적인 유동 세포 분석, 지시된 수령체 마우스의 BM, 비장, 폐 및 간에서 hCD45 $^+$ CD33 $^+$ 세포 중에서 CD14 및 CD16의 발현에 의해 확인됨. (도 8B) hCD33 $^+$ 세포 중에서의 빈도 (오차 막대는 SEM을 나타낸다) 및 수령체 마우스의 폐 및 간에서 단핵구 서브세트의 무명수 (n=12 마우

스/군; 일원 ANOVA에 의해 계산된 p -값; *, $p<0.05$ 터키 사후 테스트).

도 9는, 도 9A 및 9B를 포함하며, 인간 단핵구 서브세트가 MISTRG 및 인간 기증자에서 유사하다는 것을 나타내는 실험의 결과를 도시한다. MISTRG 수령체 및 인간 기증자의 혈액 (도 9A) 및 BM (도 9B)에서 인간 단핵구의 지시된 서브세트의 연장된 면역표현형. 이소타입 대조군 항체 및 특이적 항체로의 염색이 나타난다.

도 10은, 도 10A-10B를 포함하며, 인간 골수 세포가 인간-대-마우스 식세포 내성을 돌파한다는 것을 나타내는 실험의 결과를 도시한다. (도 10A) CFSE-표지된 마우스 RBC는 지시된 마우스로 옮겨지고 표지된 세포의 빈도는 지시된 시점에 측정되었다. (도 10B) 이식된 MISTRG에 식세포를 고갈시키기 위해 클로드로네이트가 사전 처리되거나 처리되지 않았고 CFSE-표지된 마우스 RBC는 도 10A에서와 같이 옮겨졌고 관찰되었다 (p -값, 1-3일 동안 ANOVA의 반복된 측정에 의해 측정된 클로드로네이트-효과). 이 결과들은 옮겨진 마우스 RBC가 MISTRG에 존재하지만 NSG에는 아닌 식세포에 의해 생체 내에서 신속하게 제거된다는 것을 나타낸다. (도 10C) RBC는 비-이식된 마우스 ($n=9-15$) 또는 인간 FL-CD34⁺ 세포의 이식 후 8-10주 ($n=11-37$)의 혈액에서 계수하였다. p -값은 각 유전자형의 비-이식된 및 이식된 마우스 사이의 비교를 나타낸다 (스튜던트 언페어드 t 테스트). (도 10D) 인간 이식 수준 (혈액에서 hCD45⁺ 세포의 퍼센트)과 RBC 수 사이의 연관성 ($n=13-22$). (도 10E) 비-이식된 또는 이식된 MISTRG의 혈액에서 마우스 ($mTer119^{+}$) 및 인간 ($hCD235a^{+}$) 적혈구 세포의 유동 세포 분석, 이식된 MISTRG의 혈액에서 거의 모든 적혈구 세포가 마우스 기원의 것이고, 인간 적혈구 세포는 거의 검출되지 않는다는 것을 나타낸다. (도 10F) 지시된 계통의 이식된 마우스 ($n=3-22$)의 대표적인 사진 및 비장 중량, 이식된 MISTRG 마우스에서 비장 비대증(splenomegaly)을 나타낸다. Balb/c 마우스의 비장은 대조군으로 사용되었다 (p -값, 일원 ANOVA; *, 모든 다른 군과 비교하여 $p<0.05$, 터키 사후 테스트). (도 10G) H&E로 염색된 이식된 NSG 및 MISTRG의 비장의 조직학적 질편, 비장 비대증에 걸린 MISTRG에서 적색 수질(red pulp)의 확대를 예시한다. (도 10H) 마우스 적혈구 전구세포 ($mTer119^{+}mCD71^{+}$)의 유동 세포 분석, 이것은 이식된 MISTRG의 비장에서 세포 중 최대 80%를 나타낸다. (도 10I) 비-이식된 및 이식된 MISTRG의 혈액 도말은 망상적혈구의 풍부함을 예시한다. 종합해보면, 이 결과들은 MISTRG에서 빈혈증이 인간-대-마우스 식세포 내성의 부재로부터 일어나고, 대량의 수질 외 마우스 적혈구 생성(erythropoiesis)이 mRBC의 파괴를 보상하는데 실패한다는 것을 강력하게 제안한다. 결과는 각 군 (도 10C, 10E-10I) 및 2번의 독립적인 실험 (도 10A, 10B)에서 검사된 적어도 5마리의 마우스를 대표한다.

도 11은, 도 11A 및 11B를 포함하며, MISTRG 마우스가 인간 IL-15/IL-15R α 를 제공한다는 것을 나타내는 실험의 결과를 도시한다. (도 11A) 이식된 NSG, MITRG, 및 MISTRG 마우스의 폐에서 인간 IL-15 및 IL-15R α mRNA 발현의 정량적 RT-PCR 분석 ($n=7-8$; 일원 ANOVA에 의해 계산된 p -값; *, $p<0.05$ 터키 사후 테스트). 발현은 마우스 *Hprt*로 표준화되었다. (도 11B) 이식된 MISTRG 마우스의 혈액의 인간 세포군 ($hCD45^{+}mCD45^{-}$)에서 IL-15R α 발현의 유동 세포 분석 ($n=4$ 를 대표함). 막대 그래프는 각각 이소타입 대조군 또는 IL-15R α 항체로의 염색을 나타낸다. 결과는 두 번의 실험을 대표하거나 이것들로 조합된다.

도 12는, 도 12A 및 12B를 포함하며, MISTRG 마우스에서 향상된 인간 nk 세포 발달을 나타내는 실험의 결과를 도시한다. (도 12A 및 도 12B) 이식된 NSG, MITRG, 및 MISTRG 마우스에서 인간 NK 세포 ($hNKp46^{+}hCD3^{-}$)의 빈도 (도 12A) 및 무명수 (도 12B) ($n=8-16$; 일원 ANOVA에 의해 계산된 p -값; *, $p<0.05$ 터키 사후 테스트). 결과는 네 번의 실험으로부터 조합된다.

도 13은, 도 13A-13F를 포함하며, 향상된 성숙화를 나타내는 진짜의(bona fide) 인간 NK 세포가 MISTRG 마우스에 존재한다는 것을 나타내는 실험의 결과를 도시한다. (도 13A) 인간 기증자 및 이식된 MISTRG의 인간 혈액 NK 세포에서 CD94 및 CD161 발현의 유동 세포 분석 ($n=3$). 막대 그래프는 이소타입 대조군 Ab 또는 CD94/CD161 Ab로의 염색을 나타낸다. (도 13B) 인간 기증자 또는 이식된 MISTRG 마우스의 인간 혈액 NK 세포에서 KIR 발현의 유동 세포 분석 ($n=3$). 숫자는 KIR $^{+}$ 세포의 빈도를 나타낸다. (도 13C 및 도 13D) 이식된 NSG, MITRG, 및 MISTRG 마우스의 인간 NK 세포에서 CD16 표면 발현 ($n=4-8$; 일원 ANOVA에 의해 계산된 p -값; *, $p<0.05$ 터키 사후 테스트). (도 13E 및 도 13F) 이식된 NSG 및 MISTRG 마우스의 인간 간 NK ($hNKp46^{+}hCD3^{-}$) 및 T 세포 ($hCD3^{+}$)에 의한 세포 내 페포린 발현 ($n=3$; 언페어드 스튜던트 t -테스트에 의해 계산된 p -값). MFI, 평균 형광 강도. 결과는 한 번 (도 13A 및 도 13B), 두 번 (도 13E 및 도 13F), 또는 네 번 (도 13C 및 도 13D) 실험을 대표하거나 이것들로 조합된다.

도 14는 MISTRG 마우스에서 인간 NK 세포 향상성에서 인간 단핵구/대식세포 고갈의 효과를 나타내는 실험의 결

과를 도시한다. 이식된 MISTRG 마우스는 식세포를 고갈시키기 위해 리포솜-캡슐화된 클로드로네이트를 연속 3일 동안 처리되지 않거나 처리된 채로 두었다. 간에서 인간 단핵구/대식세포 (상부 패널, hCD33+ 세포에서 게이팅 됨) 및 NK 세포 (hNKp46⁺hCD3⁻)의 유동 세포 분석 (n=8)이 나타난다. 결과는 두 번의 실험을 대표한다. 8마리의 마우스 중에 1마리에서, 단핵구/대식세포의 클로드로네이트-고갈은 효과적이지 않았고, NK 세포 수의 감소가 상기 마우스에서 관찰되지 않았다.

도 15는 인간 골수 세포 침투 흑색종의 면역 조직 화학법을 나타내는 실험의 결과를 도시한다. NSG, MISTRG 또는 인간 환자의 종양에서 인간 골수 세포의 대표적인 면역 조직 화학 염색. 군 당 세 개의 대상체, 및 대상체 당 3장의 사진이 나타난다.

도 16은 NSG, MISTRG 및 인간에서, 단일 유전자 대체된 수령체 마우스에서의 이식 수준과 면역 세포 발달 및 기능의 비교를 나타낸다.

도 17은, 도 17A-17D를 포함하며, AML, CMML 및 MDS에 걸린 환자로부터 분리된 샘플이 MISTRG에서 이식될 수 있다는 것을 입증하는 실험의 결과를 도시한다. (도 17A) 사용된 샘플 (환자 샘플에서 발견된 질환 및 유전적 비정상의 타입 등), 실험 프로토콜 (세포 정제 방법, 마우스 당 주사된 세포의 수 및 마우스가 분석되는 이식 후 시간) 및 이식 결과 (검출 가능한 인간 이식된 마우스의 수, 인간 조혈성 CD45+ 세포 및 골수 CD33+ 세포의 퍼센트, 및 마우스로부터 분리된 인간 세포에서 관찰된 계놈 비정상 등)의 특성. (도 17B) RAEB I 환자 또는 정상 기증자 세포가 이식된 마우스로부터 분리된 골수 CD33+ 세포의 입도(granularity) (SSC)의 대표적인 유동 세포 분석, RAEB I 샘플에서 부족한 입도를 나타낸다. (도 17C) RAEB II 샘플이 이식된 마우스로부터 분리된 인간 세포의 대표적인 피쉬(fish) 분석으로서 및 염색체 5q의 부재를 나타낸다. (도 17D) CMML 샘플이 이식된 마우스로부터 분리된 인간 세포의 핵형으로서 염색체 6의 고갈을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0013]

본 발명은 일반적으로 인간 M-CSF, 인간 IL-3, 인간 GM-CSF, 인간 SIRPA 또는 인간 TPO 중 적어도 하나를 발현하는 유전적으로 변형된 비-인간 동물에 관한 것이다. 본 발명은 또한 본원에서 설명된 유전적으로 변형된 비-인간 동물을 발생시키는 방법 및 이것을 사용하는 방법에 관한 것이다. 일부 구체예에서, 유전적으로 변형된 비-인간 동물은 마우스다. 일부 구체예에서, 본원에서 설명된 유전적으로 변형된 비-인간 동물은 인간 조혈성 세포가 이식된다. 다양한 구체예에서, 인간 조혈성 세포 이식된, 본 발명의 유전적으로 변형된 비-인간 동물은 조혈성 및 면역 세포의 성장 및 분화의 생체 내 평가, 인간 혈액 생성의 생체 내 평가, 암 세포의 생체 내 평가, 면역 반응의 생체 내 평가, 백신 및 백신 접종 요법의 생체 내 평가, 암 세포 성장 또는 생존을 조절하는 약제의 효과의 테스트에 사용, 암 치료의 생체 내 평가, 인간 항체를 포함하는 면역 매개자의 생체 내 생산 및 수거, 및 조혈성 및 면역 세포 기능을 조절하는 약제의 효과의 테스트에 사용에 유용하다.

[0014]

정의

[0015]

달리 정의되지 않으면, 본원에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어는 본 발명이 속한 업계의 당업자들에 의해 보통 이해되는 바와 같은 의미를 갖는다. 이러한 용어는 예를 들어, J. Sambrook and D. W. Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press; 3rd Ed., 2001; F. M. Ausubel, Ed., Short Protocols in Molecular Biology, Current Protocols; 5th Ed., 2002; B. Alberts et al, Molecular Biology of the Cell, 4th Ed., Garland, 2002; D. L. Nelson and M. M. Cox, Lehninger Principles of Biochemistry, 4th Ed., W.H. Freeman & Company, 2004; 및 Herdewijn, P. (Ed.), Oligonucleotide Synthesis: Methods and Applications, Methods in Molecular Biology, Humana Press, 2004를 포함하는 다양한 표준 참고문헌의 맥락에서 정의되고 사용되는 것으로 발견된다. 본원에서 설명된 것들과 유사하거나 동등한 어떤 방법 및 재료도 본 발명의 실행 또는 테스트에 사용될 수 있지만, 바람직한 방법 및 재료가 설명된다.

[0016]

본원에서 사용된 바와 같이, 다음 용어 각각은 이 섹션에서 그건과 관련된 의미를 갖는다.

[0017]

관사 "하나(a)" 및 "하나(an)"는 문서의 하나 또는 하나 이상 (즉, 적어도 하나)의 문법적 목적어를 나타내기 위해 본원에서 사용된다. 예를 들어, "요소"는 하나의 요소 또는 하나 이상의 요소를 의미한다.

[0018]

본원에서 사용된 "약"은, 양, 기간 등과 같이 측정 가능한 값을 나타낼 때, 명시된 값의 $\pm 20\%$ 또는 $\pm 10\%$, 더 바람직하게 $\pm 5\%$, 더 바람직하게 $\pm 1\%$, 및 더 바람직하게 $\pm 0.1\%$ 의 차이를 포함하는 것을 의미하는데, 이러한 차이가 개시된 방법을 실행하는데 적절하기 때문이다.

- [0019] 용어 "비정상"은 유기체, 조직, 세포 또는 이것들의 구성요소의 맥락에서 사용될 때 각각의 "정상" (예상되는) 특성을 나타내는 상기 유기체, 조직, 세포 또는 구성요소의 적어도 하나의 관찰 가능한 또는 검출 가능한 특성 (예를 들어, 나이, 치료, 시간, 등)이 다른 상기 유기체, 조직, 세포 또는 이것들의 구성요소를 나타낸다. 하나의 세포 또는 조직 타입에 대하여 정상이거나 예상되는 특성은 다른 세포 또는 조직 타입에 대하여 비정상일 수도 있다.
- [0020] 용어 "항체"는, 본원에서 사용된 바와 같이, 항원에서 특이적인 에피토프에 특이적으로 결합할 수 있는 면역글로불린 분자를 나타낸다. 항체는 천연 공급원 또는 재조합 공급원으로부터 유래된 온전한 면역글로불린일 수 있고 온전한 면역글로불린의 면역반응성 부분일 수 있다. 본 발명의 항체는 예를 들어, 다클론성 항체, 단클론성 항체, 세포 내 항체 ("인트라바디(intrabody")", Fv, Fab 및 F(ab)2, 뿐만 아니라 단일 사슬 항체 (scFv), 카멜리드(camelid) 항체, 및 인간화된 항체와 같은 중쇄 항체를 포함하는 다양한 형태로 존재할 수도 있다 (Harlow et al, 1999, *Using Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY; Harlow et al., 1989, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, New York; Houston et al, 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883; Bird et al, 1988, *Science* 242:423-426)
- [0021] 용어 "암"은 본원에서 사용된 바와 같이 이상 세포의 제어되지 않은 증식 및/또는 성장을 특징으로 하는 질환으로 한정된다. 암 세포는 국소적으로 또는 혈류 및 림프계를 통해 신체의 다른 부위로 퍼질 수 있다. 암은 본원에서 설명된 바와 같이 고체 종양 및 조혈성 악성 종양 둘 다를 포함한다. 본 발명에 따르는 다양한 암의 예는 유방암, 전립선암, 난소암, 자궁경부암, 피부암, 췌장암, 결장암, 신장암, 간암, 골암, 뇌종양, 림프종 (lymphoma), 백혈병, 폐암, 골수 이형성 증후군(myeloidysplastic syndrome), 척수 증식성 (myeloproliferative) 장애 등을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.
- [0022] "구성적" 발현은 유전자 생성물이 세포의 대부분 또는 모든 생리학적 조건 하에서 살아있는 세포에서 생산되는 상태이다.
- [0023] 유전자의 "암호화 영역"은 유전자의 암호화 가닥의 뉴클레오티드 잔기 및 각각 유전자의 전사에 의해 생산되는 mRNA 분자의 암호화 영역과 상동성이거나 이에 상보성인 유전자의 비-암호화 가닥의 뉴클레오티드로 구성된다.
- [0024] mRNA 분자의 "암호화 영역"은 또한 mRNA 분자의 번역 중에 전이 RNA 분자의 안티-코돈(anti-codon) 영역과 일치하는 또는 종결 코돈을 암호화하는 mRNA 분자의 뉴클레오티드 잔기로 구성된다. 따라서 암호화 영역은 mRNA 분자에 의해 암호화된 성숙한 단백질에 존재하지 않는 아미노산 잔기 (예를 들어, 단백질 배출 신호 서열의 아미노산 잔기)에 대한 코돈을 포함하는 뉴클레오티드 잔기를 포함할 수도 있다.
- [0025] "질환"은 동물이 항상성을 유지할 수 없고, 질환이 개선되지 않으면 동물의 건강이 계속해서 악화되는 동물의 건강 상태이다.
- [0026] 그에 반해, 동물의 "장애"는 동물이 항상성을 유지할 수는 있지만, 동물의 건강 상태가 장애의 부재 시보다 덜 바람직한 건강상태이다. 치료되지 않은 채로 두면, 장애가 반드시 동물의 건강 상태의 큰 감소를 유발하지는 않는다.
- [0027] 질환 또는 장애는 질환 또는 장애의 증상의 심각도, 이러한 증상을 환자가 겪게 되는 빈도, 또는 둘 다가 감소되면 "완화된다".
- [0028] 화합물의 "유효량" 또는 "치료적 유효량"은 화합물이 투여되는 대상체에게 유익한 효과를 제공하는데 충분한 화합물의 양이다. 전달 비히클의 "유효량"은 화합물에 효과적으로 결합하거나 전달하는데 충분한 상기 양이다.
- [0029] "암호화"는 뉴클레오티드의 한정된 서열 (즉, rRNA, tRNA 및 mRNA) 또는 아미노산의 한정된 서열을 가진 생물학적 공정에서 다른 폴리머 및 고분자의 합성을 위한 주형의 역할을 하기 위한, 유전자, cDNA, 또는 mRNA와 같은, 폴리뉴클레오티드의 뉴클레오티드의 특이적 서열의 내재된 속성 및 그것들로부터 발생하는 생물학적 속성을 나타낸다. 따라서, 유전자는 상기 유전자에 해당하는 mRNA의 전사 및 번역이 세포 또는 다른 생물학적 시스템에서 단백질을 생산하면 단백질을 암호화한다. 암호화 가닥, mRNA 서열과 동일하고 보통 서열 목록에서 제공되는 뉴클레오티드 서열, 및 유전자 또는 cDNA의 전사를 위한 주형으로 사용되는 비-암호화 가닥 둘 다는 단백질 또는 상기 유전자 또는 cDNA의 다른 생성물을 암호화하는 것으로 나타날 수 있다.
- [0030] 본원에서 사용된 바와 같이 "내인성"은 유기체, 세포, 조직 또는 시스템의 또는 이것들의 내부에서 생산된 어떤 재료를 나타낸다.
- [0031] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "외인성"은 유기체, 세포, 조직 또는 시스템으로부터 도입된 또는 이것들의

외부에서 생산된 어떤 재료를 나타낸다.

[0032] 용어 "발현 구조" 및 "발현 카세트"는 원하는 핵산 인간 암호화 서열을 함유하는 및 작동 가능하게 결합된 암호화 서열의 발현에 필수적인 또는 이에 바람직한 하나 이상의 조절 요소를 함유하는 이중-가닥 재조합 DNA 분자를 나타내기 위해 본 발명에서 사용된다.

[0033] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "단편"은, 핵산 또는 폴리펩티드에 적용되는 바와 같이, 더 큰 핵산 또는 폴리펩티드의 부분 서열을 나타낸다. 핵산의 "단편"은 길이가 적어도 약 15개의 뉴클레오티드; 예를 들어, 적어도 약 50개의 뉴클레오티드 내지 약 100개의 뉴클레오티드; 적어도 약 100개 내지 약 500개의 뉴클레오티드, 적어도 약 500개 내지 약 1000개의 뉴클레오티드, 적어도 약 1000개의 뉴클레오티드 내지 약 1500개의 뉴클레오티드; 또는 약 1500개의 뉴클레오티드 내지 약 2500개의 뉴클레오티드; 또는 약 2500개의 뉴클레오티드 (및 그 사이의 어떤 정수 값)일 수 있다. 폴리펩티드의 "단편"은 길이가 적어도 약 15개의 뉴클레오티드; 예를 들어, 적어도 약 50개의 아미노산 내지 약 100개의 아미노산; 적어도 약 100개 내지 약 500개의 아미노산, 적어도 약 500개 내지 약 1000개의 아미노산, 적어도 약 1000개의 아미노산 내지 약 1500개의 아미노산; 또는 약 1500개의 아미노산 내지 약 2500개의 아미노산; 또는 약 2500개의 아미노산 (및 그 사이의 어떤 정수 값)일 수 있다.

[0034] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "유전자" 및 "재조합 유전자"는 폴리펩티드를 암호화하는 오픈 리딩 프레임 (open reading frame)을 포함하는 핵산 분자를 나타낸다. 이러한 천연 대립유전자 차이는 전형적으로 특정 유전자의 뉴클레오티드 서열에서 1-5% 변화를 초래할 수 있다. 대체 대립유전자는 많은 다른 개체에서 원하는 유전자를 시퀀싱(sequencing)함으로써 확인될 수 있다. 이것은 잡종화(hybridization) 프로브를 사용하여 다양한 개체에서 같은 유전자 자리를 확인함으로써 쉽게 수행될 수 있다. 이러한 모든 뉴클레오티드 차이 및 천연 대립유전자 차이의 결과이며 기능적 활성을 바꾸지 않는 결과의 아미노산 다양성 또는 차이는 본 발명의 범위 내에 있는 것으로 의도된다.

[0035] "상동성"은, 본원에서 사용된 바와 같이, 두 개의 폴리머 분자 사이, 예를 들어 두 개의 핵산 분자 사이, 예를 들어, 두 개의 DNA 분자 또는 두 개의 RNA 분자, 또는 두 개의 폴리펩티드 분자 사이의 서브유닛 서열 유사성을 나타낸다. 두 개의 분자 모두에서 서브유닛 위치를 같은 모노머 서브유닛이 차지할 때, 예를 들어, 두 개의 DNA 분자 각각의 위치를 아데닌이 차지하면, 그것들은 상기 위치에서 상동성이다. 두 서열 사이의 상동성은

[0036] 일치하는 또는 상동성 위치의 수의 직접적인 기능인데, 예를 들어 두 화합물 서열에서 위치의 절반 (예를 들어, 길이가 10개의 서브유닛인 폴리머에서 다섯 개의 위치)가 상동성이면, 두 서열은 50% 상동성이고, 위치의 90%, 예를 들어, 10개 중 9개가 일치되거나 또는 상동성이면, 두 서열은 90% 상동성을 공유한다. 예를 들어, DNA 서열 5'-ATTGCC-3' 및 5'-TATGGC-3'은 50% 상동성을 공유한다.

[0037] 용어 "인간 조혈모세포 및 전구세포" 및 "인간 HSPC" 본원에서 사용된 바와 같이, 인간 자가-재생 다분화능 조혈모세포 및 조혈성 전구세포를 나타낸다.

[0038] "유발성" 발현은 유전자 생성물이 세포에서 신호의 존재에 반응하여 살아있는 세포에서 생산되는 상태이다.

[0039] 본원에서 사용된 바와 같이, "교육용 재료(instructional material)"는 간행물, 기록, 다이어그램(diagram), 또는 본원에서 인용된 다양한 질환 또는 장애의 완화에 영향을 미치는 키트에서 본 발명의 화합물, 조성물, 백터, 또는 전달 시스템의 유용함을 전달하기 위해 사용될 수 있는 어떤 다른 표현 매체도 포함한다. 선택적으로, 또는 대안으로, 교육용 재료는 포유동물의 세포 또는 조직에서 질환 또는 장애를 완화하는 하나 이상의 방법을 설명할 수 있다. 본 발명의 키트의 교육용 재료는, 예를 들어, 본 발명의 확인된 화합물, 조성물, 백터, 또는 전달 시스템을 함유하는 용기에 부착될 수 있거나 확인된 화합물, 조성물, 백터, 또는 전달 시스템을 함유하는 용기와 함께 배송될 수 있다. 대안으로, 교육용 재료는 교육용 재료 및 화합물이 수령체에 의해 협조적으로 사용될 의도로 용기와 별도로 배송될 수 있다.

[0040] 용어 "작동 가능하게 결합된"은 본원에서 사용된 바와 같이 제2 폴리뉴클레오티드와의 기능적 관계인 폴리뉴클레오티드를 나타낸다. "작동 가능하게 결합된"으로 두 개의 폴리뉴클레오티드를 설명하는 것은 두 개의 폴리뉴클레오티드 중 적어도 하나가 그것이 특징으로 하는 생리학적 효과를 발휘할 수 있는 방식으로 단일-가닥 또는 이중-가닥 핵산 모이어티가 핵산 모이어티 내에 배열된 두 개의 폴리펩티드를 포함한다는 것을 의미한다. 예를 들어, 유전자의 암호화 영역에 작동 가능하게 결합된 프로모터는 암호화 영역의 전사를 촉진할 수 있다. 바람직하게, 원하는 단백질을 암호화하는 핵산이 프로모터/조절 서열을 더 포함할 때, 프로모터/조절 서열은 원하는 단백질 암호화 서열의 5' 끝에 위치하는데, 그것은 세포에서 원하는 단백질의 발현을 구동한다. 동시에, 원하는

단백질을 암호화하는 핵산 및 그것의 프로모터/조절 서열은 "이식 유전자"를 포함한다.

- [0041] 용어 "폴리뉴클레오티드"는 본원에서 사용된 바와 같이 뉴클레오티드의 사슬로서 한정된다. 게다가, 핵산은 뉴클레오티드의 폴리머이다. 따라서, 핵산 및 폴리뉴클레오티드는 본원에서 사용된 바와 같이 교체 가능하다. 당업자는
- [0042] 핵산이 폴리뉴클레오티드이며, 이것은 모노머 "뉴클레오티드"로 가수분해될 수 있다는 일반적인 지식을 갖고 있다. 모노머 뉴클레오티드는 뉴클레오시드로 가수분해될 수 있다. 본원에서 사용된 바와 같이 폴리뉴클레오티드는 제한은 아니지만, 재조합 수단, 즉, 보통 클로닝 기술 및 PCR, 등을 사용하는, 재조합 라이브러리 또는 세포계놈의 핵산 서열의 핵산 서열 클로닝을 포함하는 업계에서 이용 가능한 어떤 수단, 및 합성 수단에 의해 얻어진 모든 핵산 서열을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.
- [0043] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "펩티드", "폴리펩티드", 및 "단백질"은 교체 가능하게 사용되며, 펩티드 결합에 의해 공유 결합된 아미노산 잔기로 구성된 화합물을 나타낸다. 단백질 또는 펩티드는 적어도 두 개의 아미노산을 함유해야 하고, 단백질 또는 펩티드의 서열을 포함할 수 있는 아미노산의 최대 숫자에 제한되지 않는다. 폴리펩티드는 펩티드 결합에 의해 서로 연결된 둘 이상의 아미노산을 포함하는 어떤 펩티드 또는 단백질도 포함한다. 본원에서 사용된 바와 같이, 예를 들어, 업계에서 흔히 펩티드, 올리고펩티드 및 올리고머로 나타나는 두 개의 짧은 사슬, 및 일반적으로 단백질로서 업계에 알려져 있는 많은 타입이 긴 사슬을 나타낸다. "폴리펩티드"는 다른 것들 중에서, 예를 들어, 생물학적 활성 단편, 실질적 상동성 폴리펩티드, 올리고펩티드, 호모다이머, 헤테로다이머, 폴리펩티드의 변종, 변형된 폴리펩티드, 유도체, 유사체, 융합 단백질을 포함한다. 폴리펩티드는 천연 펩티드, 재조합 펩티드, 합성 펩티드, 또는 이것들의 조합을 포함한다. 용어 "펩티드"는 전형적으로 짧은 폴리펩티드를 나타낸다. 용어 "단백질"은 전형적으로 큰 폴리펩티드를 나타낸다.
- [0044] 용어 "자손(progeny)"은 본원에서 사용된 바와 같이 후손(descendant) 또는 자식(offspring)을 나타내고 모체 세포로부터 유래된 분화된 또는 분화되지 않은 후손 세포를 포함한다. 한 용법으로, 용어 자손은 모체와 유전적으로 동일한 후손 세포를 나타낸다. 다른 용도로, 용어 자손은 모체와 유전적으로 및 표현형이 동일한 후손 세포를 나타낸다. 또 다른 용도로는, 용어 자손은 모체 세포로부터 분화된 후손 세포를 나타낸다.
- [0045] 용어 "프로모터"는 본원에서 사용된 바와 같이 원하는 분자를 암호화하는 핵산 서열과 같이 전사되는 핵산 서열에 작동 가능하게 결합된 DNA 서열을 나타낸다. 프로모터는 일반적으로 전사되는 핵산 서열의 업스트림(upstream)에 위치하고 RNA 폴리머라제 및 다른 전사 인자에 의한 특이적 결합 부위를 제공한다. 특정 구체예에서, 프로모터는 일반적으로 원하는 분자를 생산하기 위해 전사되는 핵산 서열의 업스트림에 위치하고, RNA 폴리머라제 및 다른 전사 인자에 의한 특이적 결합 부위를 제공한다. 포함된 프로모터는 구성적 프로모터일 수 있거나 유발성 발현을 제공할 수 있고; 보편적인, 조직-특이적 또는 세포-타입 특이적 발현을 제공할 수 있다.
- [0046] 범위: 본 개시물을 통해, 본 발명의 다양한 양태는 범위 포맷으로 제공될 수 있다. 범위 포맷에서 설명은 단지 편의 및 간결함을 위한 것으로 해석되어야 하고 본 발명의 범위에 대한 유연성이 없는 제한으로서 이해되어서는 안된다. 따라서, 범위의 설명은 특이적으로 개시된 모든 가능한 부분범위, 뿐만 아니라 상기 범위 내 개개의 수치 값을 갖는 것으로 간주되어야 한다. 예를 들어, 1 내지 6과 같은 범위의 설명은 1 내지 3, 1 내지 4, 1 내지 5, 2 내지 4, 2 내지 6, 3 내지 6 등과 같은 특이적으로 개시된 부분범위, 뿐만 아니라 상기 범위 내 개개의 수치, 예를 들어, 1, 2, 2.7, 3, 4, 5, 5.3, 및 6을 갖는 것으로 간주되어야 한다. 이는 범위의 너비에 상관없이 적용된다.
- [0047] "재조합 폴리펩티드"는 재조합 폴리뉴클레오티드의 발현 시 생산되는 것이다.
- [0048] 용어 "조절 요소"는 본원에서 사용된 바와 같이 핵산 서열 발현의 일부 양태를 제어하는 뉴클레오티드 서열을 나타낸다. 예시적 조절 요소는 예시적으로 인핸서(enhancer), 내부 리보솜 진입 부위 (internal ribosome entry site; IRES), 인트론(intron); 복제 기원, 폴리아데닐화 신호 (pA), 프로모터, 인핸서, 전사 종결 서열, 및 업스트림 조절 도메인을 포함하는데, 이것은 핵산 서열의 복제, 전사, 전사 후 가공에 기여한다. 당업자들은 더 이상의 일상적인 실험 없이 발현 구조에서 이 및 다른 조절 요소들을 선택하고 사용할 수 있다. 발현 구조는 잘 알려진 방법을 사용하여 재조합에 의해 또는 합성에 의해 발생될 수 있다.
- [0049] 용어 "특이적으로 결합하다"는, 항체에 관하여 본원에서 사용된 바와 같이, 특이적 항원을 인식하는 항체를 의미하지만, 샘플에서 다른 분자를 실질적으로 인식하거나 이것에 결합하지 않는다. 예를 들어, 한 종의 항원에 특이적으로 결합하는 항체는 또한 하나 이상의 종의 상기 항원에도 결합할 수 있다. 하지만, 이러한 교차-종 반응성은 특이적인 항체의 분류를 스스로 변화시키지 않는다. 또 다른 예에서, 항원에 특이적으로 결합하는 항체

는 또한 항원의 다른 대립유전자 형태에 결합할 수도 있다. 하지만, 이러한 교차 반응성은 특이적인 항체의 분류를 스스로 변화시키지 않는다.

[0050] 일부 예에서, 용어 "특이적 결합" 또는 "특이적으로 결합하는"은 항체, 단백질, 또는 웨티드와 제2 화학종의 상호작용에 관하여 사용될 수 있으며, 상호작용이 화학종에서 특정 구조 (예를 들어, 항원성 결정요인 또는 에피토프)의 존재에 의존적이라는 것을 의미하고; 예를 들어, 항체는 일반적으로 단백질 대신에 특이적 단백질 구조를 인식하고 이것에 결합한다. 항체가 에피토프 "A"에 특이적이면, 표지된 "A" 및 항체를 함유하는 반응에서, 에피토프 A (또는 자유로운, 표지되지 않은 A)를 함유하는 분자의 존재는 항체에 결합된 표지된 A의 양을 감소 시킬 것이다.

[0051] 용어 "합성 항체"는 본원에서 사용된 바와 같이, 재조합 DNA 기술을 사용하여 생성된 항체, 예를 들어, 본원에서 설명된 바와 같이 박테리오파지(bacteriophage)에 의해 발현된 항체를 의미한다. 용어는 또한 항체를 암호화하는 DNA 분자의 합성에 의해 생성되고 DNA 분자가 항체 단백질, 또는 항체를 명시하는 아미노산 서열을 발현하는 항체를 의미하는 것으로 해석되어야 하는데, DNA 또는 아미노산 서열은 이용 가능하고 업계에 잘 알려져 있는 합성 DNA 또는 아미노산 서열 기술을 사용하여 얻어졌다.

[0052] 용어로서 "변종"이 본원에서 사용되고, 각각 참조 핵산 서열 또는 웨티드 서열과 서열이 다른 핵산 서열 또는 웨티드 서열이지만, 참조 분자의 본질적인 생물학적 속성을 유지한다. 핵산 변종의 서열 변화는 참조 핵산에 의해 암호화된 웨티드의 아미노산 서열을 변화시키지 않을 수도 있거나, 또는 아미노산 치환, 추가, 결실, 융합 및 절단을 초래할 수도 있다. 웨티드 변종의 서열 변화는 전형적으로 참조 웨티드의 서열 및 변종이 전체적으로 매우 유사하고, 많은 영역에서 동일하도록 제한되거나 보존된다. 변종 및 참조 웨티드는 어떤 조합에서도 하나 이상의 치환, 추가, 결실에 의해 아미노산 서열이 다를 수 있다. 다양한 핵산 또는 웨티드는 대립유전자 변종과 같이 자연적으로 발생할 수 있거나, 또는 자연적으로 발생하는 것으로 알려져 있지 않은 변종일 수 있다. 핵산 및 웨티드의 비-자연적으로 발생한 변종은 돌연변이 유발 기술 또는 직접적인 합성에 의해 만들어질 수도 있다.

[0053] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "유전적으로 변형된"은 생식세포가 외인성 인간 핵산 또는 인간 핵산 서열을 포함하는 동물을 의미한다. 비-제한 예로서 유전적으로 변형된 동물은 동물이 인간 핵산 서열을 포함한다면, 트랜스제닉 동물 또는 네-인 동물일 수 있다.

[0054] 본원에서 사용된 바와 같이, "네-인"은 비-인간 동물의 염색체 자리에서 암호화된 유전적 정보를 상이한 DNA 서열로 대체하는 유전적 변형을 의미한다.

설명

[0055] 본 발명은 인간 M-CSF, 인간 IL-3/GM-CSF, 인간 SIRPA 및 인간 TPO를 발현하는 유전적으로 변형된 비-인간 동물 (본원에서 MISTRG로 불림)에 관한 것이다. 본 발명은 또한 본원에서 설명된 유전적으로 변형된 비-인간 동물을 발생시키는 방법 및 이것들을 사용하는 방법에 관한 것이다. 일부 구체예에서, 유전적으로 변형된 비-인간 동물은 마우스다. 일부 구체예에서, 유전적으로 변형된 비-인간 동물은 면역 결핍 마우스이다. 특정 구체예에서, 면역 결핍 마우스는 RAG2^{-/-} γc^{-/-} 마우스이다. 또 다른 특정 구체예에서, 본 발명의 유전적으로 변형된 비-인간 동물은 인간 M-CSF, 인간 IL-3/GM-CSF, 및 인간 TPO를 발현하고 RAG2 또는 γc를 발현하지 않는다 (본원에서 MISTRG로 불림). 또 다른 특정 구체예에서, 본 발명의 유전적으로 변형된 비-인간 동물은 인간 M-CSF, 인간 IL-3/GM-CSF, 인간 SIRPA 및 인간 TPO를 발현하고 RAG2 또는 γc를 발현하지 않는다 (본원에서 MISTRG로 불림). 일부 구체예에서, 본원에서 설명된 유전적으로 변형된 비-인간 동물은 인간 조혈성 세포로 이식된다.

[0057] 다양한 구체예에서, 본 발명의 인간 조혈성 세포 이식된, 유전적으로 변형된 비-인간 동물은 조혈성 및 면역 세포의 성장 및 분화의 생체 내 평가, 인간 혈액 생성의 생체 내 평가, 암 세포의 생체 내 평가, 면역 반응의 생체 내 평가, 백신 및 백신 접종 요법의 생체 내 평가, 암 세포 성장 또는 생존을 조절하는 약제의 효과의 테스트에 사용, 암 치료의 생체 내 평가, 인간 항체를 포함하는 면역 매개자의 생체 내 생산 및 수거, 및 조혈성 및 면역 세포 기능을 조절하는 약제의 효과의 테스트에 사용에 유용하다.

유전적으로 변형된 비-인간 동물

[0059] 본 발명은 인간 M-CSF, 인간 IL-3/GM-CSF, 인간 SIRPA, 인간 TPO, 및 이것들의 어떤 조합을 발현하는 유전적으로 변형된 비-인간 동물을 포함한다. 일부 구체예에서, 인간 핵산을 발현하는 유전적으로 변형된 비-인간 동물은 또한 해당하는 비-인간 동물 핵산을 발현한다. 다른 구체예에서, 인간 핵산을 발현하는 유전적으로 변형된

비-인간 동물은 또한 해당하는 비-인간 동물 핵산을 발현하지 않는다. 일부 구체예에서, 유전적으로 변형된 동물은 동물을 면역 결핍 동물로 만들기 위해 하나 이상의 넉아웃된 유전자를 가진 동물이며, 본원에서 설명된 다른 부분과 같다. 유전적으로 변형된 비-인간 동물을 생성하기 위해, 인간 단백질을 암호화하는 핵산은 비-인간 숙주 세포에서 인간 단백질의 발현에 적합한 형태로 재조합 발현 벡터로 포함될 수 있다. 다양한 구체예에서, 재조합 발현 벡터는 핵산의 mRNA로의 전사 및 mRNA의 인간 단백질로의 번역을 허용하는 방식으로 인간 단백질을 암호화하는 핵산에 작동 가능하게 결합된 하나 이상의 조절 서열을 포함한다. 용어 "조절 서열"은 업계에 인식되고 프로모터, 인핸서 및 다른 발현 제어 요소 (예를 들어, 폴리아데닐화 신호)를 포함하도록 의도된다. 이러한 조절 서열은 당업자에게 알려져 있고 1990, Goeddel, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, Calif에서 설명된다. 발현 벡터의 설계는 트랜스펙션되는 숙주 세포의 선택 및/또는 발현되는 인간 단백질의 양과 같은 인자에 의존할 수도 있다고 생각되어야 한다.

[0060]

유전적으로 변형된 동물은, 예를 들어, 인간 단백질 (구성적 또는 조직-특이적 인핸서와 같은 적절한 조절 요소에 전형적으로 결합됨)을, 예를 들어, 미세 주입법에 의해, 암호화하는 핵산을 난모 세포(oocyte)로 도입함으로써, 및 난모 세포가 암컷 수양 동물에서 발달하게 함으로써 생성될 수 있다. 인트론 서열 및 폴리아데닐화 신호는 또한 이식 유전자의 발현 효율을 증가시키기 위해 이식 유전자에 포함될 수 있다. 유전적으로 변형된 동물, 특히 마우스와 같은 동물을 발생시키는 방법은 업계에 통상적인 것이 되었고, 예를 들어, 미국 특허 번호 제4,736,866호 및 제4,870,009호 및 1986, Hogan et al, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory에서 설명된다. 유전적으로 변형된 조상 동물은 이식 유전자를 가지고 있는 추가의 동물을 번식시키기 위해 사용될 수 있다. 본 발명의 인간 단백질을 암호화하는 이식 유전자를 가지고 있는 유전적으로 변형된 동물은 다른 이식 유전자를 가지고 있는 다른 유전적으로 변형된 동물에 더 교배될 수 있거나, 또는 넉아웃 동물, 예를 들어, 유전자 중 하나 이상을 발현하지 않는 넉아웃 동물에 교배될 수 있다. 다양한 구체예에서, 본 발명의 유전적으로 변형된 동물은 마우스, 래트 또는 토끼이다.

[0061]

일부 구체예에서, 본 발명의 유전적으로 변형된 동물은 비-인간 동물의 고유한 프로모터 및 고유한 조절 요소의 하나 이상의 인간 핵산을 발현한다. 다른 구체예에서, 본 발명의 유전적으로 변형된 동물은 고유한 인간 프로모터 및 고유한 조절 요소의 인간 핵산을 발현한다. 당업자는 본 발명의 유전적으로 변형된 동물이 어떤 프로모터의 적어도 하나의 인간 핵산도 발현하는 유전적으로 변형된 동물을 포함한다는 것을 이해할 것이다. 본 발명에서 유용한 프로모터의 예는 DNA pol II 프로모터, PGK 프로모터, 유비퀴틴(ubiquitin) 프로모터, 알부민 프로모터, 글로빈 프로모터, 오발부민 프로모터, SV40 초기 프로모터, 라우스 육종 바이러스(Rous sarcoma virus) (RSV) 프로모터, 레트로바이러스 LTR 및 렌티바이러스 LTR을 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다. 본 발명에서 유용한 프로모터 및 인핸서 발현 시스템은 또한 유발성 및/또는 조직-특이성 발현 시스템을 포함한다.

[0062]

일부 구체예에서, 본 발명은 프로모터에 작동 가능하게 결합된 인간 폴리펩티드를 암호화하는 핵산을 포함하는 계음을 가진 유전적으로 변형된 면역 결핍 동물을 포함하는데, 동물은 암호화된 인간 폴리펩티드를 발현한다. 다양한 구체예에서, 본 발명은 적어도 하나의 인간 폴리펩티드를 암호화하는 핵산을 포함하는 발현 카세트를 포함하는 계음을 가진 유전적으로 변형된 면역 결핍 비-인간 동물을 포함하는데, 핵산은 프로모터 및 폴리아데닐화 신호에 작동 가능하게 결합되고 인트론을 더 함유하며, 동물은 암호화된 인간 폴리펩티드를 발현한다.

[0063]

다양한 구체예에서, 다양한 방법이 인간 유전자를 발현하는 유전적으로 변형된 면역 결핍 동물을 생산하기 위해 인간 핵산 서열을 면역 결핍 동물로 도입하는데 사용된다. 이러한 기술은 업계에 잘 알려져 있고 전핵(pronuclear) 미세 주입법, 배아 줄기 세포의 형질전환, 상동성의 재조합 및 넉-인 기술을 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다. 사용될 수 있는 유전적으로 변형된 동물을 발생시키는 방법은 Sundberg and Ichiki (2006, Genetically Engineered Mice Handbook, CRC Press), Hofker and van Deursen (2002, Genetically modified Mouse Methods and Protocols, Humana Press), Joyner (2000, Gene Targeting: A Practical Approach, Oxford University Press), Turksen (2002, Embryonic stem cells: Methods and Protocols in Methods Mol Biol, Humana Press), Meyer et al. (2010, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 107: 15022-15026), 및 Gibson (2004, A Primer Of Genome Science 2nd ed. Sunderland, Massachusetts: Sinauer), 미국 특허 번호 제6,586,251호, Rathinam et al. (2011, Blood 118:3119-28), Willinger et al. (2011, Proc Natl Acad Sci USA, 108:2390-2395), Rongvaux et al. (2011, Proc Natl Acad Sci USA, 108:2378-83) 및 Valenzuela et al. (2003, Nat Biotech 21:652-659)에서 설명된 것들을 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다.

[0064]

일부 구체예에서, 본 발명의 조성물 및 방법은 단독으로, 또는 NK 세포 수 및/또는 기능의 결핍과 조합하여, B 세포 수 및/또는 T 세포 수 및/또는 기능이 결핍된 (예를 들어, IL2 수용체 감마 사슬 결핍 (즉, $\gamma_c^{-/-}$)으로 인

해), 및 프로모터에 작동 가능하게 결합된 인간 핵산을 포함하는 게놈을 가진 유전적으로 변형된 면역 결핍 동물을 포함하며, 동물은 암호화된 인간 폴리펩티드를 발현한다. 본 발명의 유전적으로 변형된 동물은 발현 구조의 착상 전 배아로의 DNA 주입과 같은 방법에 의해 또는 배아 줄기 (ES) 세포 또는 유도 만능 줄기 (induced pluripotent stem; iPS) 세포와 같은 줄기 세포의 사용에 의해 달성될 수 있다.

[0065] 한 구체예에서, 인간 핵산은 인간 유전자의 고유한 조절 요소에 의해 발현된다. 다른 구체예에서, 인간 핵산은 비-인간 동물의 고유한 조절 요소에 의해 발현된다. 다른 구체예에서, 인간 핵산은 보편적인 프로모터로부터 발현된다.

[0066] 본 발명의 조성물 및 방법의 발현 구조에서 유용한 보편적인 프로모터의 비제한 예는 3-포스포글리세레이트 키나제 (PGK-1) 프로모터, 베타-액틴 프로모터, ROSA26 프로모터, 열 충격 단백질 70 (Hsp70) 프로모터, EF-1 알파 유전자 암호화 신장 인자 1 알파 (EF1) 프로모터, 진핵생물 개시 인자 4A (eIF-4A1) 프로모터, 클로람페니콜 아세틸트랜스페라제 (CAT) 프로모터 및 CMV (시토메갈로바이러스) 프로모터를 포함한다.

[0067] 다른 구체예에서, 인간 핵산은 조직-특이적 프로모터로부터 발현된다. 본 발명의 조성물 및 방법의 발현 구조에서 유용한 조직-특이적 프로모터의 비제한 예는 M-CSF 프로모터, IL-3 프로모터, GM-CSF 프로모터, SIRPA 프로모터, TPO 프로모터, IFN- β 프로모터, 비스코트-올드리치 증후군 단백질 (Wiskott-Aldrich syndrome protein; WASP) 프로모터, CD45 (백혈구 공통 항원으로도 불림) 프로모터, Flt-1 프로모터, 엔도글린 (CD105) 프로모터 및 ICAM-2 (세포 내 부착 분자 2 (Intracellular Adhesion Molecule 2)) 프로모터와 같이, 조혈성 시스템에서 발현되는 유전자의 프로모터를 포함한다. 본 발명의 조성물 및 방법에서 유용한 여러 프로모터는 Abboud et al. (2003, *J. Histochem & Cytochem.* 51:941-949), Schorpp et al. (1996, *NAR* 24: 1787-1788), McBurney et al. (1994, *Devel. Dynamics*, 200:278-293) 및 Majumder et al. (1996, *Blood* 87:3203-3211)에서 예시된 바와 같이 업계에 알려져 있다. 프로모터를 포함하는 것에 관하여, 인핸서 요소 또는 인트론 서열과 같은 하나 이상의 추가적 조절 요소가 본 발명의 다양한 구체예에 포함된다. 본 발명의 조성물 및 방법에서 유용한 인핸서의 예는 시토메갈로바이러스 (CMV) 초기 인핸서 요소 및 SV40 인핸서 요소를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 본 발명의 조성물 및 방법에서 유용한 인트론 서열의 예는 베타 글로빈 인트론 또는 일반적인 인트론을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 본 발명의 일부 구체예에서 유용한 다른 추가적 조절 요소는 전사 종결 서열 및 mRNA 폴리아데닐화 (pA) 서열을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0068] 일부 구체예에서, 인간 핵산 발현 구조의 착상 전 배아로의 도입 방법은 그것이 착상 전 배아로 주사되기 전에 발현 구조의 선형화를 포함한다. 바람직한 구체예에서, 발현 구조는 수정된 난모 세포로 주사된다. 수정된 난모 세포는 교미 전날 과배란 암컷으로부터 수거되고 발현 구조로 주사될 수 있다. 주사된 난모 세포는 하룻밤 동안 배양되거나 또는 0.5일 p.c. 가임신 암컷의 난관(oviduct)으로 직접 옮겨진다. 과배란, 난모 세포 수거, 발현 구조 주사 및 배아 이식(emebryo transfer) 방법이 업계에 알려져 있으며 *Manipulating the Mouse Embryo* (2002, *A Laboratory Manual*, 3rd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press)에서 설명된다. 자식은 DNA 분석 (예를 들어, PCR, 서던 블롯(Southern blot), DNA 시퀀싱, 등) 또는 단백질 분석 (예를 들어, ELISA, 웨스턴 블롯(Western blot), 등)에 의해 도입된 핵산의 존재에 대하여 평가될 수 있다.

[0069] 다른 구체예에서, 발현 구조는 전기 천공법(electroporation), 칼슘-포스페이트 침전 및 리포펙션(lipofection)과 같이 잘 알려져 있는 방법을 사용하여 줄기 세포 (ES 세포 또는 iPS 세포)로 트랜스펙션될 수도 있다. 세포는 DNA 분석 (예를 들어, PCR, 서던 블롯, DNA 시퀀싱, 등) 또는 단백질 분석 (예를 들어, ELISA, 웨스턴 블롯, 등)에 의해 도입된 핵산의 존재에 대하여 평가될 수 있다. 발현 구조를 포함하는 것으로 결정된 세포는 그 다음에 착상 전 배아로 미세 주입될 수도 있다. 본 발명의 조성물 및 방법에 유용한 업계에 알려져 있는 방법의 상세한 설명을 위해서, Nagy et al. (2002, *Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual*, 3rd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press), Nagy et al. (1990, *Development* 110:815-821), 미국 특허 번호 제7,576,259호, 미국 특허 번호 제7,659,442호, 미국 특허 번호 제7,294,754호, 및 Kraus et al. (2010, *Genesis* 48:394-399)을 참고하면 된다.

[0070] 본 발명의 유전적으로 변형된 비-인간 동물은 적어도 하나의 인간 핵산을 발현하는 면역 결핍 동물을 생성하기 위해 면역 결핍 동물에 교배될 수 있다. 본 발명의 다양한 구체예는 실질적으로 모든 세포에서 인간 핵산을 포함하는 유전적으로 변형된 동물, 뿐만 아니라 모든 세포는 아니지만, 일부에서 인간 핵산을 포함하는 유전적으로 변형된 동물을 제공한다. 인간 핵산의, 서로 인접하거나 먼, 하나 또는 다수의 카피는 유전적으로 변형된 동물의 세포의 게놈으로 통합될 수도 있다.

[0071] 일부 구체예에서, 본 발명은 적어도 하나의 인간 조혈성 세포로 이식된 유전적으로 변형된 비-인간 마우스이다.

다른 구체예에서, 본 발명은 유전적으로 변형된 비-인간 동물에서 인간 조혈성 세포를 이식하는 방법이다. 본 발명의 조성을 및 방법에서 유용한 이식된 인간 조혈성 세포는 어떤 인간 조혈성 세포도 포함한다. 본 발명에서 유용한 인간 조혈성 세포의 비-제한 예는 HSC, HSPC, 백혈병 개시 세포 (LIC), 및 어떤 계통의 말기에 분화된 조혈성 세포를 포함하는, 어떤 계통의 어떤 분화 단계의 조혈성 세포도 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 이러한 조혈성 세포는 골수, 말초 혈액, 간, 태아 간, 또는 제대혈을 포함하지만, 이에 제한되지 않는, 인간 기증자의 어떤 조직 또는 위치로부터 유래될 수 있다. 이러한 조혈성 세포는 건강한 기증자, 뿐만 아니라 백혈병을 포함하여, 암과 같은 질환에 걸린 기증자를 포함하는, 어떤 인간 기증자로부터 분리될 수 있다.

[0072] 다른 구체예에서, 본 발명은 유전적으로 변형된 비-인간 동물에서 인간 조혈성 세포를 이식하는 방법이다. 일부 구체예에서, 인간 조혈성 세포가 이식되는 유전적으로 변형된 비-인간 동물은 면역 결핍 동물이다. 본 발명의 유전적으로 변형된 동물에서 조혈성 세포의 이식은 이식된 동물에서 인간 조혈성 세포의 존재를 특징으로 한다. 특정 구체예에서, 면역 결핍 동물에서 조혈성 세포의 이식은 적절한 대조군 동물과 비교하여, 조혈성 세포가 제공되는 이식된 동물에서 분화된 인간 조혈성 세포의 존재를 특징으로 한다.

[0073] 일부 구체예에서, 본 발명의 동물은 인간 조혈성 세포 이외에 인간 암 세포 (예를 들어, 인간 고체 종양, 등)로 이식된다. 다양한 구체예에서, 인간 암 세포는 환자로부터, 많은 상이한 타입의 암 중 어떤 것 (비-제한 예로서, 흑색종, 유방암, 폐암, 등을 포함)으로부터 분리된 암 세포주 또는 1차 인간 암 세포일 수 있다. 일부 구체예에서, 인간 암 세포 및 HSPC는 같은 환자로부터 분리되고 같은 비-인간 동물로 이식된다.

[0074] 본 발명의 다양한 구체예에서 제공된 유전적으로 변형된 비-인간 동물은 제한은 아니지만, 조혈성 세포의 성장 및 분화의 모델로서 사용, 인간 혈액 생성의 생체 내 평가, 암 세포의 생체 내 평가, 면역 반응의 생체 내 연구, 백신 및 백신 접종 요법의 생체 내 평가, 암 세포 성장 또는 생존을 조절하는 약제의 효과의 테스트에 사용, 암 치료의 생체 내 평가, 항체와 같은 면역 매개자의 생체 내 생산 및 수거, 및 조혈성 및 면역 세포 기능에 영향을 미치는 약제의 효과의 테스트에 사용과 같이 다양한 활용성을 갖고 있다.

[0075] 유전적으로 변형된 및/또는 면역 결핍 비-인간 동물에서 인간 조혈성 세포의 이식은 전통적으로 조혈성 세포의 투여 전 컨디셔닝(conditioning), 일반적으로 감마 또는 X-선 조사를 사용하는, 고주파 전자기 방사선으로 수령체 동물의 아치사(sub-lethal) 조사, 또는 부설판 또는 질소 머스터드와 같은 방사선 유사 작용 약물(radiomimetic drug)의 처리를 필요로 한다. 컨디셔닝은 숙주 조혈성 세포의 수를 감소시키고, 인간 조혈성 세포의 이식에 적절한 미세 환경 인자를 생성하고, 및/또는 인간 조혈성 세포의 이식의 미세 환경 적소(niche)를 생성하는 것으로 생각된다. 표준 컨디셔닝 방법은 업계에 알려져 있으며, 본원에서 및 J. Hayakawa et al, 2009, *Stem Cells*, 27(1): 175-182에서 설명된 것들과 같다. 면역 결핍 동물에서 인간 조혈성 세포의 이식 방법은, 조혈성 세포의 투여 전 동물을 조사하거나 그렇지 않고, 면역 결핍 동물에게 인간 조혈성 세포를 제공하는 단계를 포함하는 본 발명의 구체예에 따라 제공된다. 면역 결핍 동물에서 인간 조혈성 세포의 이식 방법은 조혈성 세포의 투여 전 동물에게 부설판 또는 질소 머스터드와 같은 방사선 유사 작용 약물을 투여하거나 그렇지 않고, 본 발명의 유전적으로 변형된 비-인간 동물에게 인간 조혈성 세포를 제공하는 단계를 포함하는 본 발명의 구체예에 따라 제공된다.

[0076] 일부 구체예에서, 본 발명의 구체예에 따르는 유전적으로 변형된 비-인간 동물에서 조혈성 세포 이식 방법은 본원에서 설명된 다른 부분과 같이 본 발명의 유전적으로 변형된 동물에게 인간 조혈성 세포를 제공하는 단계를 포함한다. 일부 구체예에서, 본 발명의 유전적으로 변형된 비-인간 동물은 비-인간 B 세포 수 및/또는 기능, 비-인간 T 세포 수 및/또는 기능, 및/또는 비-인간 NK 세포 수 및/또는 기능이 결핍된 면역 결핍 동물이다. 다른 구체예에서, 면역 결핍 동물은 중증 복합 면역 결핍증 (severe combined immune deficiency; SCID)을 갖는다. SCID는 T 세포의 부재 및 B 세포 기능의 부족을 특징으로 하는 질병을 나타낸다. SCID의 예는 IL2RG 유전자 및 림프구 표현형 T(-) B(+) NK(-)의 감마 사슬 유전자 돌연변이를 특징으로 하는 X-연관 SCID; 및 Jak3 유전자 돌연변이 및 림프구 표현형 T(-) B(+) NK(-), ADA 유전자 돌연변이 및 림프구 표현형 T(-) B(-) NK(-), IL-7R 알파-사슬 돌연변이 및 림프구 표현형 T(-) B(+) NK(+), CD3 엘타 또는 엡실론 돌연변이 및 림프구 표현형 T(-) B(+) NK(+), RAG1/RAG2 돌연변이 및 림프구 표현형 T(-) B(-) NK(+), Artemis 유전자 돌연변이 및 림프구 표현형 T(-) B(-) NK(+), CD45 유전자 돌연변이 및 림프구 표현형 T(-) B(+) NK(+)를 특징으로 하는 상염색체 열성 (autosomal recessive) SCID를 포함한다. 일부 구체예에서, 본 발명의 유전적으로 변형된 비-인간 동물은 RAG1^{-/-}이다.

[0077] 일부 구체예에서, 본 발명의 구체예에 따르는 유전적으로 변형된 동물에서 조혈성 세포 이식 방법은 보통 scid

돌연변이로 불리는 중증 복합 면역 결핍증 돌연변이 (*Prkdc*^{scid})에 걸린 유전적으로 변형된 비-인간 동물에게 인간 조혈성 세포를 제공하는 단계를 포함한다. *scid* 돌연변이는 잘 알려져 있고 Bosma et al. (1989, *Immunogenetics* 29:54-56)에서 설명된 바와 같이 마우스 염색체 16에 위치한다. *scid* 돌연변이에 동형 접합성인 마우스는 기능적 T 세포 및 B 세포의 부재, 림프구 감소증(lymphopenia), 저글로불린혈증(hypoglobulinemia) 및 정상 조혈성 미세 환경을 특징으로 한다. *scid* 돌연변이는, 예를 들어, 잘 알려져 있는 방법을 사용하여 *scid* 돌연변이 마커의 검출에 의해 검출될 수 있다.

[0078] 다른 구체예에서, 본 발명의 구체예에 따르는 유전적으로 변형된 동물에서 조혈성 세포 이식 방법은 단독으로, 또는 중증 복합 면역 결핍증 (*scid*) 돌연변이와 조합하여, IL2 수용체 감마 사슬 결핍에 걸린 유전적으로 변형된 면역 결핍 비-인간 동물에게 인간 조혈성 세포를 제공하는 단계를 포함한다. 용어 "IL2 수용체 감마 사슬 결핍"은 감소된 IL2 수용체 감마 사슬을 나타낸다. 감소된 IL2 수용체 감마 사슬은 유전자 결실 또는 돌연변이로 인한 것일 수 있다. 감소된 IL2 수용체 감마 사슬은 잘 알려져 있는 방법을 사용하여, 예를 들어, IL2 수용체 감마 사슬 유전자 결실 또는 돌연변이의 검출 및/또는 감소된 IL2 수용체 감마 사슬 발현의 검출에 의해 검출될 수 있다.

[0079] 자연 발생한 인간 핵산 및 아미노산 서열에 더하여, 용어는 인간 핵산 및 아미노산 서열의 변종을 포함한다. 본 원에서 사용된 바와 같이, 용어 "변종"은 인간의 분리된 자연 발생한 유전적 돌연변이 또는 인간의 재조합에 의해 제조된 차이를 한정하는데, 이것들 각각은 해당하는 야생형 인간과 비교하여 하나 이상의 돌연변이를 함유한다. 예를 들어, 이러한 돌연변이는 하나 이상의 아미노산 치환, 추가, 및/또는 결실일 수 있다. 용어 "변종"은 또한 비-인간 오솔로그(orthologue)를 포함한다. 일부 구체예에서, 본 발명의 변종 폴리펩티드는 야생형 인간 폴리펩티드에 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는다.

[0080] 두 서열 사이의 퍼센트 동일성은 본원의 다른 부분에서 설명된 것들과 같은 기술을 사용하여 결정된다. 돌연변이는 부위-관련 돌연변이 유발 및 PCR-매개 돌연변이 유발과 같은, 표준 분자 생물학 기술을 사용하여 도입될 수 있다. 당업자는 하나 이상의 아미노산 돌연변이가 인간 단백질의 기능적 속성을 변화시키지 않고 도입될 수 있다는 것을 인식할 것이다.

[0081] 보존적 아미노산 치환은 인간 단백질 변종을 생산하기 위해 인간 단백질에서 이루어질 수 있다. 보존적 아미노산 치환은 하나의 아미노산의 유사한 특성을 가진 또 다른 아미노산으로의 업계 인식된 치환이다. 예를 들어, 각 아미노산은 다음 특성 중 하나 이상을 갖는 것으로 설명될 수도 있다: 양전하성, 음전하성, 지방족, 방향족, 극성, 소수성 및 친수성. 보존적 치환은 명시된 구조적 또는 기능적 특성을 가진 하나의 아미노산의 같은 특성을 가진 또 다른 아미노산으로의 치환이다. 산성 아미노산은 아스파르테이트, 글루타메이트를 포함하고; 염기성 아미노산은 히스티딘, 리신, 아르기닌을 포함하며; 지방족 아미노산은 이소류신, 류신 및 발린을 포함하고; 방향족 아미노산은 페닐알라닌, 글리신, 티로신 및 트립토판을 포함하며; 극성 아미노산은 아스파르테이트, 글루타메이트, 히스티딘, 리신, 아스파라긴, 글루타민, 아르기닌, 세린, 트레오닌 및 티로신을 포함하고; 소수성 아미노산은 알라닌, 시스테인, 페닐알라닌, 글리신, 이소류신, 류신, 메티오닌, 프롤린, 발린 및 트립토판을 포함하며; 보존적 치환은 각 군 내의 아미노산 중에서의 치환을 포함한다. 아미노산은 또한 상대적 크기에 관하여 설명될 수도 있는데, 알라닌, 시스테인, 아스파르테이트, 글리신, 아스파라긴, 프롤린, 트레오닌, 세린, 발린, 모두는 전형적으로 작은 것으로 간주된다.

[0082] 인간 변종은 합성 아미노산 유사체, 아미노산 유도체 및/또는 비-표준 아미노산을 포함할 수 있으며, 제한은 아니지만, 예시적으로 알파-아미노부티르산, 시트룰린, 카나바닌, 시아노알라닌, 디아미노부티르산, 디아미노페닐산, 디히드록시-페닐알라닌, 젠콜산, 호모아르기닌, 히드록시프롤린, 노르류신, 노르발린, 3-포스포세린, 호모세린, 5-히드록시트립토판, 1-메틸히스티딘, 메틸히스티딘, 및 오르니틴을 포함한다.

[0083] 인간 변종은 야생형 인간을 암호화하는 핵산과 높은 정도의 동일성을 가진 핵산에 의해 암호화된다. 인간 변종을 암호화하는 핵산의 보체는 높은 염증 조건 하에서 야생형 인간을 암호화하는 핵산과 특이적으로 잡종화한다.

[0084] 용어 "핵산"은 단일-가닥, 이중-가닥, 올리고뉴클레오티드 또는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 어떤 형태로도 하나 이상의 뉴클레오티드를 가진 RNA 또는 DNA 분자를 나타낸다. 용어 "뉴클레오티드 서열"은 핵산의 단일-가닥 형태의 올리고뉴클레오티드 또는 폴리뉴클레오티드에서 뉴클레오티드의 배치를 나타낸다.

[0085] 인간 변종을 암호화하는 핵산은 잘 알려진 방법을 사용하여 재조합에 의해 또는 합성에 의해 분리되거나 생성될 수 있다.

[0086] 인간 조혈성 세포의 분리, 인간 조혈성 세포의 숙주 동물로의 투여 및 이것들의 이식을 평가하는 방법이 업계에

잘 알려져 있다. 숙주 동물에 투여되는 조혈성 세포는 제한은 아니지만, 제대혈, 골수, 말초 혈액, 시토킨 또는 화학 요법-동원된 말초 혈액 및 태아 간과 같은 조혈성 세포를 함유하는 어떤 조직으로부터 얻을 수도 있다. 조혈성 세포는 제한은 아니지만, 정맥 내, 간장 내, 복장 내, 대퇴부 내 및/또는 경골 내와 같은 다양한 경로를 통한 투여에 의해 새로 태어난 또는 성체 동물로 투여될 수 있다.

[0087] 본 발명의 유전적으로 변형된 동물에서 인간 조혈성 세포의 이식은 인간 조혈성 세포가 조혈성 세포의 투여 후 하나 이상의 시점에서 투여되는 동물에서, 제한은 아니지만, 세포의 유동 세포 분석과 같은 다양한 방법 중 어떤 것에 의해서도 평가될 수 있다.

[0088] 인간 조혈성 세포를 분리하고, 숙주 동물에게 인간 조혈성 세포를 투여하고, 숙주 동물에서 인간 조혈성 세포의 이식을 평가하는 예시적 방법은 본원에서 및 Pearson et al. (2008, *Curr. Protoc. Immunol.* 81:1-15), Ito et al. (2002, *Blood* 100:3175-3182), Traggiai et al. (2004, *Science* 304: 104-107), Ishikawa et al. (2005, *Blood* 106: 1565-1573), Shultz et al. (2005, *J. Immunol.* 174:6477-6489) 및 Holyoake et al. (1999, *Exp Hematol.* 27: 1418-27)에서 설명된다.

[0089] 본 발명의 일부 구체예에서, 인간 조혈성 세포는 특정 조혈성 세포 집단 (예를 들어, HSC, HSPC, LIC, CD34+, CD34-, 계통 특이적 마커, 등)이 풍부한 세포의 집단을 얻기 위해서 원래의 공급 재료로부터 분리된다. 분리된 조혈성 세포는 순수한 집단이거나 아닐 수도 있다. 한 구체예에서, 본 발명의 조성물 및 방법에서 유용한 조혈성 세포는 CD34와 같은 특정 마커를 가진 세포가 고갈된다. 또 다른 구체예에서, 본 발명의 조성물 및 방법에서 유용한 조혈성 세포는 CD34와 같은 마커에 대한 선택에 의해 풍부해진다. 일부 구체예에서, 본 발명의 조성물 및 방법에서 유용한 조혈성 세포는 CD34+ 세포가 세포 중 약 1-100%를 구성하는 세포의 집단이지만, 특정 구체예에서는, CD34+ 세포가 총 세포 중 1% 미만을 구성하는 세포의 집단이 또한 사용될 수 있다. 특정 구체예에서, 본 발명의 조성물 및 방법에서 유용한 조혈성 세포는 CD34+ 세포가 총 세포 중 약 1-3%를 구성하는 세포의 T 세포-고갈 집단, CD34+ 세포가 총 세포 중 약 50%를 구성하는 세포의 계통-고갈 집단, 또는 CD34+ 세포가 총 세포 중 약 90%를 구성하는 세포의 CD34+ 양성 선택된 집단이다.

[0090] 투여된 조혈성 세포의 수는 적어도 하나의 인간 유전자를 발현하는 유전적으로 변형된 비-인간 동물에서 인간 조혈성 및/또는 면역 시스템의 발생에 관하여 제한하는 것으로 간주되지 않는다. 따라서, 비-제한 예로서, 투여된 조혈성 세포의 수는 약 1×10^3 내지 약 1×10^7 의 범위에 있을 수 있지만, 다양한 구체예에서는, 그 이상 또는 이하가 사용될 수도 있다. 또 다른 비-제한 예로서, 투여된 HSPC의 수는, 수령체가 마우스일 때, 약 3×10^3 내지 약 1×10^6 CD34+ 세포의 범위에 있을 수 있지만, 다양한 구체예에서, 그 이상 또는 이하가 사용될 수도 있다. 수령체의 다른 종에 대하여, 투여되어야 하는 세포의 수는 단지 일상적인 실험을 사용하여 결정될 수 있다.

[0091] 일반적으로, 이식은 투여된 인간 조혈성 세포의 수명을 넘어선 시점에, 유전적으로 변형된 비-인간 동물에 존재하는 인간 조혈성 세포의 수 (또는 퍼센트)가 비-인간 동물에게 투여된 인간 세포의 수 (또는 퍼센트)보다 더 클 때 성공적인 것으로 간주될 수 있다. 투여된 조혈성 세포의 자손의 검출은, 예를 들어, 수령체 동물에서 인간 DNA의 검출에 의해, 또는 온전한 인간 조혈성 세포의 검출에 의해, 예를 들어, CD45와 같은 인간 세포 표면 마커의 검출에 의해 달성될 수 있다. 인간 조혈성 세포의 제1 수령체에서 제2 수령체로의 단계 전이, 및 제2 수령체에서 인간 조혈성 세포의 이식은 1차 수령체에서 이식의 추가 선택적 테스트이다. 이식은 인간 조혈성 세포의 투여 후 1-4개월에 혈액, 비장 또는 골수에서 유동 세포 분석에 의해 0.05% 또는 그 이상의 인간 CD45+ 세포로서 검출될 수 있다. 시토킨 (예를 들어, GM-CSF)은 줄기 세포를 동원하기 위해 사용될 수 있으며, 예를 들어, Watanabe (1997, *Bone Marrow Transplantation* 19:1175-1181)에서 설명된 바와 같다.

[0092] 실시예

[0093] 본 발명은 다음 실시예를 참조하여 더 상세히 설명된다. 이 실시예들은 예시의 목적을 위해서만 제공되며, 달리 명시되지 않으면 제한하려는 것은 아니다. 따라서, 본 발명은 결코 다음 실시예에 제한되는 것으로 해석되는 것이 아니라, 본원에서 제공된 교시 내용의 결과로서 분명해지는 어떤 차이도 포함하는 것으로 해석되어야 한다.

[0094] 추가의 설명 없이, 당업자들은 상기 설명 및 다음 예시적 실시예를 사용하여, 본 발명의 화합물을 만들고 활용하며 청구된 방법을 실행할 수 있다고 생각된다. 그러므로 다음 작용하는 실시예는 특이적으로 본 발명의 바람직한 구체예를 언급하였고, 어떤 방법으로도 본 개시의 나머지를 제한하는 것으로 해석되어서는 안된다.

[0095] 실시예 1: 인간-혈액-림프구 시스템 마우스에서 기능적인 선천적 면역 반응 및 고체 종양 지지물

[0096] 본원에서 설명된 바와 같이, 인간 혈액-림프구 시스템 (HHLS)으로 다시 채워진 마우스는 예측성 인간 전임상 생

체 내 연구를 위한 강력한 도구를 나타낸다. 현재 HHLS 마우스의 가장 큰 한계는 선천적 면역력에 중요한 인간 세포의 결합 있는 발달이다. 여기에서, 시토킨을 암호화하는 다수의 유전자로 유전적으로 인간화된 새로운 마우스 계통이 보고되었다. 이 인간화된 시토킨들은 인간 혈액 생성 및 인간 단핵구/대식세포 및 NK 세포의 발달 및 기능을 효과적으로 지지하기 위해 시너지 작용한다. 종양 미세 환경에서, 인간 대식세포는 면역 억제성 표현형을 획득하고 인간 암의 성장을 지지한다. 더 완전하고 기능적인 인간 선천적 면역 시스템과 함께, HHLS 마우스의 이 새로운 모델은 생체 내 인간 선천적 면역력의 생리학 및 병리학 연구를 용이하게 하는 탁월한 잠재력을 갖고 있다.

[0097] 단핵구 및 대식세포는 선천적 면역 반응의 주요한 세포 구성요소이다 (Auffray et al, 2009, Annual review of immunology 27, 669). 한편으로는, 이 세포들은 식균 작용 또는 전염증성 인자의 분비와 같은 다양한 메커니즘에 의해 감염을 감지할 수 있고 직접적 항균 기능을 매개할 수 있다. 다른 한편으로는, 단핵구/대식세포는 염증의 해결 및 조직 수리에 중요한 면역 억제 기능을 획득할 수 있다. 게다가, 이 항-염증 속성들은 종양-침투 대식세포에 의해 공통-선택될 수 있고 다양한 메커니즘을 통해 진화하는 종양에게 생존적 이점을 제공할 수 있다 (Allavena and Mantovani, 2012, Clinical and experimental immunology 167, 195; Qian and Pollard, 2010, Cell 141, 39).

[0098] 마우스와 같은 소동물 모델은 생체 내 면역 반응을 연구하기 위해 흔히 사용된다. 하지만, 면역 기능의 근본적인 차이점이 종 사이에 존재한다 (Mestas and Hughes, 2004, Journal of Immunology 172, 2731; Rongvaux et al., 2013, Annual review of immunology 31, 635). 특히, 주요한 표현형 및 기능적 종-특이적 차이가 단핵구/대식세포 집단 사이에 존재하고 일반적으로, 마우스 연구로부터 얻은 지식은 단지 부분적으로만 인간에게 적용 가능하다 (Auffray et al., 2009, Annual review of immunology 27, 669; Rongvaux et al, 2013, Annual review of immunology 31, 635; Chow et al., 2011, Nature reviews Immunology 11, 788). 인간 조혈성의 특이성 및 생체 내 면역 기능을 연구하기 위한 하나의 유망한 접근법은 인간 혈액-림프구 시스템 (HHLS)을 가지고 있는 마우스의 사용으로 구성된다 (Rongvaux et al, 2013, Annual review of immunology 31, 635; Shultz et al, 2012, Nature reviews Immunology 12, 786). 하지만, 단핵구/대식세포 및 NK 세포와 같은 여러 인간 면역 세포 타입의 발달 및 기능은 현재 HHLS 마우스에서는 대부분 결함이 있다 (Rongvaux et al, 2013, Annual review of immunology 31, 635). 이 결함은 해당하는 인간 수용체에서 마우스 시토킨의 감소된 교차-반응성으로 인한 것일 가능성이 가장 크다 (Manz, 2007, Immunity 26, 537). 이 한계를 피하기 위해, 시토킨을 암호화하는 마우스 유전자를 인간 대응물에 의해 대체하기 위한 전략을 개발하였고 (Willinger et al, 2011, Trends in immunology 32, 321) 이 접근법은 개개의 인간 세포 타입의 발달 및 기능의 큰 개선을 일으켰다 (도 16) (Rathinam et al, 2011, Blood 118, 3119; Willinger et al, 2011, Proceedings of the National Academy of Sciences 108, 2390; Rongvaux et al, 2011, Proceedings of the National Academy of Sciences 108, 2378).

[0099] 혈액 생성은 다분화능 조혈모세포가 더 많은 수임된 전구세포(committed progenitor)로 및 그 다음에 성숙한 혈액 세포로 분화하는 엄격하게 조절되는 발달 과정이다 (Kondo et al, 2003, Annual review of immunology 21, 759; Doulatov et al, 2012, Cell stem cell 10, 120). 이 과정은 연속적인 발달 단계를 지지하는 특이적 시토킨을 필요로 한다 (도 5). 아마도 다수의 인간화된 시토킨 사이의 시너지가 마우스에서의 인간 골수 발생 (myelopoiesis)을 충분히 반복하는데 필요할 것이다. 따라서, MISTRG로 명명된 새로운 마우스 계통을 발생시켰는데 M-CSF (Rathinam et al, 2011, Blood 118, 3119), IL-3/GM-CSF (Willinger et al, 2011, Proceedings of the National Academy of Sciences 108, 2390) 및 TPO (Rongvaux et al, 2011, Proceedings of the National Academy of Sciences 108, 2378)를 암호화하는 유전자를 hSIRPAtg RAG2/- IL-2R γ /- 배경의 인간 대응물 (Willinger et al, 2011, Trends in immunology 32, 321)로 대체하였다 (Traggiai et al, 2004, Science 304, 104; Strowig et al, 2011, Proceedings of the National Academy of Sciences 108, 13218).

[0100] 새로 태어난 MISTRG 마우스 및 그것들의 한 배 새끼 MITRG (hSIRPA 이식 유전자 없음)를, 표준 프로토콜에 따라, 아치사하도록 조사하였다 (Traggiai et al, 2004, Science 304, 104). 같은 유전적 배경을 공유하지만 모든 인간화된 대립유전자가 결핍된 RAG2/- IL2-R γ /- (RG) 마우스, 및 상업적으로 이용 가능한 NOD-Scid IL2-R γ /- (NSG) 마우스는 대조군의 역할을 하였다. 혈액 이식 수준 (hCD45+ 세포 퍼센트; (도 1A 및 1B; 및 도 6A))은 이전에 보고된 바와 같이 RG에서 더 낮았고 NSG 수령체에서 더 높았다 (Strowig et al, 2011, Proceedings of the National Academy of Sciences 108, 13218; Brehm et al, 2010, Clinical immunology 135, 84). 혈액 hCD45+ 세포의 퍼센트는 MISTRG 및 NSG에서 유사하였다. 혈액 이식은 또한 RG와 비교하여 MITRG에서 크게 증가하였는데, 유전자의 조합된 인간화가, 아마도 마우스 선천적 반응을 약화시킴으로써, SIRP α /CD47 교차-반응성을 통해 식세포 내성을 유발할 필요성을 극복한다는 것을 제안한다 (Strowig et al, 2011,

Proceedings of the National Academy of Sciences 108, 13218; Takenaka et al, 2007, Nature immunology 8, 1313; Legrand et al, 2011, Proceedings of the National Academy of Sciences 108, 13224). 혈액에서 적어도 10% 인간 CD45+ 세포를 가진 마우스를 추가의 실험을 위해 선택하였다 (도 6B). 골수 (BM)에서, hCD45+ 세포의 퍼센트는 MISTRG 수령체 둘 다의 대부분에서 90%를 초과하였고 최대 99%에 도달하였으며 (도 1A 및 1C; 및 도 6C 내지 6E), BM에서 고효율의 이식은 SIRP α /CD47 상호작용과 독립적이다. 더 경쟁적 질병에서 인간 혈액 생성을 지지하는 인간화된 시토킨의 능력을 테스트하기 위해, 인간 CD34+ 세포를 비-조사된 MISTRG로 이식하였다. 이 프로토콜은 모든 수령체의 혈액 및 BM에서 인간 CD45+ 세포를 발생시켰고 (도 1D 및 1E) 놀랍게도, 마우스의 절반은 X-선에 미리 길들여진 후 이식된 수령체에서 측정된 가장 높은 수준만큼 높은 키메라 현상을 나타냈다 (도 1E와 도 1B 및 1C를 비교). 본원에서 설명된 데이터는 MISTRG에서 다수의 시토킨의 유전적 대체가 골수에서 마우스 혈액 생성을 거의 완벽하게 대체할 수 있는 미세 환경을 생성한다는 것을 나타내고, 병리학-유발 조사에 대한 필요성을 제거한다.

[0101] 그 다음에, 인간 골수 발생을 지지하는 MISTRG 마우스의 능력을 평가하였다. 인간 골수 세포 (hCD33+)는 RG 및 NSG와 비교하여 MESTRG의 혈액 및 골수에서 상당히 더 높은 비율로 존재하였다 (도 2A; 및 도 7A 내지 7C). MISTRG에서 증가된 비율의 골수 세포는 인간 혈액의 생리학적 조성물과 유사한 혈액 조성물을 발생시켰는데, 이것은 골수 세포가 풍부하고 근본적으로 림프-풍부 마우스 혈액의 그것과는 다르다 (Mestas and Hughes, 2004, Journal of Immunology 172, 2731; Rongvaux et al, 2013, Annual review of immunology 31, 6354) (도 2B; 및 도 7D). 단핵구 (CD33hiSSC1loCD66-) 및 과립구 (CD33+SSChiCD66+) 둘 다가 BM에 존재하는 한편 (도 7E), 말초 혈액에서 인간 골수 세포 집단은 대부분 단핵구로 구성되었는데 (도 7F), BM으로부터 말기 분화 및 탈출 (egress) 또는 인간 과립구의 말초 생존율은 이 마우스 환경에서 여전히 차선이라는 것을 제안한다. 하지만, 중요하게는, 인간 골수 세포는 면역 조직 화학법 (hCD68+ 세포); (도 2C) 또는 유동 세포 분석법 (hCD33+); (도 7G 및 7H)에 의해 나타난 바와 같이 폐, 간 및 결장과 같은 비-림프 조직에서 많은 수로 존재하였고, 크게 초과한 인간 골수 세포 수가 NSG 마우스에서 ~10배 만큼 발견되었다.

[0102] 인간에서, 단핵구의 세 개의 서브세트는 표현형으로 및 기능적으로 설명되었으며, CD14 및 CD16 마커의 발현을 기반으로 한다 (Auffray et al, 2009, Annual review of immunology 27, 669; Cros et al, 2010, Immunity 33, 375). 인간 단핵구의 모두 세 개의 부분집단 (CD14+CD16-, CD14+CD16+ 및 CD14dimCD16+)은 MISTRG의 림프 조직 및 폐 및 간과 같은 비-림프 조직에 존재하였다 (도 2D 및 2E; 및 도 8A 및 8B). NSG와 달리, 골수 세포의 더 낮은 빈도 이외에, CD14+CD16- 및 어느 정도로는 CD14+CD16+ 단핵구가 일정하게 검출될 수 있는 한편, CD14dimCD16+ 세포는 단지 미미하게 나타났다. MISTRG에서 발견된 단핵구 부분집합의 연장된 면역표현형 (CD33, CD11b, CD115, CD62L 및 CX3CR1)을 인간 말초 혈액에서 동등한 서브세트와 밀접하게 비교하였다 (도 9). MITRG의 BM으로부터 분리된 인간 CD14+CD16- 및 CD14+CD16+ 단핵구는 TLR4 및 TLR7/8 리간드에 반응하여 높은 수준의 염증성 시토킨을 생산한다 (각각 LPS 및 R848) (도 2F 및 2G). MITRG의 WBC에서 수행된 시험관 내 검정에서, CD14+CD16- 및 CD14+CD16+ 세포 둘 다는 GFP-발현 대장균 (*E. coli*)을 식균하는 높은 능력을 갖는 한편, CD14dimCD16+ 단핵구는 제한된 식세포 능력을 갖는데 (도 2H), 다시 인간 혈액에서 해당하는 부분집단의 생리학적 속성을 반영한다 (Cros et al, 2010, Immunity 33, 375). 생체 내에서 LPS로 시도될 때 또는 각각 박테리아성 및 바이러스성 인간 병원체 리스테리아 모노사이토제네스 및 인플루엔자 A로 감염될 때, MISTRG 마우스는 인간 염증성 시토킨 (각각 TNF α , IL-6 및 IFN γ)의 왕성한 생산에 반응하는 한편, NSG 마우스는 상당히 더 낮은, 약 1 로그 더 낮은 반응을 나타냈다 (도 2I 내지 2K). 이 결과들은 MISTRG에서 발달하는 인간 단핵구 서브세트가 시험관 내 및 생체 내에서 기능적이라는 것을 입증한다. 하지만, 마우스에서 기능적 인간 식세포의 존재의 문제점은 인간-대-마우스 식세포 내성의 파손이며, 마우스 RBC가 특히 민감하다 (도 10A 및 10B). 마우스 RBC의 이 파괴는 빈혈증을 일으켰고 (도 10C 내지 10I) 이식된 마우스의 수명을 10-12주 (MISTRG) 또는 12-16주 (MITRG)로 제한하였다.

[0103] 골수 세포는 시토킨의 생산을 통해 다른 면역 세포의 발달 및 분화를 지지할 수 있다. MISTRG 마우스의 골수 구획이 IL-15와 같은 인간 시토킨의 공급원인지를 평가하였다. 이 개념과 일치하게, 인간 IL-15 및 IL-15R α 의 mRNA 발현이 NSG와 비교하여 MISTRG에서 10보다 더 큰 인자에 의해 증가된다는 것을 발견하였다 (도 3A; 및 도 11A). MISTRG에서 인간 IL-15/IL-15R α 의 세포 공급원을 더 상세히 한정하기 위해서, 정제된 세포 집단에서 인간 IL-15 및 IL-15R α 전사물의 풍부함을 측정하였다. 인간 IL-15R α mRNA의 발현은 비-골수 세포 (hCD33-)보다 인간 골수 세포 (hCD33+)에서 더 높았다 (도 3B). 특히, CD14+CD16+ 단핵구는 IL-15 및 IL-15R α 전사물 둘 다의 풍부함을 나타냈다 (도 3B). MISTRG의 인간 골수 세포의 표면에서 인간 IL-15R α 단백질의 발현을 유동 세포 분석법에 의해 확인하였다 (도 11B).

[0104]

이 발견에 기초하여, MISTRG 마우스가 NK 세포와 같이, IL-15 트랜스(trans)-표현에 의존적인 인간 면역 세포의 발달을 지지하는지 (Ma et al, 2006, Annual review of immunology 24, 657; Soderquest et al, 2011, Blood 117, 4511)를 평가하였다. 현재 HHLS 마우스 모델에서 인간 NK 세포의 효율적인 발달은 인간 IL-15/IL-15R α 의 외인성 약학적 전달을 필요로 하는데 (Huntington et al, 2009, Journal of experimental medicine 206, 25; Chen et al, 2009, Proceedings of the National Academy of Sciences 106, 21783; Pek et al, 2011, Immunobiology 216, 218)23-25) 마우스 IL-15가 생체 내 인간 NK 세포를 지지하는데 충분하지 않기 때문이다. 이전에 보고된 바와 같이 (Huntington et al, 2009, Journal of experimental medicine 206, 25; Chen et al., 2009, Proceedings of the National Academy of Sciences 106, 21783; Pek et al, 2011, Immunobiology 216, 218), 극소수의 인간 NK 세포 (hNKp46+hCD3-)를 이식된 NSG에서 관찰하였다 (도 3C 및 3D; 및 도 12A 및 12B). 반대로, 인간 NK 세포를 이식된 MISTRG의 다수의 조직에서 쉽게 검출하였고 NSG와 비교하여 ~10배 만큼 증가하였다 (도 3C 및 3D; 및 도 12A 및 12B). 골수 외에, MITRG는 MISTRG보다 더 적은 인간 NK 세포를 갖고 있었는데, 이것은 말초에서 인간 NK 세포의 생존을 위해 인간 SIRP α 에 대하여 이전에 보고된 필요조건으로 인한 것일 가능성이 가장 크다 (LeGrand et al, 2011, Proceedings of the National Academy of Sciences 108, 13224). MISTRG 마우스에서 hNKp46+hCD3- 세포는 진짜의 NK 세포를 나타냈는데 그것들이 전형적인 NK 세포 표면 마커 CD94, CD161, 및 인간 대조군을 면밀하게 모방하는 사멸 억제 수용체 (KIR)를 발현하기 때문이다 (도 12A 및 12B). 발달에 대한 노력 이외에, IL-15는 또한 NK 세포의 성숙화를 촉진한다. 꾸준히, 성숙화 마커 CD16의 표면 발현 및 용해 미립 단백질 퍼포린의 양은 NSG와 비교하여 MISTRG의 NK 세포에서 더 높다는 것이 발견되었다 (도 13C 내지 13F).

[0105]

인간의 생체 내에서 IL-15 트랜스-표현의 세포 공급원은 현재 알려져 있지 않지만, 인간 골수 세포는 시험관 내 인간 NK 세포 증식을 지지할 수 있다 (Huntington et al, 2009, Journal of experimental medicine 206, 25). 인간 단핵구/대식세포에 의한 인간 IL-15의 트랜스-표현이 MISTRG에서 개선된 인간 NK 세포 발달의 기초가 되는지 테스트하기 위해, 마우스에 리포솜-캡슐화된 클로드로네이트를 처리하여 식세포를 고갈시켰다 (도 14). 식세포의 고갈은 또한 인간 NK 세포의 상당한 감소를 유발하였는데 (도 3E), 인간 단핵구/대식세포는 생체 내 인간 NK 세포 항상성을 지지하기 위해 IL-15를 트랜스-표현하는 매우 중요한 세포 타입이라는 것을 제안한다.

[0106]

NK 세포는 MHC 등급 I의 발현이 없는 세포를 사멸시킴으로써 (자가 상실(missing-self)) (Raulet, 2006, Seminars in immunology 18, 145), 및 주요 시토킨 IFN γ 를 생산함으로써 (Vivier et al, 2008, Nature immunology 9, 503) 병원체에 대한 선천적 반응에 관여한다. 더 높은 퍼포린 발현과 일치하게 (도 13E 및 13F), MHC 등급 I가 없는 인간 세포에 대하여 크게 향상된 NK 세포 독성 활성을 NSG와 비교하여 MISTRG의 생체내에서 관찰하였다 (도 3F). NK 세포는 리스테리아 감염 후 IFN γ 의 초기 공급원이다. 따라서, 인간 IFN γ mRNA 발현은 간에서 감염 후 2일에 NSG에서보다 MISTRG에서 10배 이상 더 높다는 것을 발견하였다 (도 3G). 단일 세포 해상도에서, 리스테리아-감염된 MISTRG의 NK 세포는 생체 외 재자극 없이 인간 IFN γ 의 생산을 나타냈는데 (도 3H), NSG에서보다 상당히 더 높은 빈도였다 (도 3I). MISTRG의 NK 세포는 또한 리스테리아 감염 후 용해 활성 (탈파립)을 가지며, CD107a의 원형질막 노출에 의해 나타난 바와 같다 (도 3H). 전반적으로, MISTRG는 인간 골수 세포의 효율적인 생산을 통해 인간 NK 세포의 발달, 분화, 및 기능을 지지하고, 이로 인해 현재 HHLS 마우스 모델의 하나의 주요한 한계를 극복한다.

[0107]

그 다음에, 종양 미세 환경의 맥락에서 인간 골수 세포의 역할을 평가하였다. 그러므로, 인간 흑색종 세포주 Me290을 종양 모델로서 사용하였다 (Valmori et al, 1998, Journal of immunology 160, 1750). 임상적 관찰은 골수 세포가 여러 고체 종양의 종양에 침투하고, 침투하는 대식세포의 높은 밀도는 암의 대부분의 타입에서 불량한 환자 예후와 연관성이 있다는 것을 나타낸다 (Qian and Pollard, 2010, Cell 141, 39; Coussens et al, Science 339, 286; Egeblad et al, 2010, Developmental cell 18, 884; Nelson and Bissell, 2006, Annual review of cell and developmental biology 22, 287; Bingle et al, 2002, T Journal of pathology 196, 254). 따라서, 더 높은 인간 골수 세포 침투를 NSG보다 MISTRG의 종양에서 검출하였으며, 인간 PTPRC 및 ITGAM mRNA (각각 CD45 및 CD11b를 암호화함)의 발현에 의해 나타난 바와 같다 (도 4A). 환자의 매우 유사한 인간 종양, 대식세포 마커 CD163 및 CD14를 발현하는 세포는 MISTRG의 종양에서 풍부했지만, NSG의 같은 종양에서는 검출이 거의 불가능했다 (도 4B 및 4C; 및 도 15). CD 163+ 세포 대부분은 또한 낮은 수준의 HLA-DR 및 높은 수준의 CD206을 발현하였는데 (도 4B 및 4D), 면역표현형은 일반적으로 "M2-유사" 대식세포에 관한 것이다 (Hao et al, 2012, Clinical & developmental immunology 2012, 948098; Tang, 2013, Cancer Lett 332, 3).

[0108]

대식세포의 M2 서브타입은 다양한 작용기 메커니즘을 통해 종양 진행을 촉진하며, 암 세포에 대한 증식 신호, 항-세포 사멸 신호, 혈관 형성 후 활성, 1차 종양으로부터 암 세포 탈출을 가능하게 함 및 전이의 형성을 포함

한다 (Qian and Pollard, 2010, Cell 141, 39; Coussens et al, Science 339, 286; Egeblad et al, 2010, Developmental cell 18, 884). 종양에서 대식세포 침투가 MASTRG에서 종양 성장을 촉진할 수 있는지를 평가하였다. 놀랍게도, 인간 CD163+ HLA-DRlowCD206+ 대식세포에 의해 많이 침투되는 CD34+-이식된 MISTRG에서 종양의 크기가 인간 대식세포에 의해 침투되지 않고 비-이식된 NSG 또는 MISTRG 마우스에서 보이는 같은 작은 크기인 NSG의 종양보다 훨씬 더 크다는 것을 관찰하였다 (도 4E 및 4F). 대식세포가 종양 성장을 지지하는 메커니즘 중 하나는 시토킨 또는 혈관화 및 면역 억제를 촉진하는 효소의 생산을 통하는 것이다. VEGF는 중요한 다기능성 종양-지지 분자이고 (Kandalaft et al, Current topics in microbiology and immunology 344, 129; Motz and Coukos, Immunity 39, 61), 이 인자가 MISTRG의 종양 성장에 수반되는지 테스트하기 위해서, 마우스에 인간-VEGF 억제자 Avastin™을 처리하였다. 이 처리는 종양-성장 표현형을 완벽하게 뒤바꿨는데 (도 4F), MISTRG의 골수 세포가 VEGF-의존적 메커니즘을 통해 흑색종 성장을 지지한다는 것을 입증한다. 전반적으로, 이 결과들은 MISTRG 마우스가 종양 발달에서 인간 대식세포의 역할을 반복하고, 특히 종양 발달의 시작 시, 생체 내 인간 종양 및 인간 대식세포 사이의 상호작용의 연구를 허용하는 모델에 대한 중요한 필요성을 충족시켜준다는 것을 나타낸다.

[0109] 본원에서 설명된 데이터는 MISTRG 마우스에서 다수의 인간 시토킨의 공급이 인간 혈액 생성 및 인간 면역 세포 기능에 대한 직접적 또는 간접적 지지에 대하여 시너지 효과를 일으킨다는 것을 입증하였다 (도 16). HHLS 마우스의 MISTRG 모델은 생체 내에서 인간 선천적 면역 반응을 연구할 유일한 기회를 제공한다.

[0110] 재료 및 방법이 지금 설명된다.

마우스 계통

[0112] RAG2-/- γ_c-/- Balb/c x 129 유전적 배경에서 TPO, IL-3/GM-CSF 및 M-CSF를 암호화하는 유전자가 넉인 대체되거나 또는 인간 SIRP_α가 BAC-트랜스제닉 발현되는 마우스의 발생이 보고되었다 (Rathinam et al, 2011, Blood 118, 3119; Willinger et al, 2011, Proceedings of the National Academy of Sciences 108, 2390; Rongvaux et al, 2011, Proceedings of the National Academy of Sciences 108, 2378; Strowig et al., 2011, Proceedings of the National Academy of Sciences 108, 13218). 이 계통들을 이종교배하여 MITRG (M-CSFh/hIL-3/GM-CSFh/hTPOh/hRAG2-/- γ_c-/-) 및 MISTRG (M-CSFh/hIL-3/GM-CSFh/hhSIRPAtgTPOh/hRAG2-/- γ_c-/-) 마우스를 얻었다. 상기 마우스는 생존 가능하고, 건강하며 수정 가능하다. 마우스를 식수 (Baytril, 0.27 mg/ml) 중의 엔로플록사신의 지속적인 처리로 특정 병원체가 없는 조건 하에 유지하였다. NOD Scid γ_c-/- (NSG) 마우스를 Jackson Laboratory로부터 얻었다.

인간 HSPC 제조 및 수령체 마우스로의 이식

[0114] 수령체 마우스에 설명된 바와 같이 인간 조혈모세포 및 전구세포를 이식하였다 (Rathinam et al, 2011, Blood 118, 3119; Willinger et al, 2011, Proceedings of the National Academy of Sciences 108, 2390; Rongvaux et al, 2011, Proceedings of the National Academy of Sciences 108, 2378; Traggiai et al, 2004, Science 304, 104; Strowig et al, 2011, Proceedings of the National Academy of Sciences 108, 13218). 태아 간 샘플을 작은 단편으로 잘랐고, 콜라제나제 D (Roche, 100 ng/mL)를 37°C에서 45분 동안 처리하였으며 세포 혼탁액을 제조하였다. 인간 CD34+ 세포를 밀도 구배 원심분리 (Lymphocyte Separation Medium, MP Biomedicals)에 이은 항-인간 CD34 마이크로비드 (Miltenyi Biotec)로의 양성 면역 자기성 선택에 의해 정제하였다. 세포를 10% DMSO를 함유하는 FBS에서 얼렸고 액체 질소에서 유지하였다.

[0115] 이식을 위해서, 새로 태어난 새끼 (태어난지 처음 2일 내)를 아치사하도록 조사하였고 (X-선 조사; RG, 2 x 180 cGy 4 h 후; NSG, 1 x 100 cGy; MISTRG, 1 x 150 cGy) 20 μl의 PBS 중에 100,000개의 FL-CD34+ 세포를 22-개 이지 바늘 (Hamilton Company)로 간에 주사하였다. 특정 실험에서 (도 1D 및 1E), 200,000-300,000 세포를 비-조사된 MISTRG 새로 태어난 수령체로 주사하였다. 마우스를 7-9주 후 교배시켰고 인간 CD45+ 세포의 퍼센트를 유동 세포 분석법으로 측정하였다. 전체 (마우스 및 인간 조합됨) CD45+ 집단의 인간 CD45+ 세포가 적어도 5% (RG) 또는 10% (NSG, MITRG 및 MISTRG)에 해당하는 마우스를 추가의 실험을 위해 선택하였다. 마우스를 이식 후 9-12주에 죽이거나 또는 실험에 사용하였다.

[0116] 모든 실험을 Yale University Human Investigation Committee 및 예일 Yale Institutional Animal Care and Use Committee 프로토콜에 따라 수행하였다.

인간 세포 집단의 면역의 면역 표현형 분석

- [0118] WBC를 제조하기 위해서, 혈액에 ACK 용해 버퍼를 두 번 처리하여 RBC를 제거하였다. 비장 및 골수의 단일 세포 혼탁액 (대퇴골 및 경골로부터 플러싱(flush))에 ACK 용해 버퍼를 처리하였다. 간 및 폐 백혈구를 조직을 기계적으로 해리시키고 37°C에서 1시간 동안 100 U/ml 콜라제 IV 및 0.02 mg/ml DNase I (Sigma)으로 분해한 후, 이어서 밀도 구배 원심분리에 의해 분리하였다.
- [0119] FACS 분석을 위해서, 다음 항원에 대한 항체를 사용하였다:
- [0120] 마우스 항원: CD45 (클론 30-F11), CD71 (RI7217), Ter119
- [0121] 인간 항원: CD1c (BDCA1, 클론 L161), CD3 (UCHT1), CD11b (ICRF44), CD11c (3.9), CD14 (M5E2), CD16 (3G8), CD19 (HIB 19), CD33 (WM53), CD45 (HI30), CD62L (DREG-56), CD66 (ASL-32), CD94 (DX22), CD107a (H4A3), CD115 (9-4D2-1E4), CD123 (6H6), CD141 (BDCA3, M80), CD161 (HP-3G10), CD235a (HI264), CD303 (BDCA2, 201A), NKp46 (9E2), IL-15R α (JM7A4), CX3CR1 (2A9-1), HLA-A,B,C (W6/32), HLA-DR (L243), IFN γ (B27) KIR2DL1/S1 (HP-MA4), KIR2DL2/L3 (DX27), KIR3DL1 (DX9), 페포린 (dG9).
- [0122] 인간 계통 칵테일: CD3, CD15, CD19, CD56, NKp46
- [0123] 모든 항체를 Biolegend, BD Biosciences 또는 Miltenyi Biotec로부터 얻었다. 데이터를 LSRII 유동 세포 분석기 (BD Biosciences)에서 FACSDiva로 얻었고 Flow Jo 소프트웨어로 분석하였다.
- [0124] 조직학적 분석을 위해, 비장, 폐, 간 및 결장 조직을 IHC 아연 고정액 (BD Biosciences) 또는 4% 파라포름알데히드에서 하룻밤 동안 고정하였고 파라핀에서 임베딩하였다(embed). 절편을 혈마록실린 및 에오신으로, 또는 항-인간 CD68 항체 (클론 PGM1)으로 염색한 후, 이어서 HRP-컨쥬제이션된 2차 항체로 염색하였고 페옥시다제 기질 3, 3'-디아미노벤자린으로 드러냈다.
- [0125] 시험관 내 식균작용 검정
- [0126] GFP를 발현하는 대장균을 LB 배지에서 37°C에서 하룻밤 동안 1.5-1.8의 OD600으로 키웠으며, 이 시점에서 박테리아를 회석하고 대략 1.0의 OD600으로 1-2시간 동안 키웠다. 대장균을 PBS로 세 번 세척하였고 200 μ l의 부피로 37°C에서 4시간 동안 MITRG 마우스의 WBC와 함께 배양하였으며, 1×10^7 WBC 당 약 2×10^8 대장균이다. 배양 후, 세포를 PBS로 세척하였고 유동 세포 분석법에 의해 분석하였다.
- [0127] 시험관 내 TLR 자극 및 생체 내 감염
- [0128] 인간 단핵구 서브세트를 마우스의 BM으로부터 분리하였다. 간략히 말하면, BM 세포를 회수하였고 여섯 마리의 마우스의 뒷다리 및 척추로부터 모았다. 인간 CD33+ 세포는 자기적 분리에 의해 풍부해졌다 (EasySep CD33 선택 키트, StemCell Technologies). CD14+CD16- 및 CD14+CD16+ 서브세트를 FACSaria 세포 분류기 (BD Biosciences)에서 정제하였다. 200 μ l 배지에서 100,000 세포를 TLR4 리간드 LPS (대장균 0111:B4, Sigma-Aldrich, 100 ng/ml) 또는 TLR7/8 리간드 R848 (Invivogen, 10 μ g/ml)의 존재시 하룻밤 동안 배양하였다.
- [0129] 생체 내 자극을 위해서, 100 μ l PBS 중의 35 μ g의 LPS (대장균 0111:B4, Sigma-Aldrich)를 복강 내로 주사하였고 혈청을 90분 후에 수거하였다.
- [0130] 마우스에 정맥 내 주사에 의해 리스테리아 모노사이토제네스 (계통 10403S)의 3×10^3 콜로니-형성 유닛(CFU)을 주사하였다. 감염 후 48시간에, 혈청 및 조직을 각각 ELISA 및 qPCR을 위해 수확하였다. 감염되지 않은 또는 감염된 마우스의 간 림프구를 37°C 5% CO₂에서 4시간 동안 모넨신 (GolgiStop, BD Biosciences) 및 항-인간 CD107a 항체를 함유하는 배지에서 배양하였다. 세포를 그 다음에 표면 항원으로 염색하였고, Cytofix/Cytoperm 키트 (BD Biosciences)를 사용하여 투과시켰고, 세포 내 인간 IFN γ 에 대하여 염색하였다.
- [0131] 마우스를 2×10^4 PFU의 인플루엔자 A/PR8 (H1N1) 바이러스로 비강 내로 감염시켰고, 폐를 qPCR 분석을 위해 감염 후 3일에 수확하였다.
- [0132] 마우스 혈청 및 배양물 상층액에서 시토킨 농도 (인간 TNF α , IL-6 및 IL-1 β)를 제조사의 지시에 따라 ELISA MAX Standard 키트 (Biolegend)를 사용하여 측정하였다.
- [0133] RBC 분석
- [0134] RBC 수를 Hemavet 950 (Drew Scientific)에서 측정하였다. 혈액 도말 표본을 Wright-Giemsa로 염색하였다. 마우스 RBC 이동 실험을 위해서, 혈액을 RG 마우스로부터 얻었고, CFSE로 표지하였으며 (20 μ M, 37°C에서 15분),

PBS로 세 번 세척하였고 200 μ l의 표지된 RBC를 레트로-오비탈(retro-orbital) 정맥 내 주사에 의해 주사하였다. 마우스를 유동 세포 분석법에 의해 Ter119+ 세포 중에서 CFSE-양성 세포의 초기 빈도 (제0 일, 100%)를 결정하기 위해 5분 후에 채혈하였다. 그것들을 지시된 시점에 채혈하였고 CFSE-표지된 Ter119+ 세포의 유지를 제0 일 값의 퍼센트로서 계산하였다.

[0135] 생체 내 식세포의 고갈

[0136] 식세포를 클로드로네이트-로딩된 리포솜 100 μ l의 정맥 내 레트로-오비탈 주사에 의해 고갈시켰다 (Van Rooijen and Sanders, 1994, Journal of immunological methods 174, 83). 클로드로네이트-리포솜을 매일 세 번 주사하였고 마우스 간에서 인간 NK 세포를 최종 주사 후 24시간에 분석하였다. RBC 식균작용 검정을 위해서, 클로드로네이트-리포솜을 CFSE-표지된 RBC의 이동 전 제3 일 및 제1 일에 주사하였다.

[0137] 정량적 RT-PCR

[0138] 총 RNA를 제조사의 지시에 따라 TRIzol 시약 (Invitrogen)으로 조직 또는 정제된 세포로부터 추출하였고 Superscript First-Strand Synthesis System (Invitrogen)과 함께 cDNA 합성에 사용하였다.

[0139] 정량적 RT-PCR을 7500 Fast Real-Time PCR 시스템에서 ABI로부터 구입한 프라이머-프로브 세트로 수행하였다. 발현 값을 비교 역치 주기 방법(comparative threshold cycle method)을 사용하여 계산하였고 마우스 Hprt 또는 인간 HPRT로 표준화하였으며, 지시된 바와 같다.

[0140] 생체 내 NK 세포 독성 검정

[0141] 생체 내 인간 NK 세포 독성을 이전에 보고된 프로토콜에 따라 결정하였고 (Strowig et al., 2010, Blood 1 16, 4158). LCL721.221 (HLA class I negative) LCL721.45 (등급 I 양성) 세포를 1:1 비율로 혼합하였으며 CellTrace Violet (Invitrogen)으로 표지하였고 이식된 NSG 또는 MISTRG 마우스에 정맥 내 주사하였다 (1×10^7 세포/마우스). 마우스를 12시간 후에 죽여서 비장의 단일 세포 혼탁액을 제조하였고 유동 세포 분석법에 의해 분석하였다. 보라색 세포 중에서 HLA 등급 I 양성 및 음성의 비를 측정하였고 특이적 용해를 (MHC 등급 I 양성 - MHC 등급 I 음성) $\times 100$ / MHC 등급 I 양성으로 계산하였다.

[0142] 종양 형성(Tumorigenesis)

[0143] 인간 흑색종 세포주 Me290 (Valmori et al, 1998, Journal of immunology 160, 1750)을 ~90% 컨플루언시 (confluence)까지 키웠고 세포 (마우스 당 ~7백만 개의 세포)를 마우스의 측면에서 마취 하에 피하 주사하였다. 일부 실험을 위해서, 마우스에, 종양 이식 날에 시작하여, 격일마다 항-인간 VEGF 항체 AvastinTM (Roche; 100 μ g 정맥 내)를 처리하였다. 종양의 크기를 11일 후에 측정하였고 부피를 다음 식을 사용하여 계산하였다: 부피 = 0.5 * 길이² * 너비.

[0144] 환자 및 마우스 조직을 최적 절단 온도 (Optimum Cutting Temperature; OCT, Sakura Finetek)에서 냉동시켰다. 냉동 절편(cryosection) (7μ m)에 연속으로 Triton-100X 0.1%를 15분 동안, Hyaluronidase 0.03%를 15분 동안, Background Buster (Innovex bioscience)를 15분 동안, Fc Receptor Block (Innovex bioscience)을 15분 동안 및 Background Buster를 추가 15분 동안 처리하였다. 절편을 그 다음에 5% BSA 및 0.01% 사포닌이 보충된 PBS에서 회석된 1차 항체로 상온에서 1시간 동안 염색하였고, 상온에서 40분 동안 2차 항체로 염색하였다. 핵을 4',6-디아미디노-2-페닐인돌 (1 μ g/mL)로 2분 동안 염색하였다.

[0145] 1차 항체: 인간 CD14 (1:200, UCHM1, AbD Serotec); 인간 CD163 (1:200, EDHu-1, AbD Serotec); 인간 CD206 (1:100, 15-2, AbD Serotec); 인간 HLA-DR (1:100, LN3, Biolegend). CD163/CD206 조합 염색을 위해서, 두 항체를 조직 염색 전 Alexa Fluor 488 또는 568 Antibody Labeling Kit (Molecular Probes)로 표지하였다.

[0146] 2차 항체: 염소 항-래트 Alexa Fluor 568; 염소 항-마우스 Alexa Fluor 488; 염소 항-마우스 Alexa Fluor 588 또는 염소 항-마우스 Alexa Fluor 647 (1:700, Molecular Probes).

[0147] 면역 형광 이미지화를 NIS-Element Ar 소프트웨어 (Nikon Instruments Inc)를 통해 작동되는 Eclipse Ti 도립 현미경(inverted microscope) 시스템 (Nikon Instruments Inc.)에서 수행하였다.

[0148] CD163+ 세포 침투의 밀도의 정량을 위해서, 3명의 다른 흑색종 환자의 종양, 3 NSG 및 3 MISTRG를 선택하였다. 각 종양에 대하여, 3개의 냉동 절편을 인간 CD163에 대하여 염색하였다. 각 염색된 절편으로부터 3장의 대표적인 사진, 각 군 (환자, MISTRG 및 NSG)의 총 27장의 대표 사진을 획득하였다. 각 사진에 대하여, CD163+ 세포를 NIS-Element Ar 소프트웨어 (Niko Instruments Inc.)를 사용하여 계수하였다. 각 사진을 "스플릿 채널(split

channel) + 오버레이(overlay)" 디스플레이를 사용하여 및 각각의 별개의 채널 및 오버레이에서 동시에 확대함으로써 분석하였다.

[0149] 통계적 분석

[0150] 통계적 분석을 일원 ANOVA에 이어서 터키 사후 테스트, 양방적(two-tailed) 언페어드 스튜던트 t-테스트 또는 반복 측정 ANOVA를 사용하여, GraphPad Prism 5 소프트웨어로 수행하였다.

[0151] 실시예 2: 인간 골수 선생물은 MISTRG에서 이식될 수 있다

[0152] 골수성 백혈병은 골수 계통의 세포에 영향을 미치는 암의 형태이다. 골수성 백혈병은 급성 골수성 백혈병(AML), 척수 증식성 질환(MPD), 만성 골수-단핵구성 백혈병(chronic myelo-monocytic leukemia; CMML) 및 골수이형성 증후군(myelodysplastic syndrome; MDS)을 포함하는, 다른 타입으로 분류된다. 골수성 백혈병에 걸릴 위험은 나이에 따라 증가하고 이 질환의 발생률은 집단의 노화에 따라 증가할 가능성이 크다. 치료적 및 지지적 관리 접근법이 병원에서 이용 가능하지만, 이 군의 질환 및 새로운 치료의 더 나은 이해가 필요하다.

[0153] 인간 백혈병을 연구하기 위해 사용된 방법 중 하나는 환자 샘플의 면역 결핍 마우스로의 이종 기관 이식(xenotransplantation)에 의존하는 것이다. 하지만, 현재 이용 가능한 수령체 마우스가 이 목적을 위해 최적은 아니다: 단지 AML 샘플의 서브세트만이 성공적으로 이식될 수 있고; MPD, CMML 또는 MDS (RCUD, RAEB I 및 RAEB II 포함)의 왕성한 이식은 지금까지 보고되지 않았다. 따라서, 최적화된 계통의 수령체 마우스가 인간 골수성 백혈병의 더 나은 이식에 필요하다.

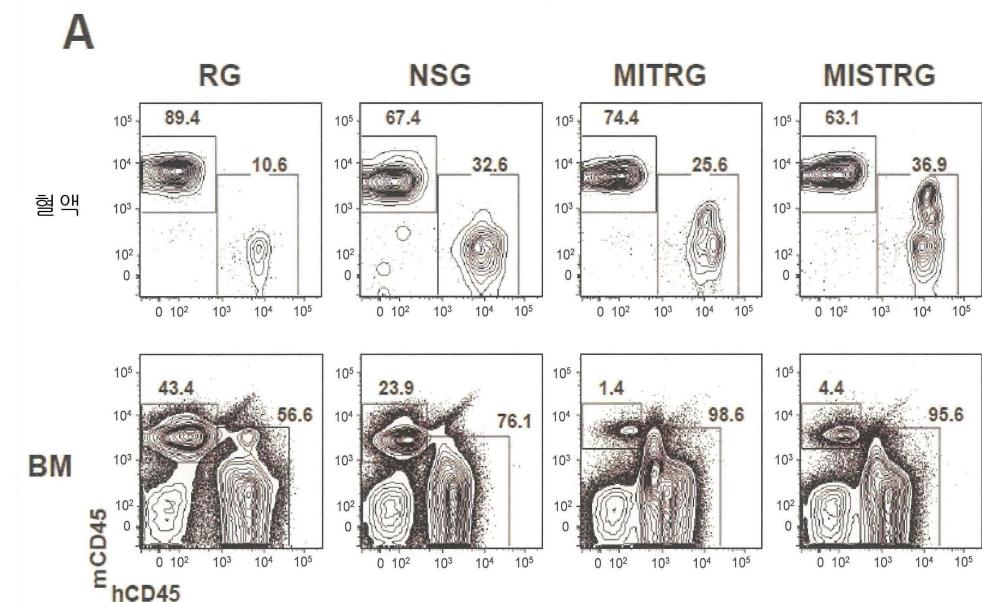
[0154] MISTRG가 인간 조혈성 세포의 더 나은 이식을 지지하며, 골수에서 인간 혈액 생성에 의해 마우스 혈액 생성의 거의 완벽한 대체로 이어진다는 것이 본원에서 입증된다. AML, CMML 및 MDS에 걸린 환자로부터 분리된 샘플이 MISTRG에서 이식될 수 있다는 것이 또한 본원에서 나타난다 (도 17).

[0155] 그러므로, 본원에서 설명된 유전적으로 변형된 비-인간 동물은 (i) 질환의 세포적 및 분자적 발병을 연구하고; (ii) 예측값 또는 진단값으로 생체 마커를 확인하며; (iii) 치료를 위한 새로운 표적을 확인하고; (iv) 전임상적 및 환자-특이적 설정에서 치료를 테스트하는데 유용한 인간 골수성 백혈병의 새로운 생체 내 동물 모델을 나타낸다.

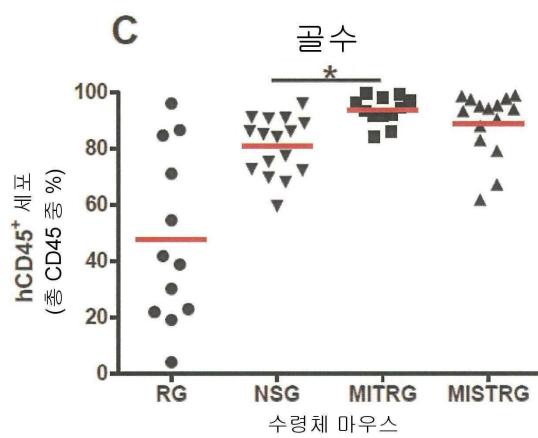
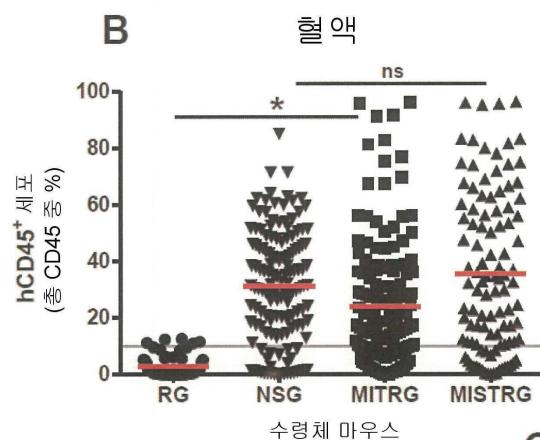
[0156] 모든 특허의 개시물, 특히 출원, 및 본원에서 인용된 간행물은 그 전문이 본원에서 참고로 포함된다. 본 발명이 특정 구체예에 관하여 개시되는 한편, 본 발명의 다른 구체예 및 변형이 본 발명의 진정한 사상 및 범위로부터 벗어나지 않으면서 당업자에 의해 고안될 수도 있다는 것은 분명하다. 첨부된 청구범위는 이러한 모든 구체예 및 동등한 변형을 포함하는 것으로 해석되도록 의도된다.

도면

도면 1a

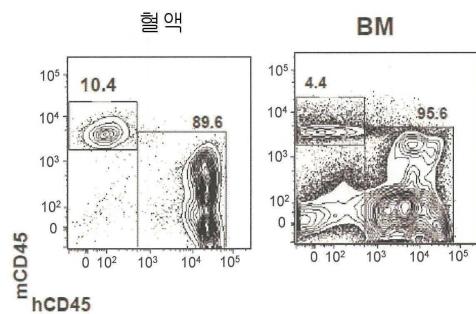


도면 1b

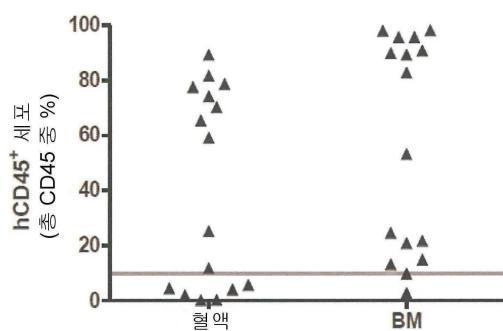


도면1c

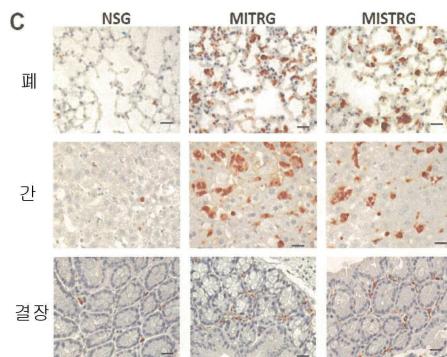
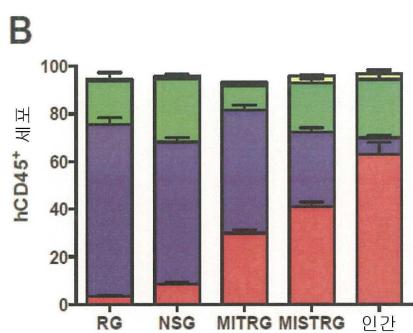
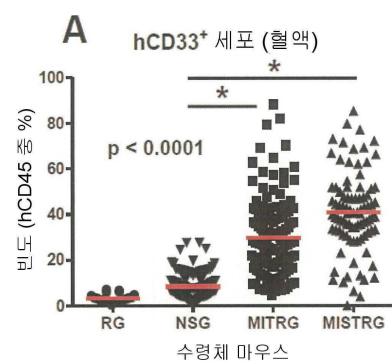
D 비-조사된 MISTRG



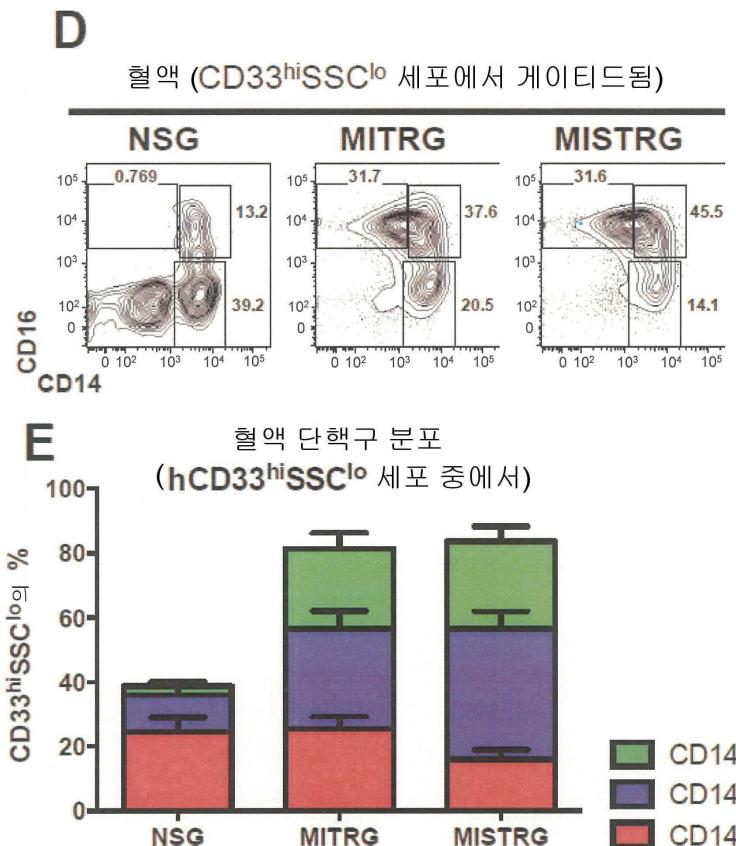
E 비-조사된 MISTRG



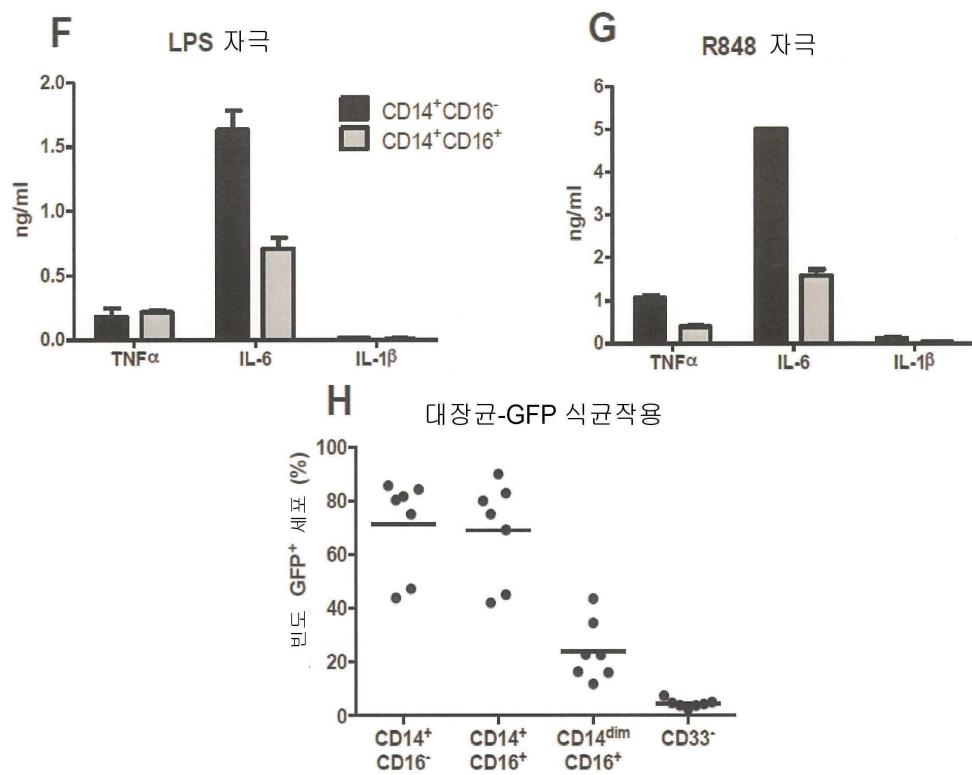
도면2a



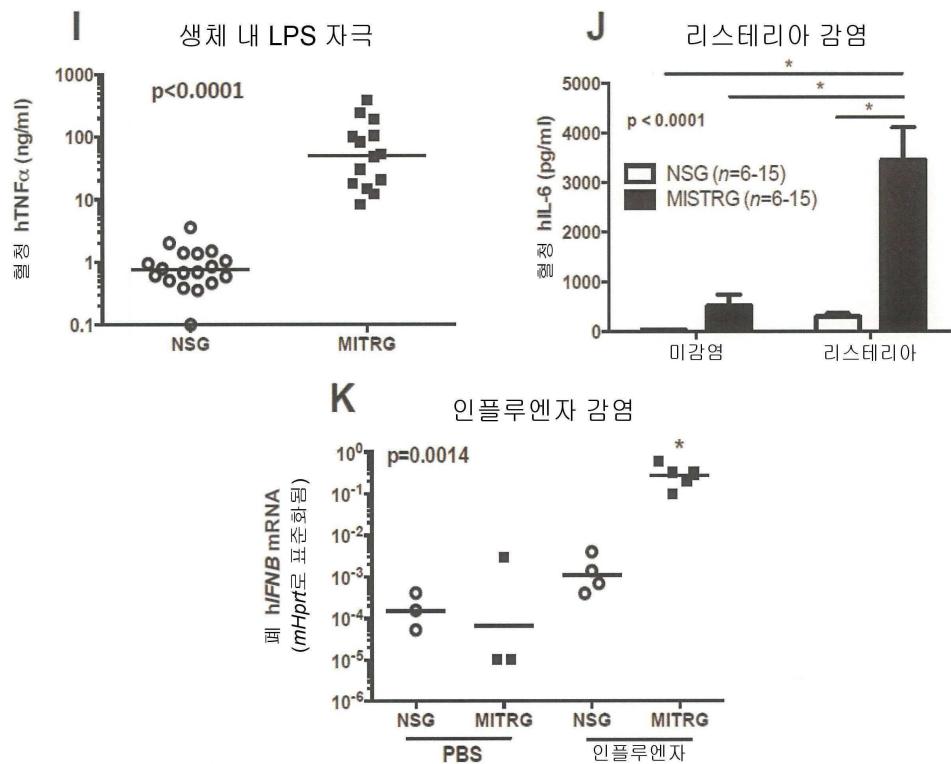
도면2b



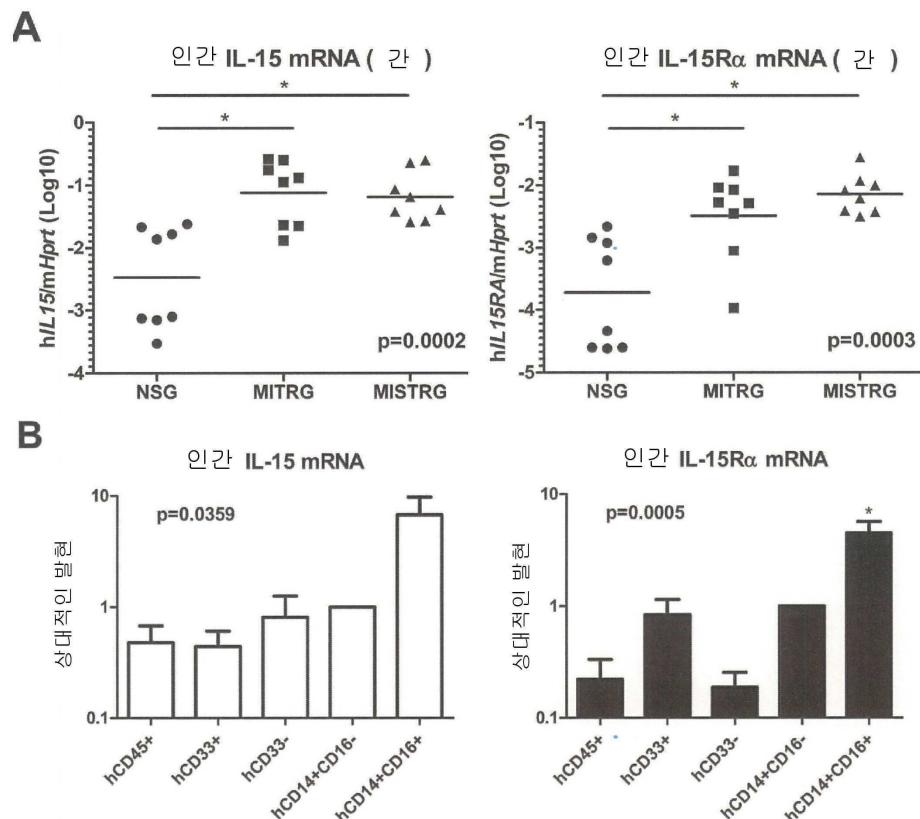
도면2c



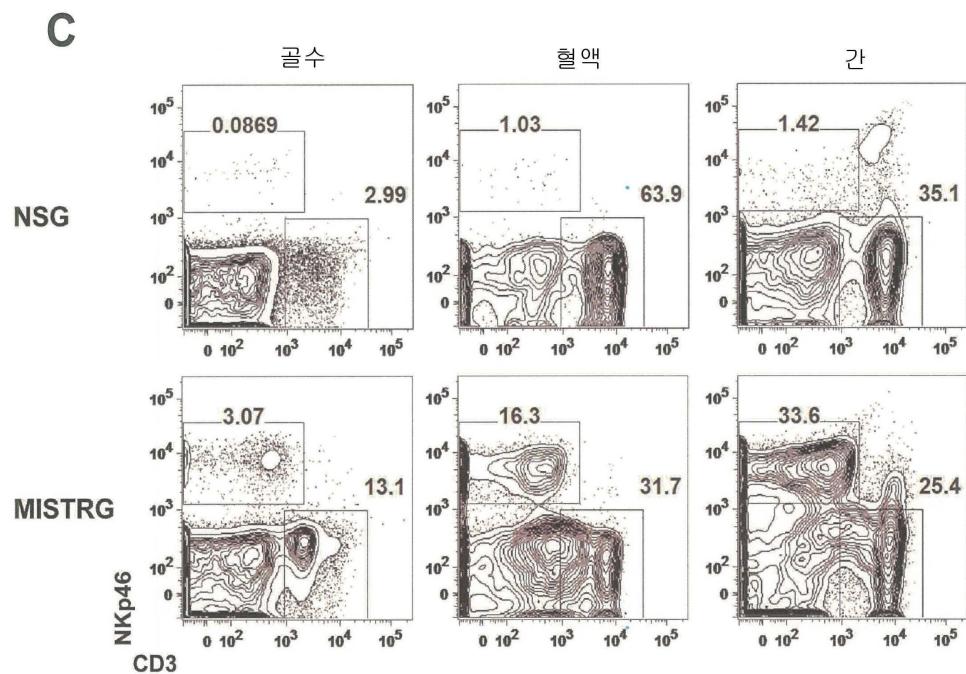
도면2d



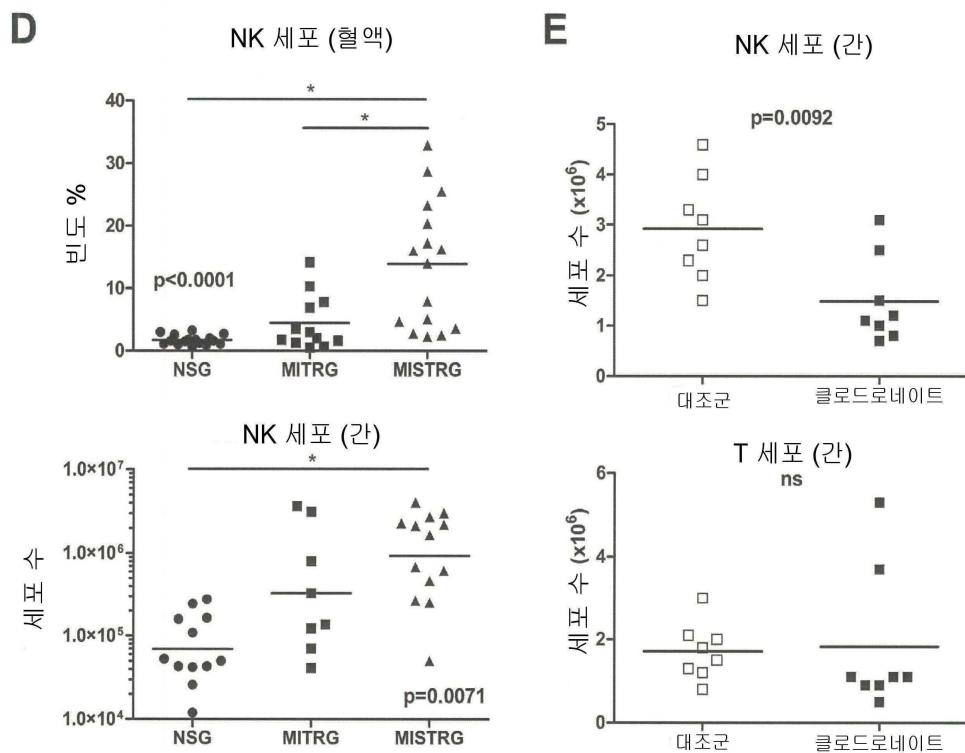
도면3a



도면3b



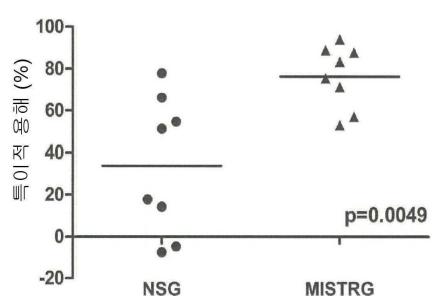
도면3c



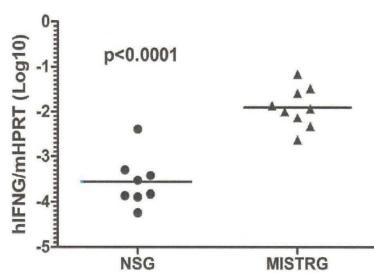
도면3d

F

생체 내 NK 세포 독성

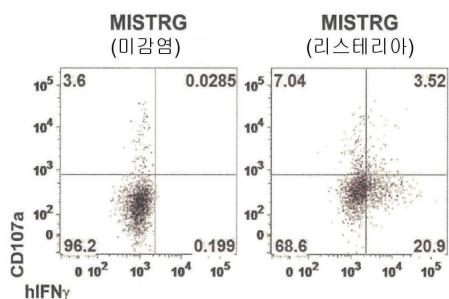


G

리스테리아 감염 후
인간 IFN γ mRNA (간)

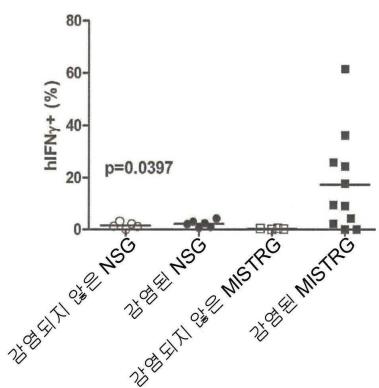
H

인간 간 NK 세포

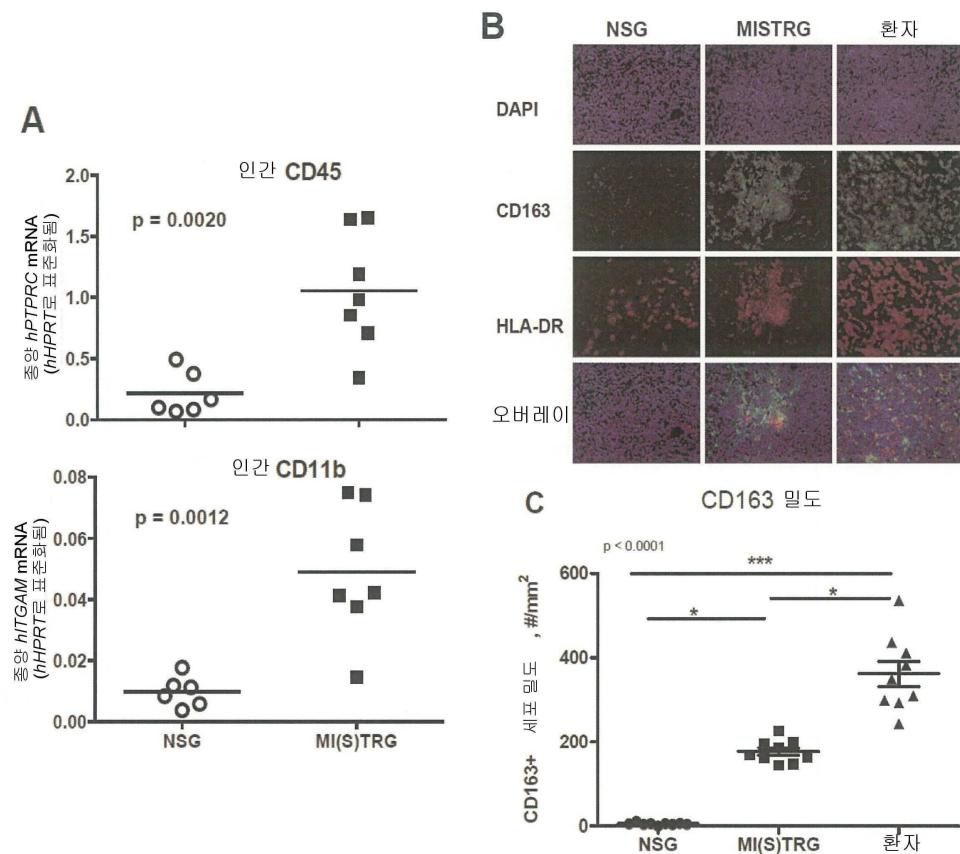


I

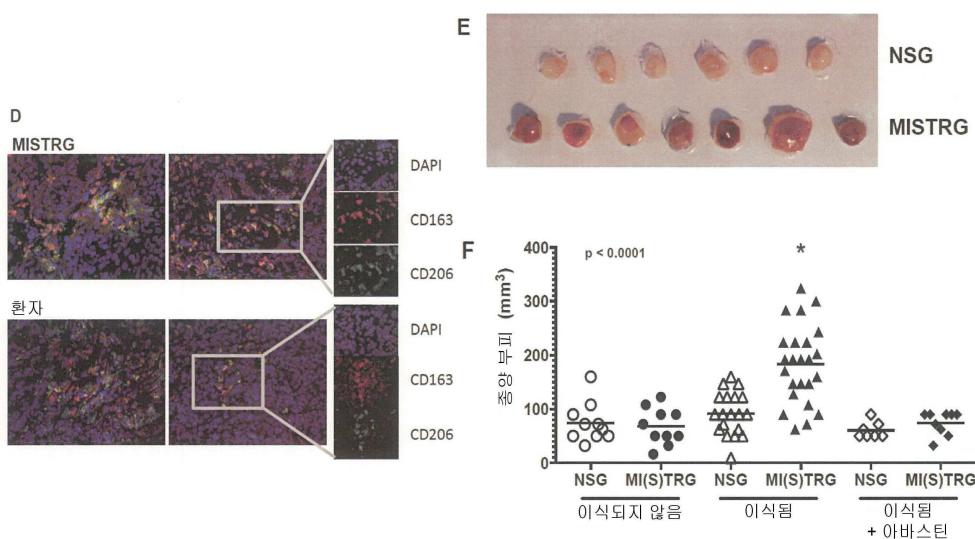
NK 세포 (리스테리아 감염)



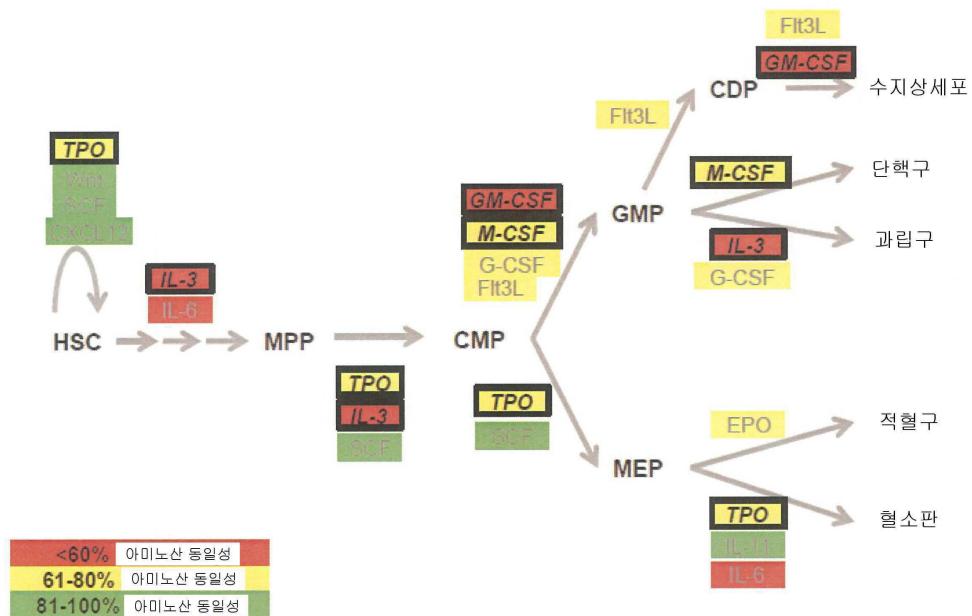
도면4a



도면4b



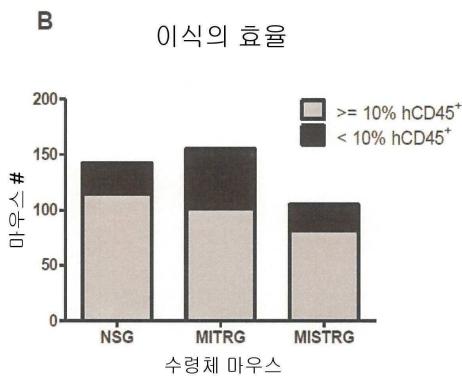
도면5



도면6a

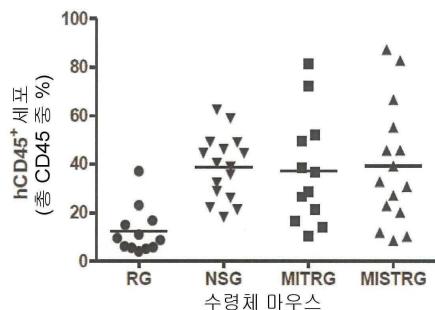
	RG	NSG	MITRG	MISTRG
n	56	142	155	105
평균	2.9	31.4	24.0	35.8
SEM	0.5	1.7	1.8	2.7

E/키	일원 ANOVA : p < 0.0001			
	RG	NSG	MITRG	MISTRG
RG				
NSG	p<0.05			
MITRG	p<0.05	p<0.05		
MISTRG	p<0.05	ns	p<0.05	



C

BM 분석에 사용된 마우스의 혈액



도면6b

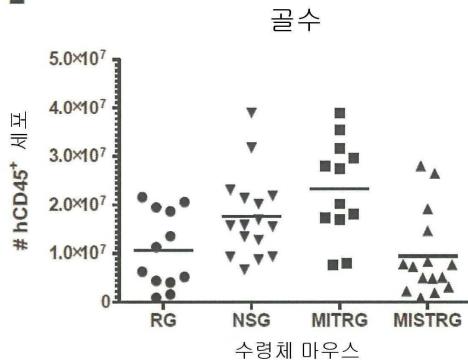
D

	RG	NSG	MITRG	MISTRG
n	12	16	12	15
평균	47.7	81.0	93.7	89.0
SEM	8.8	2.6	1.4	3.0
최소	4.2	59.6	84.1	61.8
최대	96.1	96.1	99.7	98.9

일원 ANOVA : p = 0.0042

E/자	NSG	MITRG	MISTRG
NSG			
MITRG	p<0.05		
MISTRG	ns	ns	

E



도면7a

A

	RG	NSG	MITRG	MISTRG
n	20	122	129	88
평균	3.5	8.5	29.8	40.9
SEM	0.4	0.5	1.5	1.9

일원 ANOVA : p < 0.0001

E/자	RG	NSG	MITRG	MISTRG
RG				
NSG	ns			
MITRG	p<0.05	p<0.05		
MISTRG	p<0.05	p<0.05	p<0.05	

C

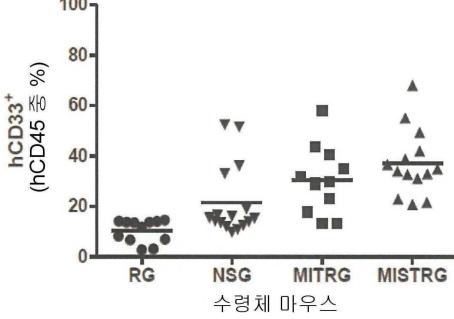
	RG	NSG	MITRG	MISTRG
n	12	16	12	14
평균	10.3	21.6	30.5	37.3
SEM	1.3	3.5	3.8	3.5

일원 ANOVA : p < 0.0001

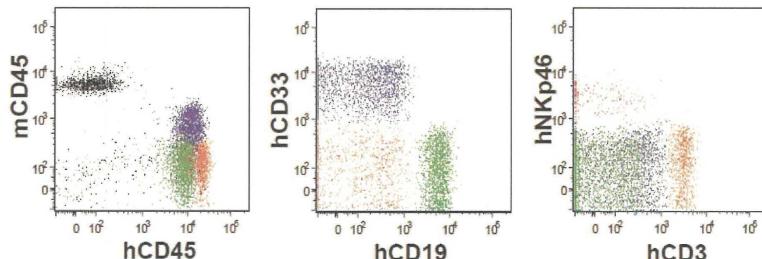
E/자	RG	NSG	MITRG	MISTRG
RG				
NSG	ns			
MITRG	p<0.05	ns		
MISTRG	p<0.05	p<0.05	p<0.05	

B

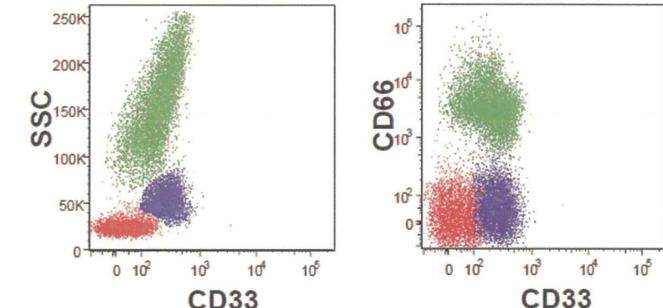
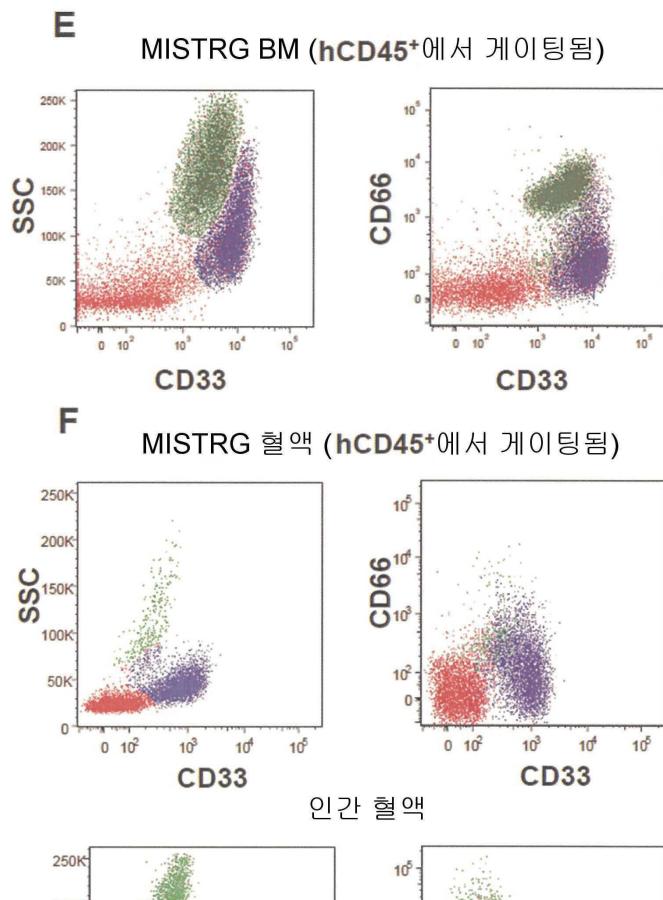
골수종 세포 (BM)



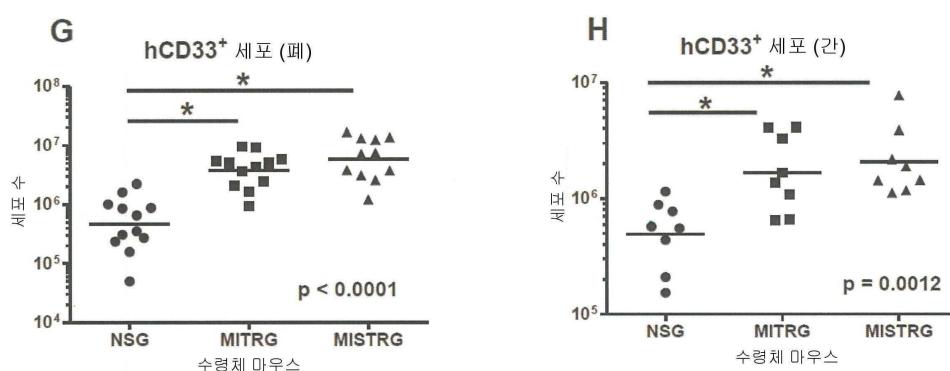
D



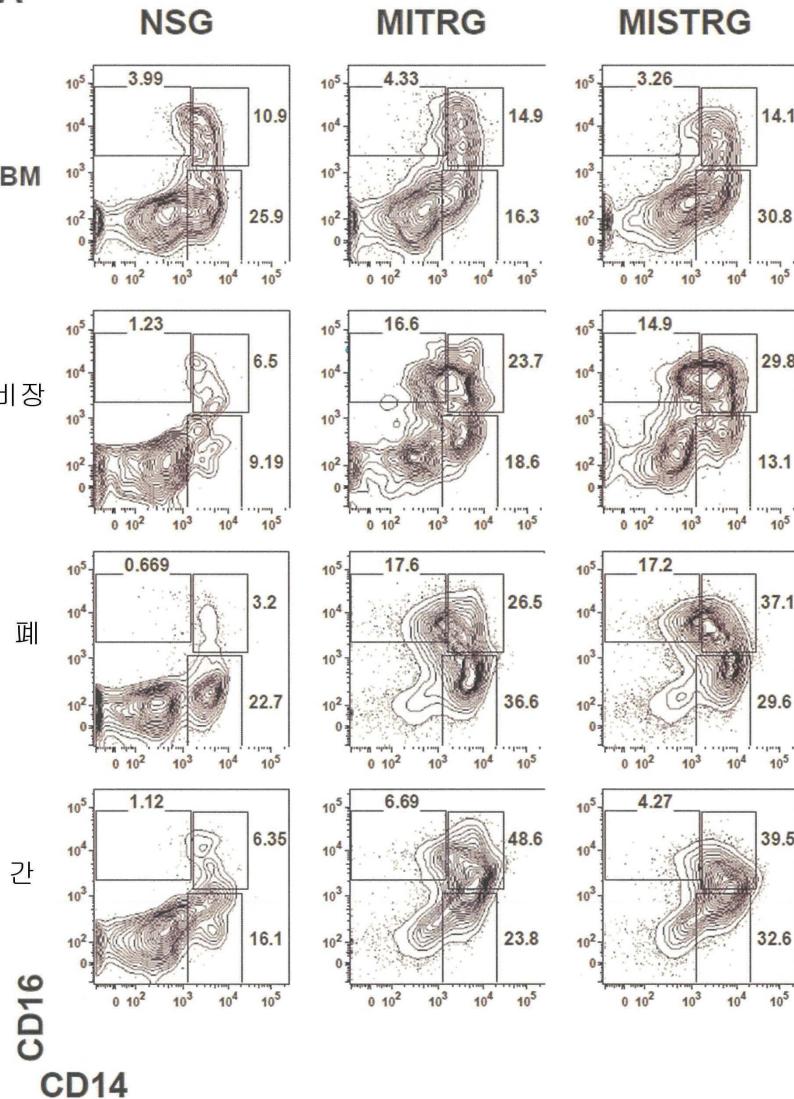
도면7b



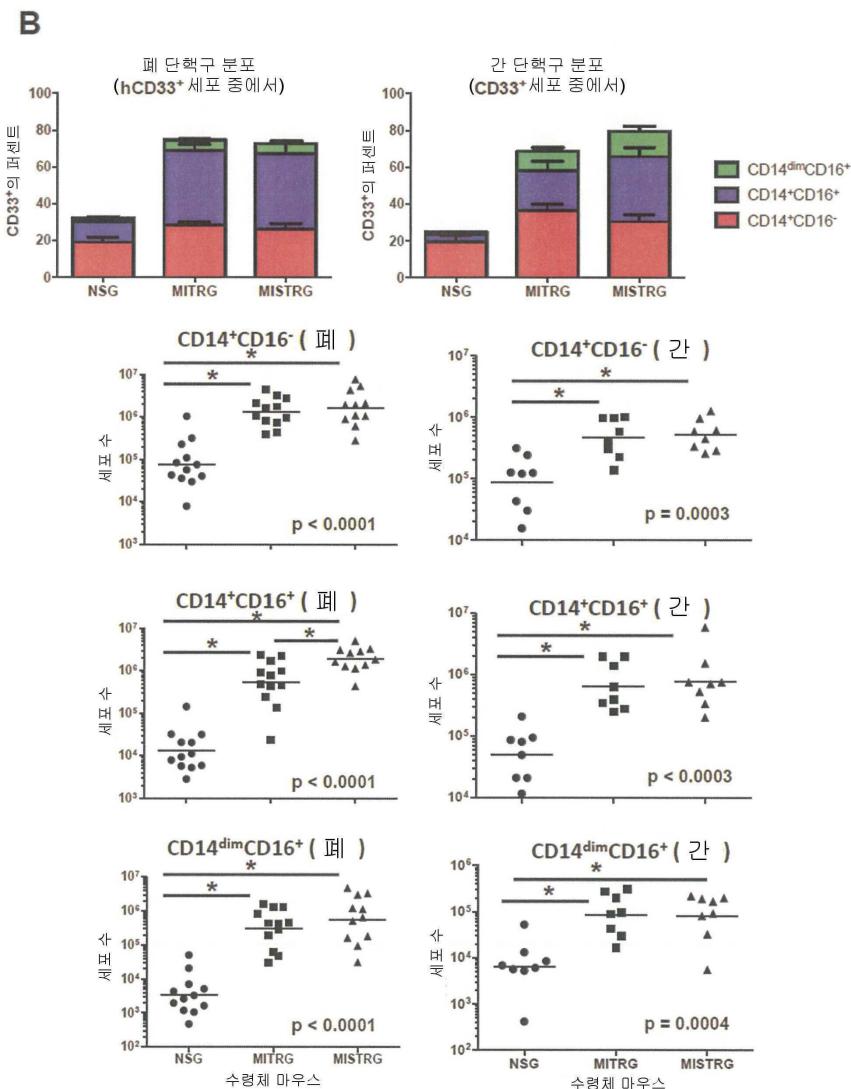
도면7c



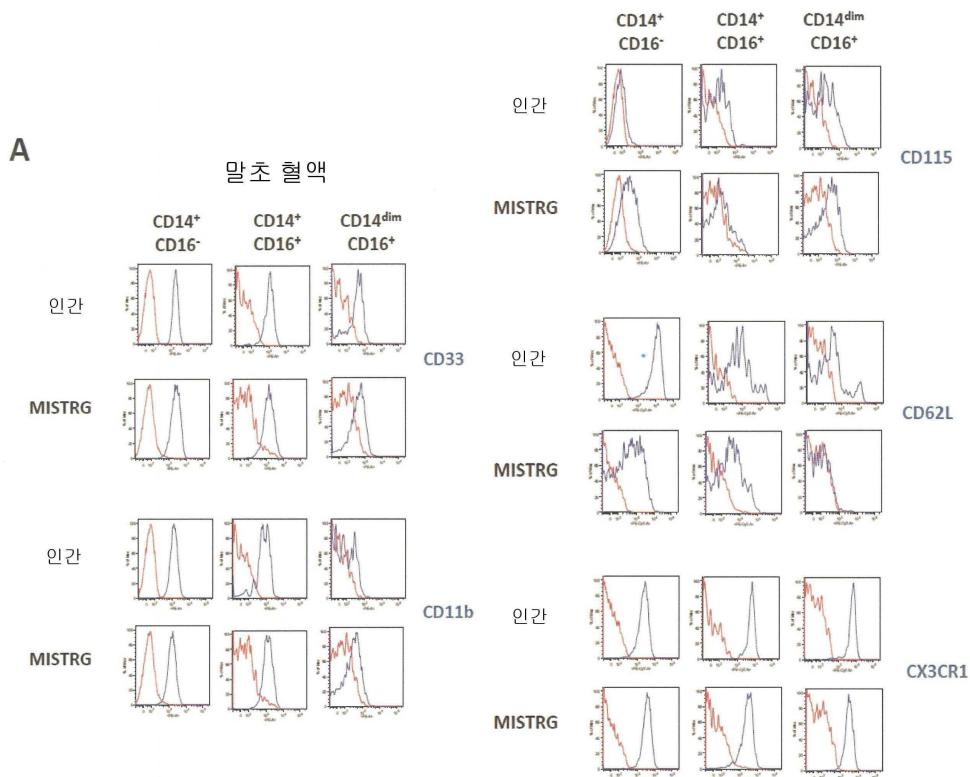
도면8a

A

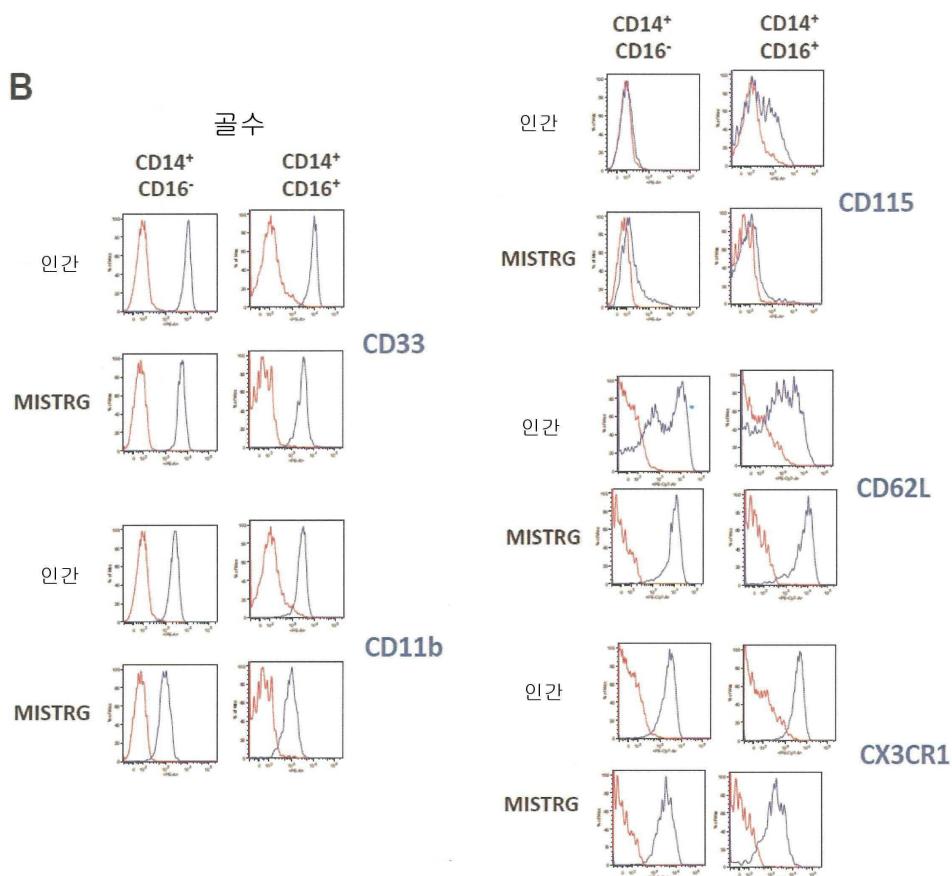
도면8b



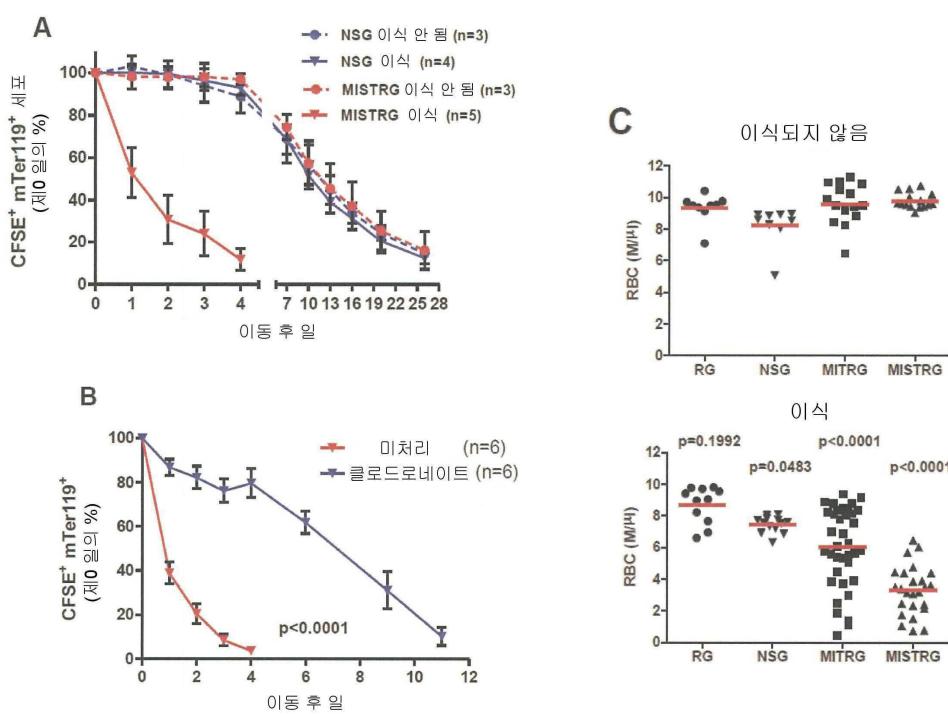
도면9a



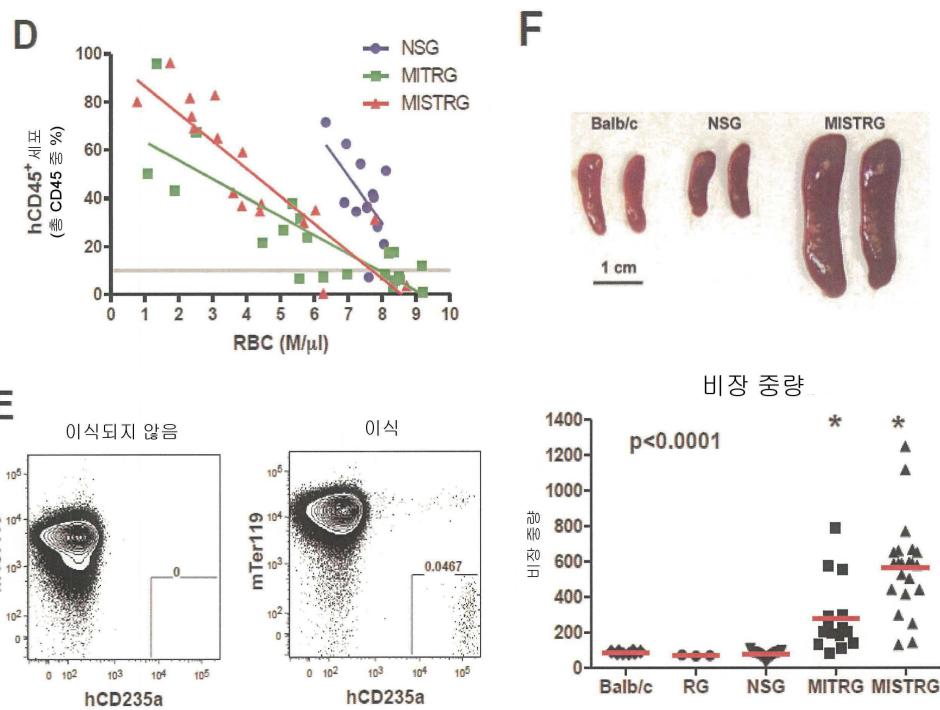
도면9b



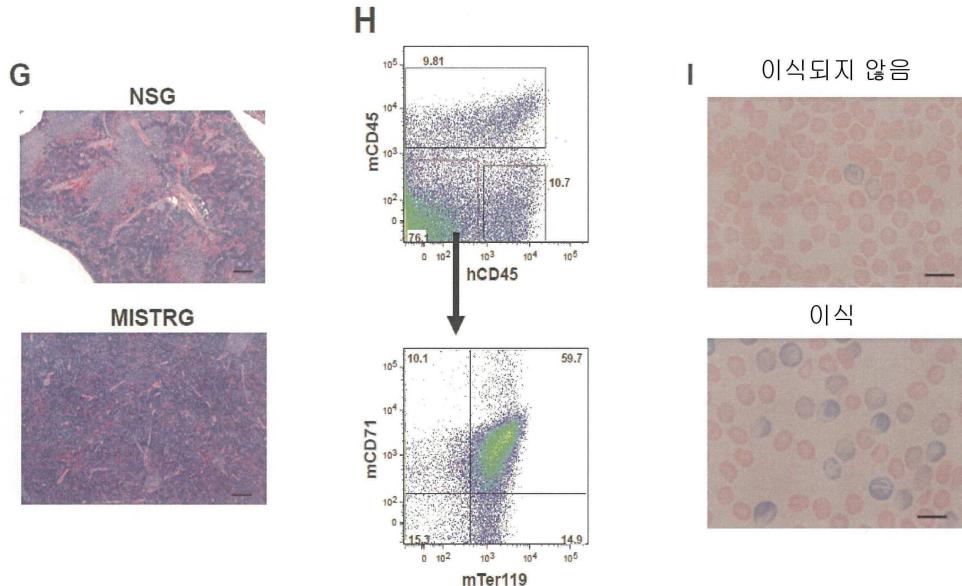
도면10a



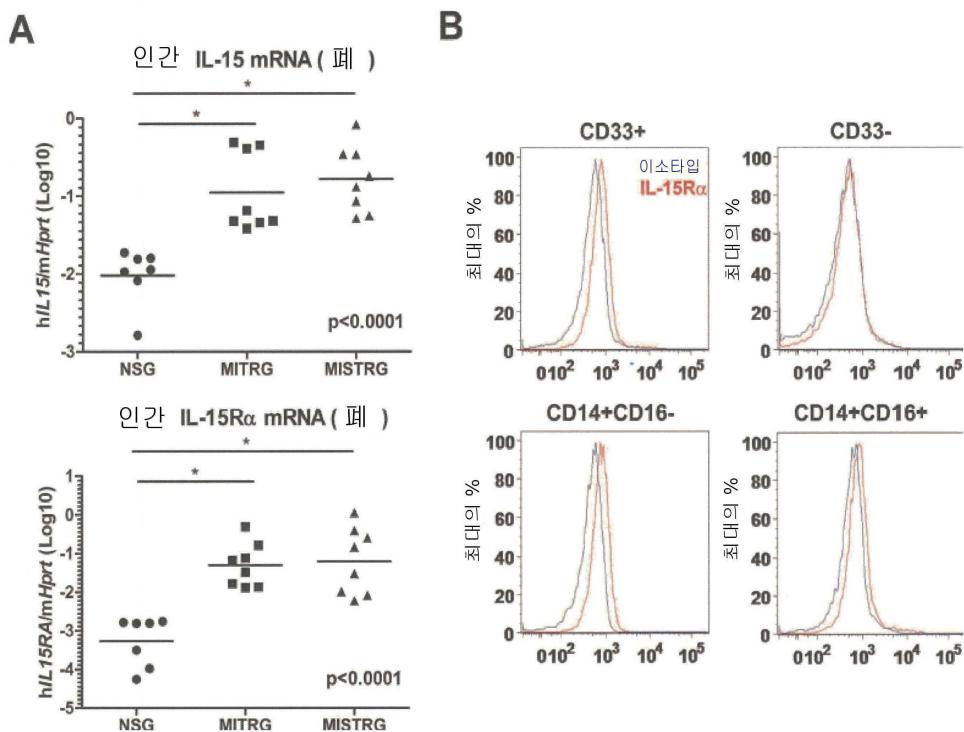
도면 10b



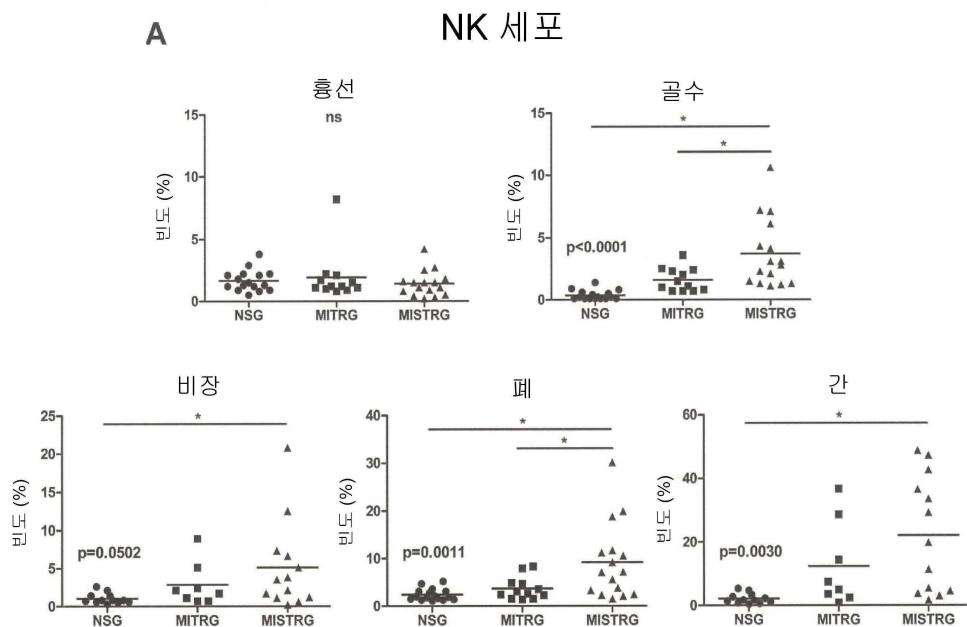
도면 10c



도면11

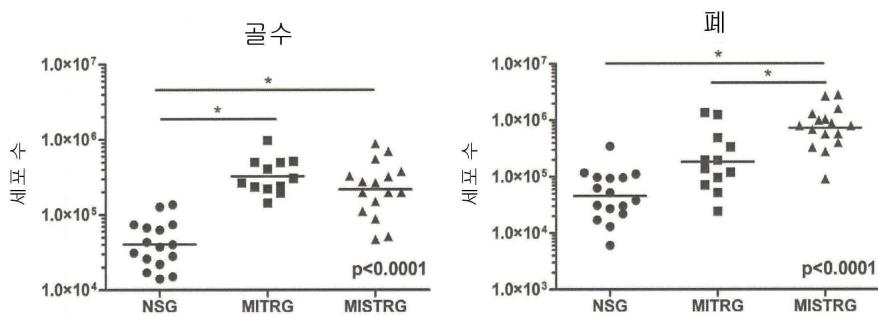


도면12a



도면12b

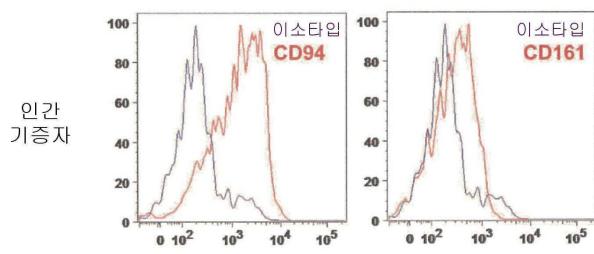
B NK 세포



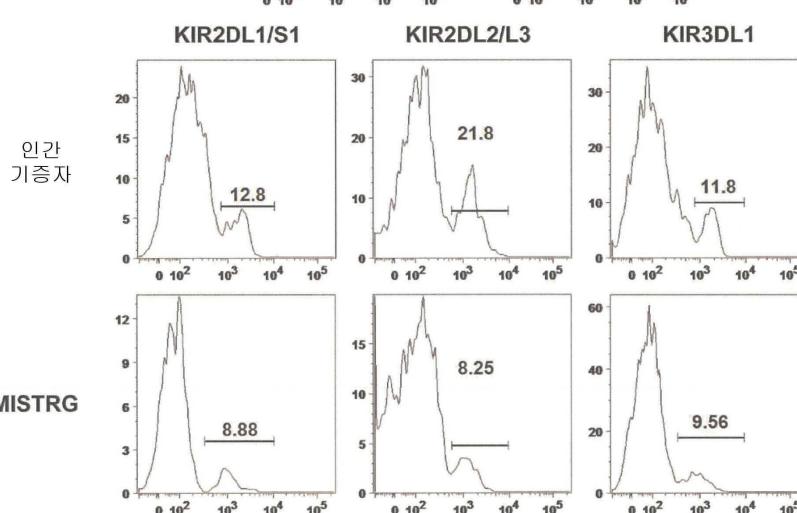
도면13a

A

NK 세포

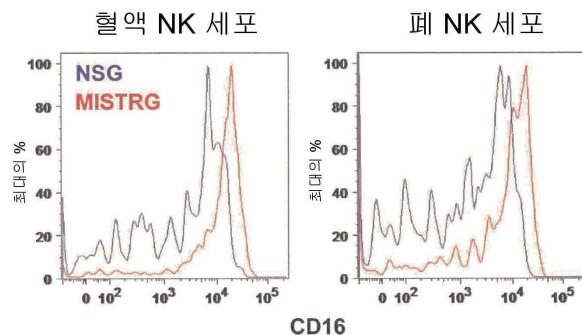


B

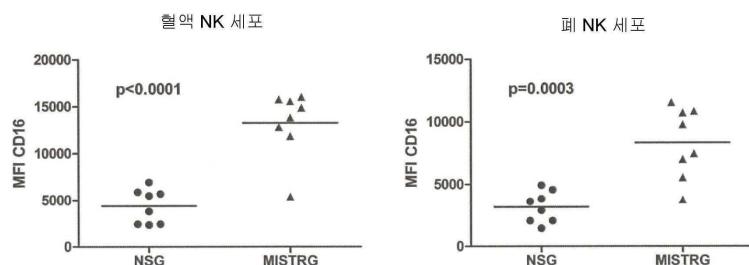


도면 13b

C

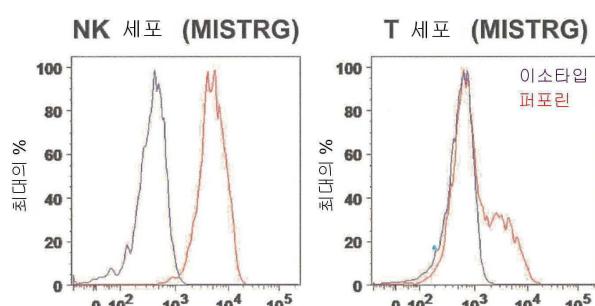


D

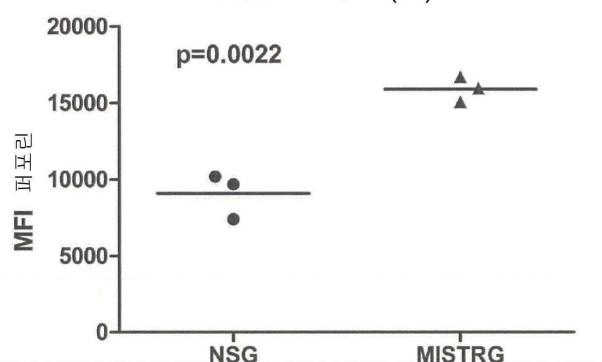


도면 13c

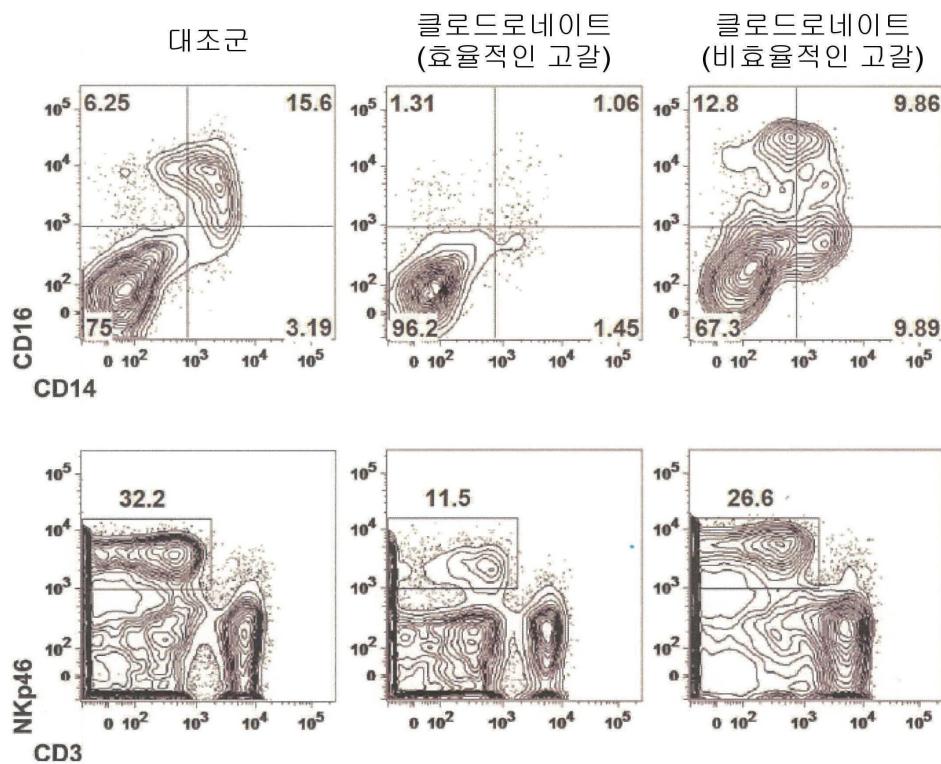
E



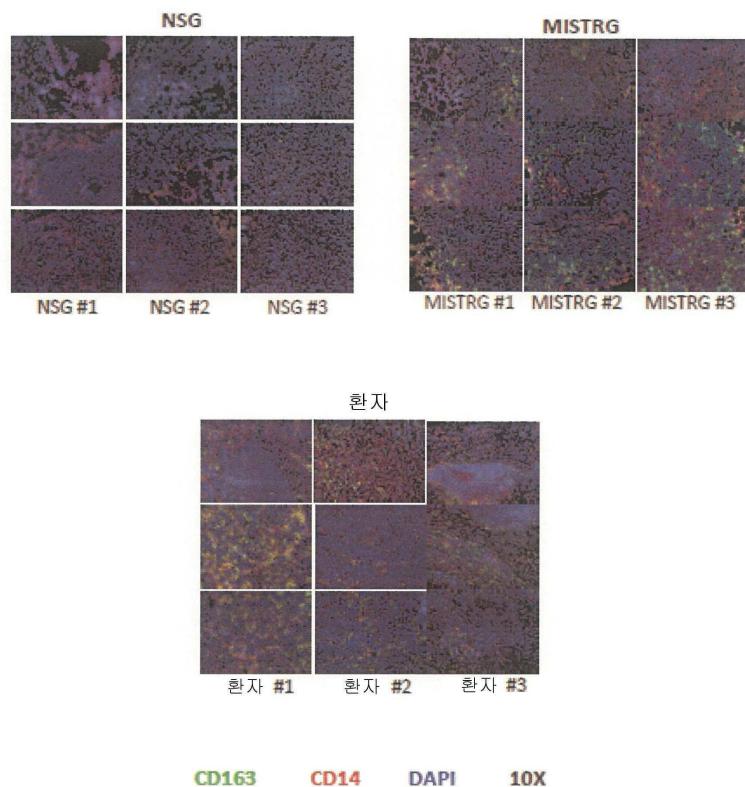
F

퍼포린 발현
인간 NK 세포 (간)

도면14



도면15



도면16

NSG, MISTRG 및 인간에서, 단일 유전자 대체된 수령체 마우스에서 이식 수준과 면역 세포 발달 및 기능의 비교

	RAG2 ^{-/-} IL2R γ ^{-/-} (RG)	RG TPO ^{h/h}	RG IL-3/GM-CSF ^{h/h}	RG M-CSF ^{h/h}	hSIRPa ^{tg} RG / NSG	MISTRG	인간
혈액 hCD45 ⁺ 세포 (%)	5-20	5-20	5-20	20-40	10-60	10-80	100
BM hCD45 ⁺ (%)	20-80	75-90	20-80	20-80	60-90	85-99	100
인간 CD33 ⁺	1-7	10-20	5-10	10-30	5-15	30-50	50-70
인간 NK 세포 (hCD45 중 %)	0-1	ND	ND	ND	0.5-2	1-7	1-6
인간 NK 세포 기능	-	ND	ND	ND	-	+	+
혈청 TNF α (ng/ml, LPS 후 90분)	ND	ND	ND	ND	0.3-3	10-200	ND
폐포 대식 세포	-	-	+	-	-	+	+

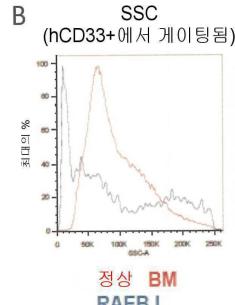
ND: 미검출

도면17

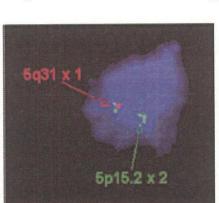
A

질환	마우스 당 세포수	이식	주 단위의 이식 후 시간	골수		유전적 비정상		주석
				hCD45	hCD33	환자 샘플	이식	
RCUD	9x10 ⁴ CD34+ 풍부한	1/1	11	1.9	89.9	정상	n.d.	CD33+ 세포에서 낮은 일도
RAEB I	1-4x10 ⁵ CD34+ 풍부한	4/4	10	2.2-38.7	37.3-49.8	세포 중 5%에서 삼색체상 8	nI FISH x 1	CD33+ 세포에서 낮은 일도
RAEB II	7x10 ⁵ CD34+ 풍부한 세포	2/2	15	0.07-0.88	31.9-85.5	5q-	24/25 세포에서 5q-	
CMML	7.5x10 ⁶ T-세포 고갈증	1/2	15	0.8	48	del(6)(q11.1q22.1)	del(6)(q11.1q22.1)	
RAEB II의 2° AML	4.5x10 ⁶ T-세포 고갈증	2/2	12	73.8-81.5	77.5-84.1	5q-를 포함하는 복합체	5q-를 포함하는 복합체	

B



C



D

