(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년07월12일
(11) 등록번호 10-2275412
(24) 등록일자 2021년07월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A01K 67/027 (2006.01) *A61K 49/00* (2006.01)
C07K 14/535 (2006.01) *C07K 14/54* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A01K 67/0278 (2013.01)
A61K 49/0008 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-7011974
(22) 출원일자(국제) 2013년11월05일
심사청구일자 2018년11월02일
(85) 번역문제출일자 2015년05월07일
(65) 공개번호 10-2015-0081285
(43) 공개일자 2015년07월13일
(86) 국제출원번호 PCT/US2013/068569
(87) 국제공개번호 WO 2014/071397
국제공개일자 2014년05월08일
(30) 우선권주장
61/722,437 2012년11월05일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
US7759541 B2
(뒷면에 계속)
전체 청구항 수 : 총 21 항

(73) 특허권자
리제너론 파마슈티칼스 인코포레이티드
미합중국 뉴욕주 10591 타리타운 올드 소우 밀 리버 로드 777
예일 유니버시티
미국, 코네티컷 06511, 뉴 헤븐, 투 휘트니 애비뉴
인스티튜트 포 리서치 인 바이오메드슨
스위스, 씨에이치-6500 벨린조나, 비아 빈센조 벨라 6
(72) 발명자
플라벨 리챠드
미국 코네티컷 06437 길포드 무스 힐 로드 283
스트로윅 팀
미국 코네티컷 뉴 헤이븐
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인와이에스장

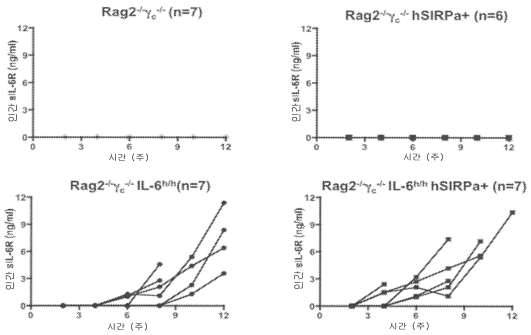
심사관 : 박영관

(54) 발명의 명칭 **유전자 변형된 비-인간 동물 및 그것의 사용 방법**

(57) 요 약

인간 조혈 세포 발달, 기능 또는 질병을 모델화하기 위해 사용될 수 있는 유전자 변형된 비-인간 동물이 제공된다. 유전자 변형된 비-인간 동물은 IL-6 프로모터에 작동가능하게 연결된 인간 IL-6를 코드화하는 핵산을 포함한다. 어떤 경우에 인간 IL-6를 발현하는 유전자 변형된 비-인간 동물은 또한 인간 M-CSF, 인간 IL-3, 인간 GM-CSF, 인간 SIRPa 또는 인간 TPO 중 적어도 한 가지를 발현한다. 어떤 경우에 유전자 변형된 비-인간 동물은 면역결핍성이다. 그런 어떤 경우에 유전자 변형된 비-인간 동물은 건강하거나 질병에 걸린 인간 조혈 세포로 이식된다. 또한 인간 조혈 세포 발달, 기능 및/또는 질병을 모델화하는 데 본 발명의 유전자 변형된 비-인간 동물을 사용하는 방법뿐만 아니라 본 발명의 유전자 변형된 비-인간 동물을 제조하고 및/또는 본 발명의 방법을 실시하는 데 사용되는 시약 및 그것의 키트가 제공된다.

대 표 도



(52) CPC특허분류
C07K 14/535 (2013.01)
C07K 14/5403 (2013.01)
C07K 14/5412 (2013.01)
A01K 2217/052 (2013.01)
A01K 2217/072 (2013.01)
A01K 2217/15 (2013.01)
A01K 2227/105 (2013.01)

(72) 발명자
만츠 마르쿠스 지.
스위스 체하-8702 졸리콘 스테트바흐스트라쎄 9
보르소티 시아라
미국 뉴욕 뉴욕
도답카르 마드하브
미국 코네티컷 뉴 헤이븐
머피 앤드류 제이.
미국 뉴욕 10520 크로톤-온-허드슨 뉴톤 코트 10
스티븐스 션
미국 캘리포니아 92122 산 디에고 카미노 칼마 3954
얀코파울로스 죠지 디.
미국 뉴욕 10598 요크타운 하이츠 밥티스트 처치 로드 1519

(56) 선행기술조사문헌
Proc. Natl. Acad. Sci. USA vol.92 pp.4862-4866(1995.05.31)
American j. Pathology vol.157 no.5 pp.1485-1493(2000.11.30)
J. Exper. Med. vol.185 no.4 pp.755-766(1997.02.17)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA vol.86 no.19 pp.7547-7551(1989.10.31)*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

명 세 서

청구범위

청구항 1

다음을 포함하는 유전자 변형된 설치류:

(a) IL-6 프로모터에 작동가능하게 연결되는 인간 IL-6를 코드화하는 핵산으로서, 설치류는 인간 IL-6 폴리펩티드를 발현하고 기능적 천연 IL-6 폴리펩티드를 발현하지 않는, 인간 IL-6를 코드화하는 핵산, 및

(b) i) SIRPa 프로모터에 작동가능하게 연결되는, 인간 SIRPa를 코드화하는 핵산으로서, 설치류는 인간 SIRPa 폴리펩티드를 발현하는, 인간 SIRPa를 코드화하는 핵산;

ii) M-CSF 프로모터에 작동가능하게 연결되는, 인간 M-CSF를 코드화하는 핵산으로서, 설치류는 인간 M-CSF 폴리펩티드를 발현하는, 인간 M-CSF를 코드화하는 핵산;

iii) IL-3 프로모터에 작동가능하게 연결되는, 인간 IL-3를 코드화하는 핵산으로서, 설치류는 인간 IL-3 폴리펩티드를 발현하는, 인간 IL-3를 코드화하는 핵산;

iv) GM-CSF 프로모터에 작동가능하게 연결되는, 인간 GM-CSF를 코드화하는 핵산으로서, 설치류는 인간 GM-CSF 폴리펩티드를 발현하는, 인간 GM-CSF를 코드화하는 핵산; 및

v) TPO 프로모터에 작동가능하게 연결되는, 인간 TPO를 코드화하는 핵산으로서, 설치류는 인간 TPO 폴리펩티드를 발현하는, 인간 TPO를 코드화하는 핵산

으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 추가의 핵산.

청구항 2

제 1항에 있어서, IL-6 프로모터는 설치류 IL-6 프로모터이고, 인간 IL-6를 코드화하는 핵산은 설치류 IL-6 유전자좌에서 설치류 IL-6 프로모터에 작동가능하게 연결되는 것을 특징으로 하는 유전자 변형된 설치류.

청구항 3

제 1항에 있어서, 인간 M-CSF를 코드화하는 핵산은 설치류 M-CSF 유전자좌에 있고, 인간 IL-3를 코드화하는 핵산은 설치류 IL-3 유전자좌에 있으며, 인간 GM-CSF를 코드화하는 핵산은 설치류 GM-CSF 유전자좌에 있고, 인간 TPO를 코드화하는 핵산은 설치류 TPO 유전자좌에 있는 것을 특징으로 하는 유전자 변형된 설치류.

청구항 4

제 1항에 있어서, 설치류는 면역결핍성인 것을 특징으로 하는 유전자 변형된 설치류.

청구항 5

제 4항에 있어서, 설치류는 재조합 활성화 유전자(RAG)를 발현하지 않는 것을 특징으로 하는 유전자 변형된 설치류.

청구항 6

제 4항에 있어서, 설치류는 IL2 수용체 감마 사슬(IL2rg)을 발현하지 않는 것을 특징으로 하는 유전자 변형된 설치류.

청구항 7

제 4항에 있어서, 설치류는 RAG2를 발현하지 않고 IL2rg를 발현하지 않는 것을 특징으로 하는 유전자 변형된 설치류.

청구항 8

제 1항에 있어서, 인간 조혈 세포의 이식을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 유전자 변형된 설치류.

청구항 9

제 8항에 있어서, 인간 조혈 세포는 CD34+ 세포인 것을 특징으로 하는 유전자 변형된 설치류.

청구항 10

제 8항에 있어서, 인간 조혈 세포는 다발성 골수종 세포인 것을 특징으로 하는 유전자 변형된 설치류.

청구항 11

제 1항에 있어서, 설치류는 마우스인 것을 특징으로 하는 유전자 변형된 설치류.

청구항 12

인간 조혈 세포의 집단을, 면역결핍성이고 다음을 포함하는 유전자 변형된 설치류 안에 이식하는 단계를 포함하는, 인간 B 세포 발달 및 기능의 설치류 모델을 제조하는 방법:

(a) IL-6 프로모터에 작동가능하게 연결되는 인간 IL-6를 코드화하는 핵산으로서, 설치류는 인간 IL-6 폴리펩티드를 발현하며 기능적 천연 IL-6 폴리펩티드를 발현하지 않는, 인간 IL-6를 코드화하는 핵산, 및

(b) i) SIRPa 프로모터에 작동가능하게 연결되는, 인간 SIRPa를 코드화하는 핵산으로서, 설치류는 인간 SIRPa 폴리펩티드를 발현하는, 인간 SIRPa를 코드화하는 핵산;

ii) M-CSF 프로모터에 작동가능하게 연결되는, 인간 M-CSF를 코드화하는 핵산으로서, 설치류는 인간 M-CSF 폴리펩티드를 발현하는, 인간 M-CSF를 코드화하는 핵산;

iii) IL-3 프로모터에 작동가능하게 연결되는, 인간 IL-3를 코드화하는 핵산으로서, 설치류는 인간 IL-3 폴리펩티드를 발현하는, 인간 IL-3를 코드화하는 핵산;

iv) GM-CSF 프로모터에 작동가능하게 연결되는, 인간 GM-CSF를 코드화하는 핵산으로서, 설치류는 인간 GM-CSF 폴리펩티드를 발현하는, 인간 GM-CSF를 코드화하는 핵산; 및

v) TPO 프로모터에 작동가능하게 연결되는, 인간 TPO를 코드화하는 핵산으로서, 설치류는 인간 TPO 폴리펩티드를 발현하는, 인간 TPO를 코드화하는 핵산

으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 추가의 핵산.

청구항 13

제 12항에 있어서, IL-6 프로모터는 설치류 IL-6 프로모터이고 인간 IL-6를 코드화하는 핵산은 설치류 IL-6 유전자좌에서 설치류 IL-6 프로모터에 작동가능하게 연결되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 14

제 12항에 있어서, 조혈 세포의 이식된 집단은 CD34+ 세포를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 15

제 12항에 있어서, 조혈 세포의 이식된 집단은 다발성 골수종 세포를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 16

제 12항에 있어서, 이식은 대퇴골 내 및/또는 경골 내 주사를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 17

제 12항 내지 제 16항 중 어느 한 항에 있어서, 설치류는 마우스인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 18

제 12항 내지 제 16항 중 어느 한 항의 방법에 따라 제조된, 이식된 설치류.

청구항 19

제 18항에 있어서, 설치류는 마우스인 것을 특징으로 하는 이식된 설치류.

청구항 20

조혈 세포 암을 치료하는 능력에 대해 후보 제제를 선별하는 방법으로서, 상기 방법은

인간 조혈세포 암세포가 이식된 제 1항 내지 제 11항 중 어느 한 항의 유전자 변형된 설치류를 후보 제제와 접촉시키는 단계, 및

접촉된 설치류의 인간 조혈세포 암세포의 생존력 및/또는 증식 속도를, 인간 조혈세포 암세포가 이식되었지만 후보 제제와 접촉되지 않은 제 1항 내지 제 11항 중 어느 한 항의 유전자 변형된 설치류의 인간 조혈세포 암세포의 생존력 및/또는 증식 속도에 비교하는 단계

를 포함하며,

접촉된 설치류의 인간 조혈세포 암세포의 생존력 및/또는 증식 속도의 감소는 후보 제제가 조혈세포 암을 치료할 것을 가리키는,

조혈 세포 암을 치료하는 능력에 대해 후보 제제를 선별하는 방법.

청구항 21

제 20항에 있어서, 조혈세포 암은 다발성 골수종인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 미국 국립 보건원(NIH)에 의해 수여된 승인 번호 5R01CA156689-04 하에 정부의 지지로 이루어졌다. 정부는 본 발명에 특정 권리를 가진다.

[0002] 관련 출원에 대한 교차 참조

[0003] 35 U.S.C. § 119(e)에 따라, 본 출원은 2012년 11월 5일에 출원된 미국 임시 특허 출원 일련 번호 61/722,437의 출원일에 대한 우선권을 주장하며; 상기 출원의 전체 내용은 본원에 참고로 포함된다.

[0004] 본 발명은 유전자 변형된 비-인간 동물 및 그것의 사용 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0005] 생체의학 연구의 목적은 인간의 생리학을 보다 더 잘 이해하고 그 지식을 인간의 질병을 방지, 치료 또는 치유하기 위하여 사용하는 것이다. 인간을 대상으로 한 실험에는 실제적이며 윤리적인 장벽들이 있기 때문에, 많은 연구들이 작은 동물 모델, 예컨대 마우스에 대해 수행된다. 그러므로 이들 인간 질병의 동물 모델이 필요하다.

[0006] 예를 들어 미국에서는, 20,000명 정도의 환자가 매년 새롭게 항체-분비 말단 분화된 B 세포의 가장 치유가 어려운 악성인 다발성 골수종(MM)으로 진단받는다(Hideshima et al., 2007, Nat Rev Cancer. 7:585-98; Kuehl and

Bergsagel, 2002, Nat Rev Cancer. 2: 175-87). MM은 골수(BM)에서 악성 혈장 세포의 침윤을 특징으로 하며, 임상적 징후로는 뼈 질병, 고칼슘혈증, 혈구 감소증, 신장 기능장애 및 말초 신경장애를 포함한다(Hideshima et al., 2007, Nat Rev Cancer. 7:585-98; Kuehl and Bergsagel, 2002, Nat Rev Cancer. 2: 175-87). 대부분의 경우에 MM은 50세 이상의 사람들의 3% 정도에 영향을 미치는 중요성이 확인되지 않은 단세포군 감마글로불린병증(MGUS)으로 불리는 전암성 상태가 선행된다(Landgren et al., 2009, Blood 113:5412-7). 복합체 외인성 유전적 이상(abnormalities)은 IgH 전위뿐 아니라 핵형의 변화를 포함한 MM 세포를 특징으로 한다(Kuehl and Bergsagel, 2002, Nat Rev Cancer. 2: 175-87; Zhan et al., 2006, Blood 108:2020-8). MGUS에서 증폭된 혈장 세포 클론은 골수종성 혈장 세포에 유사한 유전적 및 표현형 프로필을 가지는 것으로 여겨진다(Chng et al., 2005, Blood 106:2156-61; Fonseca et al., 2002, Blood 100: 1417-24; Kaufmann et al., 2004, Leukemia. 18: 1879-82). 사이클린 D 유전자의 돌연변이가 MM의 발생을 유도하는 것으로 제시된 한편, 다른 인자들의 잠재적인 기여는 결정적으로 증명되지는 않았다(Bergsagel et al., 2005, Blood 106:296-303). 그럼에도 불구하고, 유전될 수 있는 유전자 변경은 MM 세포의 행동방식의 단독 결정기가 아니다. 대신, 약물에 대한 내성과 사이토킨에 대한 변이성 생물학적 반응들은 신규한 치료제를 개발하기 위한 기회를 제공하는 미세환경과의 상호작용에 의해 강력하게 영향을 받는다.

[0007] 다른 많은 종양들처럼, MM은 지지성 환경을 생성하는 비-악성 기질 세포(stroma cell)와 강력하게 상호작용하는 이종성 세포 집단을 특징으로 한다(De Raeve and Vanderkerken, 2005, Histol Histopathol. 20: 1227-50; Dhodapkar, 2009, Am J Hematol. 84:395-6). MM 세포에 대한 BM 미세환경은 다양한 세포외 매트릭스(ECM)와 조혈성 및 비-조혈성 기원 둘 다의 세포 성분으로 이루어진다. BM은 정상적인 조혈과정에 대해 보호된 환경을 제공하는 한편, MM 세포의 ECM 단백질 및 부속 세포와의 상호작용은 MM 발병에 결정적인 역할을 한다(De Raeve and Vanderkerken, 2005, Histol Histopathol. 20: 1227-50; Dhodapkar, 2009, Am J Hematol. 84:395-6; Hideshima et al., 2007, Nat Rev Cancer. 7:585-98). 기질세포, 골수종 세포, 파골세포 및 골아세포는 인터류킨 6(IL-6), B-세포 활성화 인자(BAFF), 섬유아세포 성장 인자 및 MM 세포의 이동, 생존 및 성장을 중재하는 신호 경로를 활성화하는 기질 세포-유도 인자 1a와 같은 성장 인자를 생산한다. 특히, 기질세포, 파골세포 및 골수성 세포에 의해 생성된 IL-6는 MM의 초기 단계의 및 발병에 대해 결정적인 인자인 것 같다(De Raeve and Vanderkerken, 2005, Histol Histopathol. 20: 1227-50). 유사하게, MM 세포와 상호작용할 때, 파골세포 및 수지상 세포는 BAFF 및/또는 증식-유도 리간드(APRIL)를 생성하여 약물 내성을 또한 증가시키는 아폽토시스 신호를 제공한다(De Raeve and Vanderkerken, 2005, Histol Histopathol. 20: 1227-50; Kukreja et al., 2006, J Exp Med. 203: 1859-65).

[0008] 암 발병의 중요한 사건 - 악성 세포의 제어되지 않은 증식, 생존 및 확산 - 은 미세환경 틈새(niche)에 존재하는 지지세포 유형과 가용성 인자들의 특수한 조합에 좌우된다. 마우스 모델은 인간의 악성 변형 및 질병의 원동력의 핵심 측면의 특성을 확인하는 데 중요한 역할을 한다. 그러나 그것들은 인간 질병의 유전적 복합성 및 임상병리적 특성을 제대로 나타내지 못한다. 인간 종양의 면역손상된 마우스로의 이종이식이 광범위하게 사용되어 온 한편, 신뢰할만한 이식은 전형적으로 매우 공격적인 종양 또는 셀라인으로만 실행될 수 있었다.

[0009] 인간 종양 세포를 성장시키기 위해 현재 활용될 수 있는 최상의 모델은 B 세포, T 세포 및 NK 세포가 결핍된 심각하게 면역결핍되어 있다. MM의 경우에, 일차 골수종 세포의 이들 마우스로의 이식은 성공적이지 못하였지만, 일차 골수종 세포는 면역손상된 마우스 안으로 공동-이식될 때 인간 태아 뼈조각을 이식할 수 있다(Yaccoby et al., 1998, Blood 92:2908-13). 이 모델에서 MM 세포는 인간의 뼈에서 발견되지만, 마우스 뼈에서나 말초에서는 검출되지 않는데, 그것은 이종거부가 고도로 남아있고 인간 BM 미세환경에 대한 요구가 있음을 증명한다(Yaccoby et al., 1998, Blood 92:2908-13; Yaccoby and Epstein, 1999, Blood 94:3576-82). MM에 대한 생체 내 모델로서 그것의 잠재력을 제공함으로써, 최근 NOD/Scid/$\gamma c^{-/-}$ 마우스들이 여러 MM 셀라인의 이식을 허용하는 것이 증명되었다(Dewan et al., 2004, Cancer Sci. 95:564-8; Miyakawa et al., 2004, Biochem Biophys Res Commun. 313:258-62). 그러나, 이종거부가 낮은 그런 마우스 모델들도 종 경계를 가로지르지는 못하지만 형질전환된 세포의 성장과 생존을 지지하기 위해서 필수적인 대다수의 인자들에 의해 성장 환경을 제한하였다(Manz, 2007). 종양과 그것의 환경 사이의 복잡한 발병 상호작용을 조사하는 것을 허용하는 생체 내 모델은 새로운 약물 및 치료법을 디자인하기 위해 필수적일 것이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 그러므로 비-인간 동물 및 마우스에서의 일차 인간 조혈 종양 세포를 포함하여 인간 조혈 세포를 신뢰할만하게 성장시키고 연구하기 위한 방법을 개발하기 위한 충족되지 못한 요구가 존재한다. 본 발명은 해당 기술분야의 이런 충족되지 못한 요구들을 해결한다.

과제의 해결 수단

[0011] 발명의 요약

[0012] 인간 조혈 세포 발달, 기능 또는 질병을 모델화하기 위해 사용될 수 있는 유전자 변형된 비-인간 동물이 제공된다. 유전자 변형된 비-인간 동물은 *IL-6* 프로모터에 작동가능하게 연결된 인간 IL-6를 코드화하는 핵산을 포함한다. 어떤 경우에, 인간 IL-6를 발현하는 유전자 변형된 비-인간 동물은 또한 인간 M-CSF, 인간 IL-3, 인간 GM-CSF, 인간 SIRPa 또는 인간 TPO 중 적어도 하나를 발현한다. 어떤 경우에 유전자 변형된 비-인간 동물은 면역결핍성이다. 그런 어떤 경우에 유전자 변형된 비-인간 동물은 건강한 또는 질병이 있는 인간 조혈 세포로 이식된다. 또한 본 발명의 유전자 변형된 비-인간 동물을 인간 조혈 세포 발달, 기능 및/또는 질병의 모델화에 사용하기 위한 방법과, 그뿐만 아니라 본 발명의 유전자 변형된 비-인간 동물을 제조하고 및/또는 그 방법을 실시하는 데 사용되는 시약 및 그것의 키트가 제공된다.

[0013] 발명의 다양한 측면으로, 유전자 변형된 비-인간 동물이 제공되는데, 그 유전자 변형된 비-인간 동물은 *IL-6* 프로모터에 작동가능하게 연결된 인간 IL-6를 코드화하는 핵산을 포함하는 게놈을 포함하고, 이때 동물은 *IL-6* 프로모터의 조절성 제어 하에 인간 IL-6 폴리펩티드를 발현한다. 어떤 구체예에서, 유전자 변형된 비-인간 동물은 동물의 원래의 IL-6를 발현하지 않는다.

[0014] 어떤 구체예에서, 유전자 변형된 비-인간 동물은 설치류이다. 어떤 구체예에서, 비-인간 동물은 마우스이다. 그런 어떤 구체예에서, 인간 IL-6를 코드화하는 핵산에 작동가능하게 연결되는 *IL-6* 프로모터는 마우스 *IL-6* 프로모터이고, 인간 IL-6 유전자는 마우스 *IL-6* 유전자좌에서 마우스 *IL-6* 프로모터에 작동가능하게 연결된다.

[0015] 어떤 구체예에서, 유전자 변형된 비-인간 동물은 *SIRPa* 프로모터의 제어 하에 인간 SIRPa를 코드화하는 핵산; *M-CSF* 프로모터에 작동가능하게 연결된 인간 M-CSF를 코드화하는 핵산(이때 동물은 인간 M-CSF를 발현함); *IL-3* 프로모터에 작동가능하게 연결된 인간 IL-3를 코드화하는 핵산(이때 동물은 인간 IL-3를 발현함); *GM-CSF* 프로모터에 작동가능하게 연결된 인간 GM-CSF를 코드화하는 핵산(이때 동물은 인간 GM-CSF를 발현함); 및 *TPO* 프로모터에 작동가능하게 연결된 인간 TPO를 코드화하는 핵산(이때 동물은 인간 TPO를 발현함)으로부터 선택된 하나 또는 그 이상의 추가의 핵산을 더 포함한다. 어떤 구체예에서, 프로모터는 유전자에 대한 인간 프로모터이다. 다른 구체예에서, 프로모터는 유전자에 대한 비-인간 동물 프로모터이다. 어떤 구체예에서, 유전자 변형된 비-인간 동물은 동물의 해당하는 천연 단백질을 발현한다. 다른 구체예에서, 유전자 변형된 비-인간 동물은 동물의 해당하는 천연 단백질을 발현하지 않는다.

[0016] 어떤 구체예에서, 유전자 변형된 비-인간 동물은 비-인간 동물 면역 시스템에 대해 면역결핍성이다. 그런 어떤 구체예에서, 면역결핍성 유전자 변형된 비-인간 동물은 재조합 활성화 유전자(RAG)를 발현하지 않는다. 그러한 어떤 구체예에서, 면역결핍성 유전자 변형된 비-인간 동물은 IL2 수용체 감마 사슬(IL2rg 또는 "γc")을 발현하지 않는다. 그러한 어떤 구체예에서, 면역결핍성 유전자 변형된 비-인간 동물은 RAG(예컨대 RAG1, RAG2) 또는 IL2rg 중 어느 것도 발현하지 않는다.

[0017] 어떤 구체예에서, 면역결핍성 유전자 변형된 비-인간 동물은 인간 조혈 세포가 이식되어 유전자 변형되고 이식된 비-인간 동물이 형성된다. 한 구체예에서, 인간 조혈 세포는 인간 제대혈 세포, 인간 태아 간세포 및 인간 조혈 세포 셀라인의 세포로부터 선택된다. 한 구체예에서, 인간 조혈 세포는 CD34+ 전구세포이다. 한 구체예에서, 인간 조혈 세포는 암세포이다. 특정 구체예에서, 암세포는 인간 다발성 골수종 세포이다.

[0018] 어떤 구체예에서, 유전자 변형되고 이식된 동물은 CD34+ 세포, 조혈 줄기세포, 조혈 세포, 골수성 전구 세포, 골수성 세포, 수지상 세포, 단핵세포, 과립구, 호중구, 비만 세포, 흉선 세포, T 세포, B 세포, 혈장 세포, 혈소판 세포 및 그것들의 조합으로부터 선택된 인간 세포에 대해 발생한다. 한 구체예에서, 인간 세포는 이식 후 1개월 째에, 2개월 째에, 3개월 째에, 4개월 째에, 5개월에, 6개월에, 7개월에, 8개월에, 9개월에, 10개월에, 11개월에 또는 12개월에 존재한다.

[0019] 어떤 구체예에서, 유전자 변형되고 이식된 동물은 인간 조혈 줄기 및 전구 세포, 인간 골수성 전구 세포, 인간 골수성 세포, 인간 수지상 세포, 인간 단핵세포, 인간 과립구, 인간 호중구, 인간 비만 세포, 인간 흉선 세포, 인간 T 세포, 인간 B 세포, 인간 혈장 세포 및 인간 혈소판 세포를 포함하는 인간 혈구-림프구 시스템에 대해

발생한다. 한 구체예에서, 인간 혈구-림프구 시스템은 이식 후 4개월 째에, 5개월에, 6개월에, 7개월에, 8개월에, 9개월에, 10개월에, 11개월에 또는 12개월에 존재한다.

[0020] 발명의 어떤 측면으로, 인간 조혈 세포로 이식된 비-인간 동물의 제조 방법이 제공된다. 어떤 구체예에서, 인간 면역 세포 발달 및 기능의 동물 모델을 생성하기 위한 방법이 제공된다. 특정 구체예에서, 인간 B 세포 발달 및 기능의 동물 모델을 생성하기 위한 방법이 제공된다.

[0021] 어떤 구체예에서, 방법은 면역결핍성이고 IL-6 프로모터에 작동가능하게 연결된 인간 IL-6를 코드화하는 핵산을 발현하는 유전자 변형된 비-인간 동물에 인간 조혈 세포의 집단을 이식하는 것을 포함한다. 어떤 구체예에서, 동물은 천연 IL-6를 발현하지 않는다. 어떤 구체예에서, IL-6 프로모터는 비-인간 동물 IL-6 프로모터이고, 인간 IL-6 유전자는 비-인간 동물 IL-6 유전자좌에서 비-인간 동물 IL-6 프로모터에 작동가능하게 연결된다. 어떤 구체예에서, 비-인간 동물은 설치류이다. 그러한 어떤 구체예에서, 비-인간 동물은 마우스이다. 그러한 어떤 구체예에서, 인간 IL-6를 코드화하는 핵산이 작동가능하게 연결되어 있는 IL-6 프로모터는 마우스 *IL-6* 프로모터이고, 인간 IL-6 유전자는 마우스 *IL-6* 유전자좌에서 마우스 *IL-6* 프로모터에 작동가능하게 연결된다.

[0022] 어떤 구체예에서, 이식된 조혈 세포 집단은 CD34+ 세포를 포함한다. 어떤 구체예에서, 이식된 조혈 세포 집단은 암세포를 포함한다. 어떤 구체예에서, 이식된 암세포 집단은 다발성 골수종 세포를 포함한다. 어떤 구체예에서, 이식은 대퇴골 내 및/또는 경골부 내 주사를 포함한다.

[0023] 어떤 구체예에서, 면역결핍성이고, 유전자 변형된 동물은 SIRPa 프로모터에 작동가능하게 연결된 인간 SIRPa를 코드화하는 핵산; M-CSF 프로모터에 작동가능하게 연결된 인간 M-CSF를 코드화하는 핵산; IL-3 프로모터에 작동가능하게 연결된 인간 IL-3를 코드화하는 핵산; GM-CSF 프로모터에 작동가능하게 연결된 인간 GM-CSF를 코드화하는 핵산; 및 TPO 프로모터에 작동가능하게 연결된 인간 TPO를 코드화하는 핵산으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 추가의 인간 핵산을 발현한다.

[0024] 발명의 어떤 측면으로, IL-6 프로모터에 작동가능하게 연결된 인간 IL-6를 코드화하는 핵산을 발현하는 이식되고, 유전자 변형된 비-인간 동물이 제공되고, 이들 이식된 비-인간 동물은 본원에 기술된 또는 해당 기술분야에 공지되어 있는 것과 같은 방법에 따라 제조되었다. 어떤 구체예에서, 이식되고, 유전자 변형된 비-인간 동물은 인간 B 세포 발달 및 분화의 동물 모델이다.

[0025] 다양한 구체예에서, 본 발명의 인간 조혈 세포로 이식되고, 유전자 변형된 비-인간 동물의 사용을 포함하는 방법들이 제공된다. 이들 방법은 예를 들면 조혈 및 면역 세포의 성장 및 분화의 생체 내 평가 방법, 암세포의 생체 내 평가 방법, 면역 반응의 생체 내 평가 방법, 백신과 백신접종 양생법의 생체 내 평가 방법, 암세포 성장 또는 생존을 조절하는 제제의 효과의 시험에 사용하는 방법, 암치료의 생체 내 평가 방법 및 인간 항체를 포함하여 면역 조절제의 생체 내 생성 및 수집을 위한 방법, 및 조혈 및 면역 세포 기능을 조절하는 제제의 효과를 시험하는 데 사용하기 위한 방법들을 포함한다. 예를 들어 어떤 구체예에서, 조혈 세포 암을 치료하는 능력에 대해 후보 제제들을 선별하기 위한 방법들이 제공된다. 어떤 구체예에서, 방법은 인간 조혈 암세포로 이식되어 있는 본 발명의 유전자 변형된 비-인간 동물을 후보 제제와 접촉시키고, 유사하게 이식되고, 유전자 변형되었지만 후보 제제와 접촉하지 않은 비-인간 동물에 대해 접촉된 이식되고, 유전자 변형된 비-인간 동물에서 인간 조혈 암세포의 생존력 및/또는 증식 속도를 비교하는 것을 포함하고, 이때 접촉되고 이식된, 비-인간 동물의 인간 조혈 암세포의 생존력 및/또는 증식 속도의 감소는 후보 제제가 조혈 세포 암을 치료할 것임을 가리킨다. 이들 및 다른 방법들은 본 발명으로부터 통상적으로 숙련된 기술자들에게 명백해질 것이다.

도면의 간단한 설명

[0026] 발명의 바람직한 구체예의 다음의 상세한 설명은 첨부된 도면과 함께 읽을 때 더 잘 이해될 것이다. 통상적인 실시에 따르면, 도면의 다양한 특징들은 일정한 비율이 아니라는 것이 강조된다. 반대로, 다양한 특징의 치수는 명확성을 위해 임의로 확대되거나 감소된다. 본 발명을 설명할 목적을 위해서, 현재 바람직한 구체예는 도면에 나타난다. 그러나, 본 발명은 도면에 나타난 구체예의 정확한 배열 및 수단에 제한되지 않는 것으로 이해되어야 한다. 다음의 도면들이 도면에 포함된다.

도 1은 인간 IL-6 녹-인 마우스(knock-in mouse)에 INA-6의 이식을 증명하는 실험 결과를 보여주는 그래프 세트이다. $5x10^6$ INA-6 세포로 정맥 내로 이식된 표시된 유전자형의 마우스에서 가용성 IL-6R 수준이 측정되었다. n은 그룹당 이식된 마우스의 수를 나타낸다.

도 2는, 도 2a부터 도 2f를 포함하며, INA-6 세포의 정맥 내 이식 후에 대퇴골의 조직학적 분석을 보여주는 영

상의 세트이다. Rag2$^{-/-}$I12rg^{null}I16$^{h/h}$hSIRPa+ 마우스를 5x10^{6}의 INA-6 세포를 정맥 내로 이식한 후 8주 후에 희생시켰다. 대퇴골은 10%의 포르말린에 고정되고 칼슘이 제거되었다. 10㎛의 단편이 톨루이딘 블루로 염색되거나 직접 GFP 발현에 대해 Leica 공초점 현미경을 사용하여 분석되었다.

도 3은 INA-6 세포의 정맥 내 이식 후 폐의 분석을 보여주는 영상 및 그래프의 세트이다. Rag2$^{-/-}$I12rg^{null}I16$^{h/h}$hSIRPa+ 마우스를 5x10^{6}의 INA-6 세포를 이식한 후 8주 후에 희생시켰다. 폐 조직은 10% 포르말린에 고정되었고, 10㎛의 단편이 GFP 발현에 대하여 Leica 공초점 현미경을 사용하여 직접 분석되었다. 영상(좌측)은 단편의 10X(상부) 및 63X(하부) 배열을 나타낸다. 그래프(우측)는 표시된 조직에서 측정되고 쥐 hprt 발현으로 표준화된 인간 116 유전자 발현을 나타낸다.

도 4는 인간 IL-6 녹-인 마우스에 INA-6 세포의 이식을 증명하는 실험 결과는 나타내는 그래프 세트이다. 5x10^{5} INA-6 세포로 대퇴부 내로 이식된 표시된 유전자형의 마우스에서 가용성 IL-6R 수준이 측정되었다. 각 선은 개별 마우스를 나타낸다.

도 5는 INA-6 세포의 대퇴골 내 이식 후 대퇴골의 조직학적 분석을 보여주는 영상 세트이다. Rag2$^{-/-}$I12rg^{null}I16$^{h/h}$hSIRPa+ 마우스를 5x10^{5}의 INA-6 세포를 대퇴골 내로 이식한 후 4 내지 6주 후에 희생시켰다. 대퇴골은 10%의 포르말린에 고정되고 칼슘이 제거되었다. 10㎛의 단편이 톨루이딘 블루로 염색되었다.

도 6은 INA-6 이식 후 쥐 대퇴골의 μCT 분석 결과를 보여주는 영상 및 글프의 세트이다. Rag2$^{-/-}$I12rg^{null}I16$^{h/h}$hSIRPa+ 및 대조 마우스들을 5x10^{5}의 INA-6 세포의 대퇴부 내 주사로 이식한 후 4주 후에 희생시켰다. 대퇴골을 70%의 에탄올에 고정시키고 쥐 μCT를 사용하여 분석하였다. 섬유주 뼈와 조직 부피를 뼈와 조직 부피 사이의 비율을 계산하기 위해 정량하였다. *:p<0.01, 학생 t-시험에 의함.

도 7은 항-골수종 약물로 처리한 후 쥐 대퇴골의 μCT 분석 결과를 보여주는 그래프이다. Rag2$^{-/-}$I12rg^{null}I16$^{h/h}$hSIRPa+를 5x10^{5}의 대퇴부 내에 주사된 INA-6 세포로 이식시키고 Velcade® or Zometa®로 각각 격주로 처리하였다. 4주 후에, 마우스들을 희생시키고 대퇴골을 70% 에탄올에 μCT 분석을 위해 고정시켰다. 섬유주 뼈와 조직 부피를 정량하여 뼈와 조직 부피 사이의 비율을 계산하였다.

도 8은 Rag2$^{-/-}$I12rg^{null}hSIRPa^{+}Tpo$^{h/h}$ Mcsf$^{h/h}$ I13/Gmcsf$^{h/h}$ I16$^{h/h}$ 마우스에서 일차 세포 이식의 FACS 분석 결과를 보여주는 그래프 세트이다. 마우스들을 1.5x10^{6}의 대퇴부 내 주사된 CD3-고갈된 골수 세포로 이식시키고 12주 후에 희생시켰다. 단일 세포 현탁액을 주사된 대퇴골, 부행 다리 및 비장으로부터 만들었다. mCD45, hCD19, hCD39 및 hCD138에 대해 세포를 염색하였다. FACS 도표는 mCD45-네거티브 세포에 대한 게이팅 후 사건을 나타낸다. 수는 CD38+CD138+ 세포의 빈도를 나타낸다.

도 9는 유동 세포분석에 의해 측정된, 이식된 마우스의 혈액 중의 인간 조혈(hCD45+) 세포의 백분율을 평가하는 실험의 결과를 도시한다. 수평 막대는 각각의 평균 빈도를 나타낸다.

도 10은 유동 세포분석에 의해 측정된, 이식된 마우스의 혈액 중의 B의 CD45(CD 19+), T(CD3+) 및 골수성(CD33+) 세포의 백분율을 평가하는 실험의 결과를 도시한다. 2%보다 높은 hCD45 백분율을 가지는 마우스들만이 도시된다.

도 11은, 도 11A와 도 11B를 포함하며, 이식후 20주령 마우스의 BM, 비장 및 흉선의 인간 CD45+ 세포의 백분율(A) 및 수(B)를 평가하는 실험 결과를 도시한다. 막대는 그룹단 4/5 마우스의 평균±SEM을 나타낸다.

도 12는, 도 12A와 도 12B를 포함하며, 인간 세포를 평가하는 FACS 실험 결과를 도시한다. (A) 세포 유동분석에 의해 상이한 B 세포 집단을 분리하기 위해 사용된 게이팅 전략을 나타내는 도면. (B) 20주령 마우스의 인간 CD45+CD19+ 세포 안의 상이한 B 세포 하위세트의 백분율. 막대는 그룹에 대해 4/5 마우스의 평균±SEM을 나타낸다.

도 13은, 도 13A와 도 13B를 포함하며, 인간 세포를 평가하는 FACS 실험 결과를 도시한다. (A) 인간 태아 간(FL)과 20주령의 마우스에서 CD5+ B 세포의 대표적인 유동 세포분석. 사분면의 숫자들은 세포의 백분율을 나타낸다. 모든 도표는 인간 CD45+ 세포 상에서 게이팅된다. (B) 이식 후 20주 지난 마우스의 BM과 비장의 인간 B 세포 상의 CD5의 백분율. 막대는 그룹당 4/5 마우스의 평균±SEM을 나타낸다.

도 14는 인간 세포를 평가하는 FACS 실험의 결과를 도시한다. (A) 인간 태아 간(FL) 및 20주령 마우스에서의 대표적인 CD27+B 세포의 유동 세포분석. 사분면의 숫자들은 세포의 백분율을 나타낸다. 모든 도표는 인간 CD45+ 세포 상에서 게이팅된다. (B) 이식 후 20주 지난 마우스의 BM과 비장의 인간 B 세포 상의 CD27의 백분율. 막대는 그룹당 4/5 마우스의 평균±SEM을 나타낸다.

도 15는 12(A) 및 20(B)주령 마우스의 혈장 샘플 중의 총 인간 IgM 및 IgG 수준을 평가하는 실험 결과를 도시한다. 수평 막대는 각각의 기하학적 평균을 나타낸다. 2%보다 낮은 PB 인간 이식을 가지는 마우스는 분석에서 배제되었다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0027] 인간 조혈 세포 발달, 기능 또는 질병을 모델화하기 위해 사용될 수 있는 유전자 변형된 비-인간 동물이 제공된다. 유전자 변형된 비-인간 동물은 IL-6 프로모터에 작동가능하게 연결된 인간 IL-6를 코드화하는 핵산을 포함한다. 어떤 구체예에서, 인간 IL-6를 발현하는 유전자 변형된 비-인간 동물은 또한 인간 M-CSF, 인간 IL-3, 인간 GM-CSF, 인간 SIRPa 또는 인간 TPO 중 적어도 하나를 발현한다. 본 발명은 또한 본원에 설명된 유전자 변형된 비-인간 동물의 제조 방법 및 사용 방법에도 관련된다. 어떤 구체예에서, 유전자 변형된 비-인간 동물은 마우스이다. 어떤 구체예에서, 본원에 기술된 유전자 변형된 비-인간 동물은 정상 또는 신생 세포, 또는 그것들의 조합을 포함하여 인간 조혈 세포로 이식된다. 어떤 구체예에서, 본원에 기술된 유전자 변형된 비-인간 동물은 인간 다발성 골수종(MM) 세포로 이식된다. 다양한 구체예에서, 본 발명의 인간 조혈 세포 이식된, 유전자 변형된 비-인간 동물은 조혈 및 면역 세포의 성장 및 분화의 생체 내 평가를 위해, 인간 조혈의 생체 내 평가를 위해, 암 세포의 생체 내 평가를 위해, 면역 반응의 생체 내 평가를 위해, 백신 및 백신접종 양생법의 생체 내 평가를 위해, 암세포 성장 또는 생존을 조절하는 제제의 효과를 시험하는 데 사용하기 위해, 암 치료의 생체 내 평가를 위해, 인간 항체를 포함하여 면역 조절제의 생체 내 생성 및 수집을 위해, 및 조혈 및 면역 세포 기능을 조절하는 제제들의 효과를 시험하는 데 사용하기 위해 유용하다.

[0028] 본 발명의 이들 및 다른 목적, 장점 및 특징들은 아래에서 보다 상세하게 기술되는 것과 같은 조성물 및 방법의 상세한 설명을 읽을 때 해당 기술분야의 숙련자들에게 명백해질 것이다.

[0029] 정의

[0030] 다르게 정의되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술적이고 과학적인 용어들은 본 발명이 속하는 해당 기술분야의 통상적인 숙련자에 의해 보편적으로 이해되는 것과 같은 의미를 가진다. 그런 용어들은 다양한 다음의 표준 참고문헌에서 맥락적으로 정의되고 사용된다: J. Sambrook and D. W. Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press; 4th Ed., 2012; 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; and Herdewijn, P. (Ed.), Oligonucleotide Synthesis: Methods and Applications, Methods in Molecular Biology, Humana Press, 2004. 비록 본원에 기술된 것들과 유사하거나 동등한 어떠한 방법 및 재료들이 본 발명의 실시 또는 시험에 사용될 수 있긴 하지만, 바람직한 방법 및 재료가 기술된다.

[0031] 본원에서 사용된 것과 같이, 다음의 용어들의 각각은 본 단원에서 그것과 관련된 의미를 가진다.

[0032] 하나를 나타내는 용어들은 본원에서 그 물품의 문법학상의 대상의 하나 또는 하나보다 많은(즉 적어도 하나)를 나타내기 위해 사용된다. 예를 들자면, "요소"는 한 개의 요소 또는 하나보다 많은 요소를 의미한다.

[0033] 양, 일시적 기간 등과 같은 측정가능한 값을 나타낼 때 본원에서 사용되는 것과 같은 "약"은 어떠한 변동이 개시된 방법을 수행하기에 적절하기만 하면 명시된 값으로부터 ±20% 또는 ±10%, 보다 바람직하게는 ±5%, 보다 더 바람직하게는 ±1%, 더욱 바람직하게는 ±0.1%의 변동폭을 포함하는 것을 의미한다.

[0034] 용어 "비정상"은 유기체, 조직, 세포 또는 그것들의 조합의 맥락에서 사용될 때, "정상적인"(예상되는) 각각의 특징을 나타내는 그런 유기체, 조직, 세포 또는 그것들의 성분으로부터 적어도 하나의 관찰가능하거나 검출가능한 특징(예컨대 연령, 치료, 경과일 등)이 상이한 그런 유기체, 조직, 세포 또는 그것들의 성분을 포함한다. 하나의 세포 또는 조직 유형에 대해 정상적인 또는 예상되는 특징들은 상이한 세포 또는 조직 유형에 대해서는 비정상일 것이다.

[0035] 용어 "항체"는 본원에서 사용되는 바, 항원상의 특이한 에피토프에 특이적으로 결합할 수 있는 면역글로불린 분

자를 포함한다. 항체는 천연 공급원으로부터 또는 재조합 공급원으로부터 유도된 무상 면역글로불린일 수 있고, 무상 면역글로불린의 면역반응성 부분일 수 있다. 본 발명의 항체는 예를 들면 다클론성 항체, 단클론성 항체, 세포내 항체("인트라바디"), Fv, Fab 및 F(ab)2, 뿐만 아니라 단일 사슬 항체(scFv), 중쇄 항체, 예컨대 카멜리드 항체 및 인간화된 항체를 포함하여 다양한 형태로 존재할 수 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).

[0036] "구성성" 발현은 유전자 생성물이 세포의 대부분의 또는 모든 생리적 조건 하에서 살아있는 세포에서 생성되는 상태를 포함한다.

[0037] 유전자의 "코딩 영역"은 유전자의 코딩 가닥의 뉴클레오티드 잔기와 그것과 상동성인 또는 그것에 상보하는 유전자의 비-코딩 가닥의 뉴클레오티드를 각각 포함하며, mRNA 분자의 코딩 영역은 유전자의 전사에 의해 생성된다. mRNA 분자의 "코딩 영역"은 또한 mRNA 분자의 번역 중에 트랜스퍼 RNA 분자의 안티-코돈 영역과 매치되거나 또는 중지 코돈을 코드화하는 mRNA 분자의 뉴클레오티드 잔기를 포함한다. 그러므로 코딩 영역은 mRNA 분자에 의해 코드화되는 성숙한 단백질에는 존재하지 않는 아미노산 잔기(예컨대 단백질 수출 신호 서열)에 대한 코돈을 포함하는 뉴클레오티드 잔기를 포함할 수 있다.

[0038] "질병"은 동물이 항상성을 유지할 수 없고, 만약 질병이 개선되지 않는다면 동물의 건강이 계속해서 악화되는 동물의 건강 상태를 포함한다.

[0039] 대조적으로, 동물의 "장애"는 동물이 항상성을 유지할 수는 있지만, 동물의 건강상태가 장애가 없을 때보다는 덜 바람직한 건강 상태를 포함한다. 치료되지 않는 상태로 두어도, 장애는 반드시 동물의 건강 상태의 추가의 감소를 유발하지는 않는다.

[0040] 질병 또는 장애는 그 질병 또는 장애의 증상의 심각성, 그런 증상을 환자가 경험하는 빈도, 또는 그 둘 다가 감소되면 "완화된"다.

[0041] 화합물의 "유효량" 또는 "치료적 유효량"은 그 화합물이 투여되는 대상에게 유익한 효과를 제공하기에 충분한 화합물의 양을 포함한다. 전달 비히클의 "유효량"은 화합물에 효과적으로 결합하거나 전달하기에 충분한 양을 포함한다.

[0042] "코드화"는 생물학적 과정에서 뉴클레오티드의 정의된 서열(즉 rRNA, tRNA 및 mRNA) 또는 아미노산의 정의된 서열 중 하나 및 그것으로부터 유발되는 생물학적 특성을 가지는 다른 중합체 및 매크로분자의 합성을 위한 주형으로서 작용하는 폴리뉴클레오티드의 뉴클레오티드의 특수한 서열, 예컨대 유전자, cDNA 또는 mRNA의 고유한 특성을 포함한다. 그러므로, 유전자는 만약 예를 들어 그 유전자에 해당하는 mRNA의 전사 및 번역이 세포 또는 다른 생물학적 시스템에서 단백질을 생성하면 단백질을 코드화한다. 코딩 가닥은 그것의 뉴클레오티드 서열이 mRNA 서열에 동일하고 통상 서열 목록으로 제공되며, 유전자 또는 cDNA의 전사를 위한 주형으로서 사용된 비-코딩 가닥은 그 유전자 또는 cDNA의 단백질 또는 다른 생성물을 코드화하는 것으로서 언급될 수 있다.

[0043] 본원에서 사용된 것과 같이 "내인성"은 유기체, 세포, 조직 또는 시스템 내부로부터 또는 내부에서 생성되는 어떠한 물질을 포함한다.

[0044] 본원에서 사용된 것과 같이, 용어 "외인성"은 유기체, 세포, 조직 또는 시스템으로부터 도입되거나 외부에서 생성된 어떠한 물질을 포함한다.

[0045] 본원에서 사용된 것과 같은 용어 "발현 구성물" 및 "발현 카세트"는 원하는 핵산 인간 코딩 서열을 함유하고 작동가능하게 연결된 코딩 서열의 발현에 필요하거나 바람직한 하나 또는 그 이상의 조절 요소를 함유하는 이중 가닥의 재조합 DNA 분자를 포함한다.

[0046] 본원에서 사용되는 것과 같이, 용어 "단편"은 핵산 또는 폴리펩티드에 적용되는 바, 더 큰 핵산 또는 폴리펩티드의 하위서열을 포함한다. 핵산의 "단편"은 길이가 적어도 약 15 뉴클레오티드일 수 있고; 예를 들면 적어도 약 50 뉴클레오티드 내지 약 100 뉴클레오티드, 적어도 약 100 내지 약 500 뉴클레오티드, 적어도 약 500 내지 약 1000 뉴클레오티드, 적어도 약 1000 뉴클레오티드 내지 약 1500 뉴클레오티드; 또는 약 1500 뉴클레오티드 내지 약 2500 뉴클레오티드; 또는 약 2500 뉴클레오티드(및 그 사이의 어떠한 정수의 값)일 수 있다. 폴리펩티드의 "단편"은 길이가 적어도 약 15 뉴클레오티드일 수 있고; 예를 들면 적어도 약 50 아미노산 내지 약 100 아미노산, 적어도 약 100 내지 약 500 아미노산, 적어도 약 500 내지 약 1000 아미노산, 적어도 약 1000 아미노산

내지 약 1500 아미노산; 또는 약 1500 아미노산 내지 약 2500 아미노산; 또는 약 2500 아미노산(및 그 사이의 어떠한 정수의 값)일 수 있다.

[0047] 본원에서 사용된 것과 같이, 용어 "유전자" 및 "재조합 유전자"는 폴리펩티드를 코드화하는 오픈 리딩 프레임을 포함하는 핵산 분자를 포함한다. 그런 천연 대립유전자 변이는 전형적으로 주어진 유전자의 뉴클레오티드 서열의 1 내지 5% 변동을 초래할 수 있다. 또 다른 대립유전자는 대다수의 상이한 개체의 관심의 유전자를 서열화함으로써 확인될 수 있다. 이것은 다양한 개체의 동일한 유전적 유전자좌를 확인하기 위한 혼성화 프로브를 사용함으로써 쉽게 수행될 수 있다. 어떠한 및 모든 그러한 뉴클레오티드 변이 및 그 결과 생성되는 천연 대립유전자 변이의 결과이고 기능적 활성을 변경시키지 않는 아미노산 다형태 또는 변이는 본 발명의 범주 내에 속하는 것으로 의도된다.

[0048] 본원에서 사용되는 것과 같은 "상동성"은 두 개의 중합체 분자 사이, 예컨대 두 개의 핵산 분자, 예를 들면 두 개의 DNA 분자 또는 두 개의 RNA 분자 사이, 또는 두 개의 폴리펩티드 분자 사이의 하위유닛 서열 유사성을 포함한다. 두 개의 분자 둘 다에서 하위유닛 위치가 동일한 단량체 하위유닛에 의해 차지될 때, 예를 들어 만약 두 개의 DNA 분자 각각의 위치가 아데닌에 의해 차지된다면, 그것들은 그 위치에서 상동한다. 두 개의 서열 간의 상동성은 매치하는 또는 상동하는 위치의 수의 직접적인 함수이고, 예를 들어 두 개의 화합물 서열의 절반(예컨대 길이가 10 하위유닛인 중합체의 5개 위치)이 상동성이면, 두 개의 서열은 50% 상동하는 것이고, 위치의 90%, 예컨대 10개 중 9개가 메치되거나 상동하면, 두 개의 서열은 90%의 상동성을 공유한다. 실례를 들면 DNA 서열 5'-ATTGCC-3'과 5'-TATGGC-3'은 50%의 상동성을 공유한다.

[0049] 본원에 사용되는 것과 같은 용어 "인간 조혈 줄기 및 전구 세포" 및 "인간 HSPC"는 인간 자체-재생 다분화능 조혈 줄기 세포 및 조혈 전구 세포"를 포함한다.

[0050] "유도성" 발현은 유전자 생성물이 세포에서 신호의 존재에 대한 반응으로 살아있는 세포에서 생성된 상태를 포함한다.

[0051] 본원에서 사용되는 것과 같이, "교육용 자료"는 본원에서 열거한 다양한 질병 또는 장애의 완화를 실시하기 위해 키트에서 본 발명의 화합물, 조성물, 벡터 또는 전달 시스템의 유용성을 전달하기 위해 사용될 수 있는 공보, 기록, 다이아그램 또는 어떠한 다른 표현 매체를 포함한다. 임의로, 또는 다르게는, 교육용 자료는 포유류의 세포 또는 조직의 질병 또는 장애를 완화시키는 하나 또는 더 많은 방법을 기술할 수 있다. 본 발명의 키트의 교육용 자료는 예를 들면 본 발명의 확인된 화합물, 조성물, 벡터 또는 전달 시스템을 함유하는 용기에 첨부되거나 또는 확인된 화합물, 조성물, 벡터 또는 전달 시스템을 함유하는 용기와 함께 배송될 수 있다. 다르게는, 교육용 자료는 교육용 자료 및 화합물이 수령인에 의해 협력적으로 사용될 의도로 용기와는 별도로 배송될 수 있다.

[0052] 용어 "핵산"은 단일-가닥, 이중-가닥, 올리고뉴클레오티드 또는 폴리뉴클레오티드를 포함하여 어떠한 형태로든지 하나 이상의 뉴클레오티드를 가지는 RNA 또는 DNA 분자를 포함한다. 용어 "뉴클레오티드 서열"은 핵산의 단일-가닥 형태의 올리고뉴클레오티드 또는 폴리뉴클레오티드의 뉴클레오티드의 순서를 포함한다.

[0053] 본원에서 사용된 것과 같은 용어 "작동가능하게 연결된"은 두 번째 폴리뉴클레오티드와 기능적인 관계에 있는 폴리뉴클레오티드, 예를 들면 두 개의 폴리뉴클레오티드 중 적어도 하나가 폴리뉴클레오티드를 특징짓는 생리적 효과를 발휘할 수 있게 하는 방식으로 핵산 부분 내에 배치된 두 개의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 단일 가닥 또는 이중 가닥 핵산을 포함한다. 실례를 들면, 유전자의 코딩 영역에 작동가능하게 연결된 프로모터는 코딩 영역의 전사를 촉진할 수 있다. 바람직하게는, 원하는 단백질을 코드화하는 핵산이 추가로 프로모터/조절 서열을 포함할 때, 그 프로모터/조절 서열은 그것이 세포에서 원하는 단백질의 발현을 구동하도록 원하는 단백질 코딩 서열의 5' 단부에 위치한다. 원하는 단백질을 코드화하는 핵산과 그것의 프로모터/조절 서열은 함께 "이식유전자"를 포함한다.

[0054] 본원에서 사용된 것과 같은 용어 "폴리뉴클레오티드"는 뉴클레오티드의 사슬을 포함한다. 나아가, 핵산은 뉴클레오티드의 중합체이다. 그러므로 본원에서 사용되는 것과 같은 핵산과 폴리뉴클레오티드는 상호교환적이다. 해당 기술분야의 숙련자는 일반적으로 핵산이 폴리뉴클레오티드이고, 그것은 단량체 "뉴클레오티드"로 가수분해될 수 있다는 것을 알고 있다. 단량체 뉴클레오티드는 뉴클레오시드로 가수분해될 수 있다. 본원에서 사용되는 것과 같이, 폴리뉴클레오티드는 그것들에 한정되는 것은 아니지만, 해당 기술분야에서 활용될 수 있는 어떠한 수단에 의해서든지, 이를테면, 제한 없이, 재조합 수단, 즉 재조합 라이브러리 또는 세포 게놈으로부터 통상적인 클로닝 기술 및 PCR을 사용한 핵산 서열의 클로닝 등에 의해, 및 합성 수단에 의해 얻어진 모든 핵산 서열을 포

함한다.

[0055] 본원에 사용된 것과 같은 용어 "펩티드", "폴리펩티드" 및 "단백질"은 상호교환적으로 사용되며, 펩티드 결합에 의해 공유적으로 연결된 아미노산 잔기들로 구성된 화합물을 포함한다. 단백질 또는 펩티드는 적어도 2개의 아미노산을 함유해야 하며, 단백질 또는 펩티드 서열을 포함할 수 있는 아미노산의 최대수에 제한은 없다. 폴리펩티드는 펩티드 결합에 의해 상호 결합된 둘 또는 더 많은 아미노산을 포함하는 어떠한 펩티드 또는 단백질을 포함한다. 본원에서 사용되는 것과 같이, 이 용어는 통상 해당 기술분야에서 펩티드, 올리고펩티드 및 올리고머로 언급된 짧은 사슬과, 그것들의 유형이 많이 있는 더 긴 사슬 둘 다를 포함한다. "폴리펩티드"는 예를 들면, 다른 것들 중에서도, 생물학적 활성 단편, 실질적으로 상동하는 폴리펩티드, 올리고펩티드, 동종이량체, 이종이량체, 폴리펩티드의 변이체, 변형 폴리펩티드, 유도체, 유사체, 융합 단백질을 포함한다. 폴리펩티드는 천연 펩티드, 재조합 펩티드, 합성 펩티드 또는 그것들의 조합을 포함한다. 용어 "펩티드"는 전형적으로 짧은 폴리펩티드를 말한다. 용어 "단백질"은 전형적으로 큰 폴리펩티드를 말한다.

[0056] 본원에서 사용되는 것과 같은 용어 "자손"은 후대 또는 새끼를 포함하며, 모(parent) 세포로부터 유도된 분화되거나 분화되지 않은 후대 세포를 포함한다. 한 용법에서, 용어 자손은 모와 유전적으로 동일한 후대 세포를 포함한다. 다른 용도에서 용어 자손은 모와 유전학적으로 및 표현형으로 동일한 후대 세포를 포함한다. 또 다른 용법에서 용어 자손은 모 세포로부터 분화된 후대 세포를 포함한다.

[0057] 본원에서 사용된 것과 같은 용어 "프로모터"는 전사될 핵산 서열, 예컨대 원하는 분자를 코드화하는 핵산 서열에 작동가능하게 연결된 DNA 서열을 포함한다. 프로모터는 일반적으로 전사될 핵산 서열의 상류에 위치하고, RNA 중합효소 및 다른 전사 인자들에 의한 특이한 결합을 위한 부위를 제공한다. 명시된 구체예에서, 프로모터는 일반적으로 원하는 분자를 생성하기 위하여 전사된 핵산 서열의 상류에 위치하고, RNA 중합효소 및 다른 전사 인자들에 의한 특이한 결합을 위한 부위를 제공한다.

[0058] 범위: 본 명세서를 통하여 발명의 다양한 측면이 범위의 방식으로 표현될 수 있다. 범위 방식의 기술은 단순히 편리함과 간결함을 위한 것임이 이해되어야 하고, 발명의 범주에 대한 융통성 없은 제한으로서 간주되어서는 안된다. 따라서, 범위의 기술은 구체적으로 개시된 모든 가능한 부분 범위뿐 아니라 그 범위 내에 있는 개별적인 수치 범위를 가지는 것으로 간주되어야 한다. 예를 들어 1 내지 6의 범위의 기술은 구체적으로 개시된 부분 범위, 예를 들면 1 내지 3, 1 내지 4, 1 내지 5, 2 내지 4, 2 내지 6, 3 내지 6 등과, 뿐만 아니라 그 범위 내에 있는 개별적인 숫자, 예를 들면 1, 2, 2.7, 3, 4, 5, 5.3 및 6을 포함하는 것으로 간주되어야 한다. 이것은 범위의 폭과 관계없이 적용된다.

[0059] "재조합 폴리펩티드"는 재조합 폴리뉴클레오티드의 발현시 생성되는 것을 포함한다.

[0060] 본원에서 사용되는 것과 같은 용어 "조절 요소"는 핵산 서열의 발현의 일부 측면을 조절하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 예시적인 조절 요소는 예시적으로 인핸서, 내부 리보솜 유입 부위(IRES), 인트론; 복제 기원, 폴리아데닐화 신호(pA), 프로모터, 인핸서, 전사 종결 서열 및 핵산 서열의 복제, 전사, 전사-후 프로세싱에 기여하는 상류 조절 도메인을 포함한다. 해당 기술분야의 숙련된 기술을 가진 사람들은 기본적인 실험으로 이들 및 다른 조절 요소들을 발현 구성물에서 선택하고 사용할 수 있다. 발현 구성물은 잘 알려져 있는 방법론을 사용하여 재조합적으로 또는 합성적으로 생성될 수 있다.

[0061] 항체와 관련하여 본원에서 사용되는 것과 같은 용어 "특이적으로 결합하는"은 특이한 항원을 인지하지만, 실질적으로 샘플 중의 다른 분자는 인지하거나 결합하지 못하는 항체를 포함한다. 예를 들어 한 종으로부터의 항원에 특이적으로 결합하는 항체는 또한 하나 또는 더 많은 종으로부터의 그 항원에도 결합할 수 있다. 그러나 그런 종-교차 반응성은 그 자체로는 항체의 분류를 특이한 것으로 바꾸지는 못한다. 다른 실례로서, 항원에 특이적으로 결합하는 항체는 또한 항원의 상이한 대립유전자 형태에도 결합할 수 있다. 그러나, 그런 교차 반응성은 그 자체로서 항체의 분류를 특이한 것으로 바꾸지는 못한다.

[0062] 어떤 경우에, 용어 "특이적인 결합" 또는 "특이적으로 결합"은 두 번째 화학적 종과 항체, 단백질 또는 펩티드의 상호작용과 관련하여, 그 상호작용이 화학적 종 상의 특별한 구조(예컨대 항원성 결정기 또는 에피토프)에 의존적인 것; 예를 들어 항체는 일반적으로 단백질에 대해서보다는 특이한 단백질 구조에 대해 인지하고 결합하는 것을 의미하기 위해 사용될 수 있다. 만약 항체가 에피토프 "A"에 대해 특이적이라면, 에피토프 A(또는 유리, 미표지 A)를 함유하는 분자의 존재는 표지된 "A" 및 항체를 함유하는 반응에서, 항체에 결합된 표지된 A의 양을 감소시킬 것이다.

[0063] 본원에서 사용되는 것과 같은 용어 "합성 항체"는 재조합 DNA 기술을 사용하여 생성되는 항체, 예를 들면 본원

에서 기술된 것과 같은 박테리오파지에 의해 발현된 항체를 포함한다. 그 용어는 또한 항체를 코드화하는 DNA 분자의 합성에 의해 생성된 항체를 의미하는 것으로 해석되어야 하고, 그 DNA 분자는 항체 단백질, 또는 그 항체를 특정하는 아미노산 서열을 발현하며, 이때 DNA 또는 아미노산 서열은 해당 기술분야에서 활용가능하고 잘 알려져 있는 합성 DNA 또는 아미노산 서열 기술을 사용하여 얻어졌다.

[0064] 본원에서 사용되는 것과 같은 용어 "변이체"는 서열이 참조 핵산 서열 또는 펩티드 서열과 각각 다르지만, 참조 분자의 생물학적 필수 특성을 보유한 핵산 서열 또는 펩티드 서열을 포함한다. 핵산 변이체의 서열의 변화는 참조 핵산에 의해 코드화된 펩티드의 아미노산 서열을 변경시킬 수 없거나 또는 아미노산 치환, 첨가, 결실, 융합 및 변환을 초래할 수 있다. 펩티드 변이체의 서열의 변화는 전형적으로 제한되거나 보존적이어서, 참조 펩티드 및 변이체의 서열은 전체적으로 밀접하게 유사하며, 많은 영역에서 동일하다. 변이체와 참조 펩티드는 어떠한 조합으로든 하나 또는 더 많은 치환, 첨가, 결실에 의해 아미노산 서열이 다를 수 있다. 핵산 또는 펩티드의 변이체는 대립유전자 변이체와 같이 자연 발생적일 수 있거나, 또는 자연적으로 발생하는 것으로 알려져 있지 않은 변이체일 수 있다. 핵산 및 펩티드의 비-자연 발생적인 변이체는 돌연변이생성 기법에 의해 또는 직접 합성에 의해 만들어질 수 있다.

[0065] 용어 "유전자 변형된"은 그것의 생식 세포가 외인성 인간 핵산 또는 인간 핵산 서열을 포함하는 동물을 포함한다. 비-제한적인 실례에 의하여, 유전자 변형된 동물은 그 동물이 인간 핵산 서열을 포함하는 한, 유전자 도입 동물이거나 녹-인 동물일 수 있다.

[0066] 본원에서 사용되는 것과 같이, "유전자 도입 동물"은 동물의 게놈 안으로 통합된 외인성 인간 핵산 서열을 포함하는 동물을 포함한다.

[0067] 본원에서 사용되는 것과 같이, "녹-인", "녹 인" 또는 "녹인"은 비-인간 동물 게놈의 특별한 염색체 유전자좌로 표적화되고 그 표적화된 유전자 안으로 관심의 핵산을 삽입하는 유전자 변형을 포함한다. 어떤 경우에, 유전자 변형은 비-인간 동물의 염색체 유전자좌에서 코드화된 유전자 정보를 상이한 DNA 서열로 대체시킨다.

[0068] 유전자 변형된 비-인간 동물

[0069] 본 발명의 어떤 측면으로, 인간 IL-6를 발현하는 유전자 변형된 비-인간 동물이 제공된다. 인간 IL-6(hIL6)는 그것에 대한 서열이 예를 들면 Genbank 승인 번호 NM_000600.3 및 NP_000591.1로 기술되는 184 아미노산 단백질을 의미한다. 인간 IL-6는 예를 들면 T 세포, B 세포, 단핵세포, 마크로파지, 섬유아세포, 케라틴 생성세포, 내피 세포 및 골수종 세포에 의해 생성되는 분비된 단백질이다. IL-6는 결합 하위유닛(IL-6R) 및 신호 변환 하위유닛(gp130)을 포함하는 세포 표면 이종이량체 수용체 복합체를 통해 작용한다. gp130은 다른 수용체, 예컨대 IL-11, IL-27, LIF에 대한 수용체의 통상적인 성분인 반면, IL-6R은 주로 간세포, 단핵세포, 활성화된 B 세포, 휴지기 T 세포 및 골수종 셀라인으로 제한된다. IL-6는 혈액 생성, 면역 반응 및 급성 단계 반응에서 중심 역할을 하며, B 세포의 항체 분비 세포(ASC)로의 최종 돌연변이, 특히 T-의존성(TD) 항체 반응의 배 중심 반응 중에 형질모세포의 팽창에 대한 중요한 인자인 것으로 밝혀졌다. IL-6는 시험관 내에서의 T 세포 증식에 및 생체 내에서의 세포독성 T 세포(CTL)의 생성에 필요하고, 그것들을 IL-2에 대해 더 반응하게 만든다.

[0070] 본 발명의 어떤 측면으로, 인간 IL-6를 발현하는 유전자 변형된 비-인간 동물은 또한 인간 M-CSF, 인간 IL-3, 인간 GM-CSF, 인간 TPO 및 인간 SIRPa, 또는 그것들의 어떠한 조합으로부터 선택된 적어도 하나의 추가의 인간 단백질을 발현한다. 다른 말로 표현하면, 인간 IL-6를 발현하는 비-인간 동물은 hM-CSF, hIL-3, hGM-CSF, hTPO 및 hSIRPa로부터 선택된 인간 단백질 중 1, 2, 3, 4 또는 5개 모두를 발현할 수 있다. 비-인간 동물이 그것에 대해 디자인될 수 있거나 또는 그것으로부터 비-인간 동물이 생성될 수 있는 hM-CSF, hIL-3, hGM-CSF, hTPO 및/또는 hSIRPa를 발현하는 유전자 변형된 비-인간 동물은 해당 기술분야에 잘 알려져 있고, 예를 들면 인간 M-CSF를 발현하는 녹-인 마우스를 설명하는 미국 출원 공개 번호 2013/0042330호 및 Rathinam et al. 2011, Blood 118:3119-28; 인간 IL-3 및 인간 GM-CSF를 발현하는 녹-인 마우스를 설명하는 미국 특허 번호 제 8,541,646호 및 Willinger et al. 2011, Proc Natl Acad Sci USA, 108:2390-2395; 인간 TPO를 발현하는 녹-인 마우스를 설명하는 미국 특허 번호 제 8,541,646호 및 Rongvaux et al. 2011, Proc Natl Acad Sci USA, 108:2378-83; 및 인간 Sirpa를 발현하는 유전자도입 마우스를 설명하는 PCT 출원 번호 WO 2012/040207호 및 Strowig et al. 2011, Proc Natl Acad Sci USA 108(32):13218-13223에서 더욱 상세하게 논의되며, 상기 모든 문헌들의 전체 내용은 참고로 본원에 포함된다.

[0071] 다양한 구체예에서, 인간 단백질을 코드화하는 핵산은 핵산의 mRNA로의 전사 및 mRNA의 인간 단백질로의 번역을 허용하는 방식으로 하나 또는 더 많은 조절 서열에 작동가능하게 연결된다. 용어 "조절 서열"은 해당 기술분야

에서 인지되고 프로모터, 인핸서 및 다른 발현 제어 요소(예컨대 폴리아데닐화 신호)를 포함하는 것으로 의도된다. 그런 조절 서열은 해당 기술분야의 숙련자들에게 공지되어 있고, 1990, Goeddel, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, Calif에 기술되어 있다. 한 구체예에서, 인간 핵산은 인간 핵산의 천연 조절 요소에 의해 발현된다. 다른 구체예에서, 인간 핵산은 비-인간 숙주 동물의 해당하는 핵산의 천연 조절 요소에 의해 발현된다.

[0072] 그러므로, 한 구체예에서, 인간 IL-6를 코드화하는 핵산은 비-인간 동물의 IL-6 프로모터에 작동가능하게 연결된다. 다른 구체예에서, 인간 IL-6를 코드화하는 핵산은 인간 IL-6 프로모터에 작동가능하게 연결된다. 다른 실례로서, 어떤 구체예에서는, 인간 M-CSF를 코드화하는 핵산은 동물의 M-CSF 프로모터에 작동가능하게 연결된다. 다른 구체예에서, 인간 M-CSF를 코드화하는 핵산은 인간 M-CSF 프로모터에 작동가능하게 연결된다. 세 번째 실례로서, 어떤 구체예에서는, 인간 IL-3를 코드화하는 핵산은 동물의 IL-3 프로모터에 작동가능하게 연결된다. 다른 구체예에서, 인간 IL-3를 코드화하는 핵산은 인간 IL-3 프로모터에 작동가능하게 연결된다. 네 번째 실례로서, 어떤 구체예에서는, 인간 GM-CSF를 코드화하는 핵산은 동물의 GM-CSF 프로모터에 작동가능하게 연결된다. 다른 구체예에서, 인간 GM-CSF를 코드화하는 핵산은 인간 GM-CSF 프로모터에 작동가능하게 연결된다. 다섯 번째 실례로서, 어떤 구체예에서는, 인간 TPO를 코드화하는 핵산은 동물의 TPO 프로모터에 작동가능하게 연결된다. 다른 구체예에서, 인간 TPO를 코드화하는 핵산은 인간 TPO 프로모터에 작동가능하게 연결된다.

[0073] 숙련된 기술자는 본 발명의 유전자 변형된 동물이 프로모터로부터 적어도 하나의 인간 핵산을 발현하는 유전자 변형된 동물을 포함하는 것을 이해할 것이다. 본 발명에서 유용한, 어디에서나 발현된 프로모터의 비제한적인 실례로는, 그것들에 제한되는 것은 아니지만, DNA pol II 프로모터, PGK 프로모터, 유비퀴틴 프로모터, 알부민 프로모터, 글로빈 프로모터, 오브알부민 프로모터, SV40 초기 프로모터, 라우스 육종 바이러스(RSV) 프로모터, 레트로바이러스 LTR 및 렌티바이러스 LTR, 베타-액틴 프로모터, ROSA26 프로모터, 열 충격 단백질 70(Hsp70) 프로모터, EF-1 알파 유전자 코드화 신장 인자 1 알파(EF1) 프로모터, 진핵생물 개시 인자 4A(eIF-4A1) 프로모터, 클로르암페니콜 아세틸트란스페라제(CAT) 프로모터 및 CMV(사이토메갈로바이러스) 프로모터가 있다. 본 발명에 유용한 프로모터 및 인핸서 발현 시스템은 또한 유도성 및/또는 조직-특이적 발현 시스템을 포함한다. 본 발명의 조성물 및 방법의 발현 구성물에 유용한 조직-특이적 프로모터의 비-제한적인 실례는 조혈 시스템에서 발현된 유전자의 프로모터, 예컨대 IL-6 프로모터, M-CSF 프로모터, IL-3 프로모터, GM-CSF 프로모터, SIRPA 프로모터, TPO 프로모터, IFN-β 프로모터, Wiskott-Aldrich 증후군 단백질(WASP) 프로모터, CD45(또한 백혈구 공통 항원으로도 불림) 프로모터, Fit- 1 프로모터, 엔도글린(CD 105) 프로모터 및 ICAM-2(세포내 점착 분자 2) 프로모터를 포함한다. 본 발명의 조성물 및 방법에 유용한 이들 및 다른 프로모터들은 다음 문헌에서 예시되는 것과 같이 해당 기술분야에 알려져 있다: Abboud 등(2003, J. Histochem & Cytochem. 51:941-949), Schorpp 등(1996, NAR 24:1787-1788), McBurney 등(1994, Devel. Dynamics, 200:278-293) 및 Majumder 등(1996, Blood 87:3203-3211). 프로모터를 포함하는 것에 더하여, 하나 또는 더 많은 추가의 조절 요소, 예컨대 인핸서 요소 또는 인트론 서열이 본 발명의 다양한 구체예에 포함된다. 본 발명의 조성물 및 방법에 유용한 인핸서의 실례는, 그것들에 한정되는 것은 아니지만, 사이토메갈로바이러스(CMV) 초기 인핸서 요소 및 SV40 인핸서 요소를 포함한다. 본 발명의 조성물 및 방법에 유용한 인트론 서열의 실례로는, 그것들에 한정되는 것은 아니지만, 베타 글로빈 인트론 또는 포괄 인트론을 포함한다. 본 발명의 어떤 구체예에 유용한 다른 추가의 조절 요소는 그것들에 한정되는 것은 아니지만 전사 종결 서열 및 mRNA 폴리아데닐화(pA) 서열을 포함한다.

[0074] 해당 기술분야의 숙련자들은 또한 자연 발생적인 인간 핵산 및 아미노산 서열 외에, 용어 인간 핵산 및 인간 아미노산은 또한 인간 핵산 및 아미노산 서열의 변이체도 포함하는 것을 인지할 것이다. 본원에서 사용되는 것과 같이, 용어 "변이체"는 인간의 분리된 자연 발생적인 유전자 돌연변이 또는 인간의 재조합적으로 제조된 변이를 규정하고, 그것들은 각각 해당하는 야생형 인간과 비교하여 하나 또는 더 많은 돌연변이를 함유한다. 예를 들어 그런 돌연변이는 하나 또는 더 많은 아미노산 치환, 첨가 및/또는 결실일 수 있다. 용어 "변이체"는 또한 비-인간 이종상동체를 포함한다. 어떤 구체예에서, 본 발명의 변이체 폴리펩티드는 야생형 인간 폴리펩티드에 대해 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 동일성을 가진다.

[0075] 두 서열 사이의 % 동일성은 본원의 다른 곳에서 기술된 것과 같은 기법을 사용하여 측정된다. 돌연변이는 표준 분자 생물학 기법, 예컨대 부위-특정 돌연변이생성 및 PCR-중재된 돌연변이생성을 사용하여 도입될 수 있다. 해당 기술분야의 숙련자는 하나 또는 더 많은 아미노산 돌연변이가 인간 단백질의 기능적 특성들을 변화시키지 않으면서 도입될 수 있다는 것을 인지할 것이다.

[0076] 인간 단백질 변이체를 생성하기 위하여 인간 단백질에 보존성 아미노산 치환이 만들어질 수 있다. 보존성 아미노산 치환은 해당 기술분야에서 인지된, 유사한 특성을 가지는 다른 아미노산에 대해 한 아미노산이 치환되는

것이다. 예를 들어 각 아미노산은 다음 특성들 중 하나 또는 그 이상을 가지는 것으로 기술될 수 있다: 양전기성, 음전기성, 지방족, 방향족, 극성, 소수성 및 친수성. 보존성 치환은 동일한 특성을 가지는 다른 아미노산에 대해 명시된 구조적 또는 기능적 특징을 가지는 아미노산의 치환이다. 산성 아미노산은 아스파테이트, 글루타메이트를 포함하고; 염기성 아미노산은 히스티딘, 라이신, 알기닌을 포함하며; 지방족 아미노산은 아이소로이신, 로이신 및 발린을 포함하고; 방향족 아미노산은 페닐알라닌, 글리신, 티로신 및 트립토판을 포함하며; 극성 아미노산은 아스파테이트, 글루타메이트, 히스티딘, 라이신, 아스파라긴, 글루타민, 알기닌, 세린, 쓰레오닌 및 티로신을 포함하고; 소수성 아미노산은 알라닌, 시스테인, 페닐알라닌, 글리신, 아이소로이신, 로이신, 메티오닌, 프롤린, 발린 및 트립토판을 포함하며; 보존성 치환은 각 그룹 내의 아미노산 중에서의 치환을 포함한다. 아미노산은 또한 상대적인 크기로 기술될 수 있는데, 알라닌, 시스테인, 아스파테이트, 글리신, 아스파라긴, 프롤린, 쓰레오닌, 세린, 발린은 모두 전형적으로 작은 것으로 여겨진다.

[0077] 인간 변이체는 합성 아미노산 유사체, 아미노산 유도체 및/또는 비-표준 아미노산을 포함할 수 있는데, 예를 들면 제한 없이, 알파-아미노부티르산, 시트룰린, 카나바닌, 시아노알라닌, 다이아미노부티르산, 다이아미노피멜산, 다이하이드록시-페닐알라닌, 젠콜산, 호모알기닌, 하이드록시프롤린, 노르로이신, 노르발린, 3-포스포세린, 호모세린, 5-하이드록시트립토판, 1-메틸히스티딘, 메틸히스티딘 및 오르니틴을 포함한다.

[0078] 인간 변이체는 야생형 인간을 코드화하는 핵산과 고도의 동일성을 가지는 핵산에 의해 코드화된다. 인간 변이체를 코드화하는 핵산의 상보물은 고엄격성 조건 하에서 야생형 인간을 코드화하는 핵산과 특이하게 혼성화한다. 인간 변이체를 코드화하는 핵산은 잘 알려져 있는 방법론을 사용하여 분리되거나 재조합적으로 또는 합성적으로 제조될 수 있다.

[0079] 어떤 구체예에서, 인간 핵산 서열을 발현하는 유전자 변형된 비-인간 동물은 또한 해당하는 비-인간 핵산 서열을 발현한다. 예를 들어, 그리고 아래에서 보다 상세하게 기술되는 것과 같이, 특정 구체예에서, 인간 핵산 서열은, 예컨대 동물이 해당하는 비-인간 동물 단백질을 코드화하는 비-인간 동물 유전자좌 이외의 유전자좌에서 외인성 인간 핵산 서열을 포함하도록 비-인간 동물의 게놈 안으로 무작위로 통합된다. 다른 구체예에서, 인간 핵산 서열을 발현하는 유전자 변형된 비-인간 동물은 해당하는 비-인간 동물 핵산 서열을 발현하지 않는다. 예를 들어, 그리고 아래에서 보다 상세하게 기술되는 것과 같이, 특정 구체예에서, 인간 단백질을 코드화하는 핵산은 해당하는 비-인간 동물 단백질을 코드화하는 게놈 물질을 대체하기 위하여 동물 안으로 도입되어, 그 동물이 해당하는 비-인간 동물 유전자에 대해 무의미하게 하고 해당하는 비-인간 동물 단백질에 대해 결핍이 되게 한다. 달리 표현하면, 비-인간 동물은 그 인간 유전자에 대해 "녹-인"이다.

[0080] 그러므로, 어떤 구체예에서, 인간 IL-6를 발현하는 유전자 변형된 비-인간 동물은 또한 비-인간 동물 IL-6를 발현한다. 다른 구체예에서, 인간 IL-6를 발현하는 유전자 변형된 비-인간 동물은 비-인간 동물 IL-6를 발현하지 않는다. 두 번째 실례로서, 어떤 구체예에서, 인간 M-CSF를 발현하는 유전자 변형된 비-인간 동물은 또한 비-인간 동물 M-CSF를 발현한다. 다른 구체예에서, 인간 M-CSF를 발현하는 유전자 변형된 비-인간 동물은 비-인간 동물 M-CSF를 발현하지 않는다. 세 번째 실례로서, 어떤 구체예에서, 인간 IL-3를 발현하는 유전자 변형된 비-인간 동물은 또한 비-인간 동물 IL-3를 발현한다. 다른 구체예에서, 인간 IL-3를 발현하는 유전자 변형된 비-인간 동물은 비-인간 동물 IL-3를 발현하지 않는다. 네 번째 실례로서, 어떤 구체예에서, 인간 GM-CSF를 발현하는 유전자 변형된 비-인간 동물은 또한 비-인간 동물 GM-CSF를 발현한다. 다른 구체예에서, 인간 GM-CSF를 발현하는 유전자 변형된 비-인간 동물은 비-인간 동물 GM-CSF를 발현하지 않는다. 다섯 번째 실례로서, 어떤 구체예에서, 인간 TPO를 발현하는 유전자 변형된 비-인간 동물은 또한 비-인간 동물 TPO를 발현한다. 다른 구체예에서, 인간 TPO를 발현하는 유전자 변형된 비-인간 동물은 비-인간 동물 TPO를 발현하지 않는다.

[0081] 어떤 구체예에서, 본 발명의 유전자 변형된 동물은 면역결핍성이다. "면역결핍성"이란 비-인간 동물이 그것의 천연 면역 시스템의 하나 또는 더 많은 측면에서 결핍성인 것, 예컨대 동물이 기능하는 숙주 면역 세포의 하나 또는 더 많은 유형에 대해 결핍성인, 예컨대 비-인간 B 세포 수 및/또는 기능, 비-인간 T 세포 수 및/또는 기능, 비-인간 NK 세포 수 및/또는 기능 등에 대해 결핍성인 것을 의미한다.

[0082] 한 실례로서, 면역결핍성 동물은 중증 복합형 면역결핍증(SCID)을 나타낼 수 있다. SCID는 T 세포의 부재 및 B 세포 기능의 결핍을 특징으로 하는 질환을 말한다. SCID의 실례로는 감마 사슬 유전자 돌연변이 또는 IL2RG 유전자의 상실 및 림프구 표현형 T(-)B(+)NK(-)를 특징으로 하는 X-결합 SCID; 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 델타 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 유

전자 돌연변이 및 림프구 표현형 T(-)B(+)NK(+), 및 Prkdcscld 돌연변이(Bosma et al. (1989, Immuno genetics 29:54-56) 및 림프구 표현형 T(-), B(-), 림프구 감소증 및 저감마글로불린혈증을 특징으로 하는 상염색체 열성 SCID들을 포함한다. 이와 같이, 어떤 구체예에서는, 유전자 변형된 면역결핍성 비-인간 동물은 IL2 수용체 감마 사슬 결핍, ADA 유전자 돌연변이, IL7R 돌연변이, CD3 돌연변이, RAG1 및/또는 RAG2 돌연변이, Artemis 돌연변이, CD45 돌연변이 및 Prkdc 돌연변이로부터 선택된 하나 또는 더 많은 결핍증을 가진다.

[0083] 본 발명의 유전자 변형된 비-인간 동물은 어떠한 비-인간 포유류 동물, 예를 들면 IL-6 프로모터에 작동가능하게 연결된 인간 IL-6 코딩 서열을 포함하도록 유전자 변형된 실험실 동물, 사육 동물, 가축 등, 예를 들면 쥐, 설치류, 개, 고양이, 돼지, 말, 소, 양, 비-인간 영장류 등, 예를 들면 해당 기술분야에 알려져 있는 것과 같이 마우스, 쥐, 토끼, 햄스터, 기니아 피그, 소, 돼지, 양, 염소 및 다른 유전자도입 동물 종, 특히 포유류 종일 수 있다. 특정 구체예에서, 본 발명의 유전자 변형된 동물은 마우스, 쥐 또는 토끼이다.

[0084] 한 구체예에서, 비-인간 동물은 포유류이다. 어떤 그러한 구체예에서, 비-인간 동물은, 예컨대 디포도이데아(Dipodoidea) 또는 뮤로이데아(Muroidea) 상과의 작은 포유류이다. 한 구체예에서, 유전자 변형된 동물은 설치류이다. 한 구체예에서, 설치류는 마우스, 쥐 및 햄스터로부터 선택된다. 한 구체예에서, 유전자 변형된 동물은 Calomyscidae(예컨대 마우스-유사 햄스터), Cricetidae(예컨대 햄스터, 뉴월드 쥐 및 마우스, 들쥐), Muridae(트루 마우스 및 쥐, 게르빌루스 쥐, 아프리카 가시쥐, 갈기쥐), Nesomyidae(클라이밍 마우스, 락 마우스, 꼬리 달린 쥐, 마다가스카르 쥐 및 마우스), Platacanthomyidae(예컨대 가시겨울잠쥐) 및 Spalacidae(예컨대 뒤쥐, 대나무 쥐 및 zokors)로부터 선택된 과(family)로부터 유래된다. 특정 구체예에서, 유전자 변형된 설치류는 트루 마우스 또는 쥐(Muridae 과), 게르빌루스 쥐, 아프리카가시쥐 및 갈기쥐로부터 선택된다. 한 구체예에서, 유전자 변형된 마우스는 Muridae 과의 한 구성원으로부터 유래된다.

[0085] 한 구체예에서, 본 발명의 유전자 변형된 비-인간 동물은 쥐이다. 그러한 한 구체예에서, 쥐는 Wistar 쥐, LEA 계통, Sprague Dawley 계통, Fischer 계통, F344, F6 및 Dark Agouti로부터 선택된다. 다른 한 구체예에서, 쥐 계통은 Wistar, LEA, Sprague Dawley, Fischer, F344, F6 및 Dark Agouti로 이루어진 군으로부터 선택된 둘 또는 더 많은 계통의 혼합이다.

[0086] 다른 구체예에서, 본 발명의 유전자 변형된 동물은 마우스, 예컨대 C57BL 계통의 마우스(예를 들면 C57BL/A, C57BL/An, C57BL/GrFa, C57BL/KaLwN, C57BL/6, C57BL/6J, C57BL/6ByJ, C57BL/6NJ, C57BL/10, C57BL/10ScSn, C57BL/10Cr, C57BL/01a, 등); 129 계통의 마우스(예를 들면 129P1, 129P2, 129P3, 129X1, 129S1(예컨대 129S1/SV, 129Sl/SvIm), 129S2, 129S4, 129S5, 129S9/SvEvH, 129S6(129/SvEvTac), 129S7, 129S8, 129T1, 129T2); BALB 계통, 예컨대 BALB/c; 등이다(예컨대 Festing et al. (1999) Mammalian Genome 10:836, Auerbach et al (2000) Establishment and Chimera Analysis of 129/SvEv- and C57BL/6-Derived Mouse Embryonic Stem Cell Lines 참조). 특정 구체예에서, 유전자 변형된 마우스는 상기 언급된 129 계통과 상기 언급된 C57BL/6 계통의 혼합이다. 다른 특정 구체예에서, 마우스는 상기 언급된 129 계통의 혼합, 또는 상기 언급된 BL/6 계통의 혼합이다. 특정 구체예에서, 혼합 129 계통은 129S6(129/SvEvTac) 계통이다. 또 다른 구체예에서, 마우스는 BALB 계통과 또 다른 상기 언급된 계통의 혼합이다.

[0087] 그러므로, 예를 들면 어떤 구체예에서, 본 발명의 유전자 변형된 비-인간 동물은 B 세포수 및/또는 기능, 및/또는 T 세포수 및/또는 기능, 및/또는 NK 세포수 및/또는 기능이 결핍된 면역결핍성 마우스이고(예를 들면 IL2 수용체 감마 사슬 결핍(즉 $\gamma_c^{-/-}$) 및/또는 RAG 결핍으로 인함), 인간 핵산, 예컨대 그것의 해당하는 프로모터, 예를 들면 각각 *M-CSF*, *IL-3*, *GM-CSF*, *TPO* 또는 *SIRPa* 프로모터에 작동가능하게 연결된 인간 IL-6, hM-CSF, hIL-3, hGM-CSF, hTPO 및/또는 hSIRPa를 포함하는 게놈을 가지며, 그 동물은 코드화된 인간 단백질(들)을 발현한다.

[0088] 특정한 구체적인 구체예에서, 본 발명의 유전자 변형된 동물은 마우스 IL-6 유전자좌에서 *IL-6* 프로모터에 작동가능하게 연결된 인간 IL-6를 코드화하는 핵산, 및 비-인간 동물의 게놈에 무작위로 통합된(즉 마우스는 마우스 SIRPa를 발현한다) 인간 SIRPa 프로모터에 작동가능하게 연결된 인간 SIRPa를 코드화하는 핵산을 포함하는 면역결핍성 마우스, 즉 면역결핍성 hIL-6, hSirpa 마우스, 예컨대 $Rag2^{-/-}$ $IL2rg^{-/-}$ $IL\text{-}6^{h/+}$ $hSIRPa^{+}$ 마우스 또는 $Rag2^{-/-}$ $IL2rg^{-/-}$ $IL\text{-}6^{h/h}$ $hSIRPa^{+}$ 마우스이다. 어떤 그러한 구체예에서, 마우스는 *M-CSF* 프로모터에 작동가능하게 연결된 인간 M-CSF를 코드화하는 핵산, *IL-3* 프로모터에 작동가능하게 연결된 인간 IL-3를 코드화하는 핵산, *GM-CSF* 프로모터에 작동가능하게 연결된 인간 GM-CSF를 코드화하는 핵산 및 *TPO* 프로모터에 작동가능하게 연결된 인간 TPO를 코드화하는 핵산을 더 포함한다. 즉 면역결핍성 hIL-6, hSirpa, hM-CSF, hIL-3, hGM-CSF, hTPO 마우스, 예컨대 $Rag2^{-/-}$ $IL2rg^{-/-}$ $IL\text{-}6^{h/+}$ $M\text{-}CSF^{h/+}$ $IL\text{-}3^{h/+}$ $GM\text{-}CSF^{h/+}$ $TPO^{h/+}$ $hSIRPa^{+}$ 마우스 또는 $Rag2^{-/-}$ $IL2rg^{-/-}$ $IL\text{-}6^{h/+}$ *M-*

CSF$^{h/h}$ *IL-3*$^{h/h}$ *GM-CSF*$^{h/h}$ *TPO*$^{h/h}$ *hSIRPa*$^{+}$ 마우스이다.

[0089] 특정한 구체적인 구체예에서, 본 발명의 유전자 변형된 동물은 *IL-6* 프로모터에 작동가능하게 연결되고 마우스 IL-6에 대해 결핍된 인간 IL-6를 코드화하는 핵산, 비-인간 동물의 게놈에 무작위로 통합된 인간 *SIRPa* 프로모터에 작동가능하게 연결된 인간 SIRPa를 코드화하는 핵산(즉 마우스는 여전히 마우스 SIRPa를 발현한다), *M-CSF* 프로모터에 작동가능하게 연결되고 마우스 M-CSF에 대해 결핍된 인간 M-CSF를 코드화하는 핵산, *IL-3* 프로모터에 작동가능하게 연결되고 마우스 IL-3에 대해 결핍된 인간 IL-3를 코드화하는 핵산, *GM-CSF* 프로모터에 작동가능하게 연결되고 마우스 GM-CSF에 대해 결핍된 인간 GM-CSF를 코드화하는 핵산, 및 *TPO* 프로모터에 작동가능하게 연결되고 마우스 TPO에 대해 결핍된 인간 TPO를 코드화하는 핵산을 포함하는 면역결핍 마우스, 즉 *Rag2*$^{-/-}$ *IL2rg*$^{-/-}$ *IL-6*$^{h/h}$ *M-CSF*$^{h/h}$ *IL-3*$^{h/h}$ *GM-CSF*$^{h/h}$ *TPO*$^{h/h}$, *hSIRPa*+ 마우스이다.

[0090] 유전자 변형된 비-인간 동물의 제조 방법

[0091] 본 발명의 유전자 변형된 비-인간 동물은 예를 들면 해당 기술분야에 알려져 있거나 또는 본원에 기술된 것과 같은, 유전자 변형된 동물을 제조하기 위한 어떠한 편리한 방법을 사용하여 제조될 수 있다.

[0092] 예를 들어 관심의 인간 단백질, 예컨대 IL-6, hM-CSF, hIL-3, hGM-CSF, hTPO 또는 hSIRPa를 코드화하는 핵산은 숙주 세포의 게놈 안으로의 삽입 및 비-인간 숙주 세포에서 인간 단백질의 발현에 적당한 형태로 재조합 벡터에 통합될 수 있다. 다양한 구체예에서, 재조합 벡터는 상기에서 기술된 것과 같이, 핵산의 mRNA로의 전사 및 그 mRNA의 인간 단백질로의 번역을 허용하는 방식으로 인간 단백질을 코드화하는 핵산에 작동가능하게 연결된 하나 또는 더 많은 조절 서열을 포함한다. 벡터의 디자인은 해당 기술분야에 알려져 있는 것과 같이, 형질전환될 숙주 세포의 선택, 발현될 인간 단백질의 양, 및/또는 코드화 핵산이 비-인간 숙주의 게놈 안으로 통합될 방법과 같은 요인들에 좌우될 수 있다.

[0093] 그런 다음 다양한 방법들 중 어느 것이든지 인간 핵산 서열을 동물 세포에 도입하여 그 인간 유전자를 발현하는 유전자 변형된 동물을 제조하기 위해 사용될 수 있다. 그런 기법들은 해당 기술분야에 잘 알려져 있고, 그것들에 한정되는 것은 아니지만, 난모세포의 전핵 마이크로주사, 배 줄기 세포의 형질전환, 상동성 재조합 및 녹-인 기법을 포함한다. 사용될 수 있는 유전자 변형된 동물의 제조 방법은, 그것들에 한정되는 것은 아니지만, Sundberg 및 Ichiki(2006, Genetically Engineered Mice Handbook, CRC Press), Hofker 및 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 등(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 제 6,586,251호, Rathinam 등(2011, Blood 118:3119-28), Willinger 등(2011, Proc Natl Acad Sci USA, 108:2390-2395), Rongvaux 등(2011, Proc Natl Acad Sci USA, 108:2378-83) 및 Valenzuela 등(2003, Nat Biot 21:652-659)에 기술되어 있는 것들을 포함한다.

[0094] 예를 들어 본 발명의 유전자 변형된 동물은 인간 단백질을 코드화하는 핵산을 난모세포에, 예컨대 마이크로주사에 의해 도입하고, 그 난모세포가 암컷 위탁 동물에서 발달되는 것을 허용함으로써 제조될 수 있다. 바람직한 구체예에서, 인간 핵산 서열을 포함하는 구성물은 수정된 난모세포 안으로 주사된다. 수정된 난모세포는 교미 및 발현 구성물이 주사된 다음 날 과배란된 암컷으로부터 수집될 수 있다. 주사된 난모세포는 밤새 배양되거나 또는 0.5-일 p.c. 상상임신된 암컷의 난관에 직접 옮겨졌다. 과배란, 난모세포의 수확, 발현 구성물 주사 및 배 전달을 위한 방법들은 해당 기술분야에 알려져 있고, Manipulating the Mouse Embryo(2002, A Laboratory Manual, 3rd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press)에 기술되어 있다. 자손은 도입된 핵산의 존재에 대해 DNA 분석에 의해(예컨대 PCR, 서던 블롯, DNA 서열화 등) 또는 단백질 분석에 의해(예컨대 ELISA, 웨스턴 블롯 등) 평가될 수 있다. 그런 방법들은 전형적으로 주사된 핵산 서열 --이 경우 관심의 인간 단백질을 코드화하는 핵산을 포함하는 구성물--의 난모세포 및 그러므로 비-인간 동물의 게놈 안으로의 무작위 통합, 즉 해당하는 단백질을 발현하는 숙주 동물의 유전자좌 이외의 유전자좌에서의 통합을 초래한다.

[0095] 다른 실례로서, 인간 단백질을 코드화하는 핵산을 포함하는 구성물은 줄기 세포(ES 세포 또는 iPS 세포)안에 잘 알려져 있는 방법들, 예컨대 일렉트로포레이션, 칼슘 -포스페이트 침전, 리포펙션 등을 사용하여 형질전환될 수 있다. 세포는 도입된 핵산의 존재에 대해 DNA 분석에 의해(예컨대 PCR, 서던 블롯, DNA 서열화 등) 또는 단백질 분석에 의해(예컨대 ELISA, 웨스턴 블롯 등) 평가될 수 있다. 그런 다음 발현 구성물이 통합된 것으로 측정된 세포는 착상 전 배 안에 도입될 수 있다. 본 발명의 조성물 및 방법에 유용한 해당 기술분야에 공지되어 있는

방법들의 상세한 설명에 대해서는 Nagy 등(2002, Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual, 3rd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press), Nagy 등(1990, Development 110:815-821), 미국 특허 번호 제 7,576,259호, 미국 특허 번호 제 7,659,442호, 미국 특허 번호 제 7,294,754호 및 Kraus 등(2010, Genesis 48:394-399)을 참조한다. 그런 방법들은 전형적으로 형질전환된 핵산 서열--이 경우, 관심의 인간 단백질을 코드화하는 핵산을 포함하는 구성물--의 줄기 세포의 게놈 및 따라서 비-인간 동물 안으로의 표적화된 통합에 사용된다. 자주, 그런 방법들은 관심의 인간 단백질을 코드화하는 핵산으로 숙주 게놈 물질, 예컨대 해당하는 숙주 단백질을 코드화하는 게놈 물질을 대체하는 결과를 초래한다.

[0096] 유전자 변형된 기초 동물은 유전자 변형을 운반하는 추가 동물을 교배하기 위해 사용될 수 있다. 본 발명의 인간 단백질(들)을 코드화하는 핵산을 운반하는 유전자 변형된 동물은 나아가 다른 유전자 변형을 운반하는 다른 유전자 변형된 동물에 교배되거나, 또는 녹아웃 동물, 예를 들면 하나 또는 더 많은 그것의 유전자를 발현하지 않는 녹아웃 동물에 교배될 수 있다.

[0097] 어떤 구체예에서, 유전자 변형된 면역결핍 동물은 프로모터에 작동가능하게 연결된 인간 폴리펩티드를 코드화하는 핵산을 포함하는 게놈을 포함하고, 이때 그 동물은 코드화된 인간 폴리펩티드를 발현한다. 다양한 구체예에서, 유전자 변형된 면역결핍성 비-인간 동물은 적어도 하나의 인간 폴리펩티드를 코드화하는 핵산을 포함하는 발현 카세트를 포함하는 게놈을 포함하고, 이때 그 핵산은 프로모터 및 폴리아데닐화 신호에 작동가능하게 연결되며, 추가로 인트론을 함유하고, 그 동물은 코드화된 인간 폴리펩티드를 발현한다.

[0098] 상기에서 논의된 것과 같이, 어떤 구체예에서, 본 발명의 유전자 변형된 동물은 면역결핍성 동물이다. 면역결핍성이고 하나 또는 더 많은 인간 사이토킨, 예컨대 IL-6, M-CSF, IL-3, GM-CSF, TPO 및/또는 SIRPa를 포함하는 유전자 변형된 비-인간 동물은 마찬가지로 해당 기술분야에 공지되어 있거나 본원에 기술되어 있는 것과 같이, 유전자 변형된 동물의 생성을 위한 어떠한 편리한 방법, 예컨대 발현 구성물의 착상전 배 안으로의 DNA 주입을 사용하여 또는 줄기 세포, 예컨대 배 줄기(ES) 세포 또는 상기에서 보다 상세하게 설명되고 본원의 작업 실시예에서 기술되는 것과 같이, 예를 들어 동형접합성일 때 면역결핍성을 초래할 돌연변이 SCID 유전자 대립유전자를 포함하는 유도된 다능성 줄기(iPS) 세포를 사용함으로써 생성될 수 있다. 그런 다음 예를 들면 본원에 기술되고 해당 기술분야에 공지되어 있는 방법들을 사용하여 변형된 난모세포 또는 ES 세포를 가지는 마우스들이 생성되고, 교배되어 원하는 유전자 변형을 포함하는 면역결핍성 마우스가 생성된다. 다른 실례로서, 유전자 변형된 비-인간 동물은 비-면역결핍 배경에서 생성될 수 있고, 동형접합성일 때 면역결핍성을 초래할 돌연변이 SCID 유전자 대립유전자를 포함하는 동물에 교차되며, 자손은 적어도 하나의 관심의 인간 단백질을 발현하는 면역결핍 동물을 생성하기 위해 교배될 수 있다.

[0099] 본 발명의 다양한 구체예는 실질적으로 그들의 모든 세포에 인간 핵산을 포함하는 유전자 변형된 동물뿐 아니라, 그들의 모든 세포는 아니지만 일부에 인간 핵산을 포함하는 유전자 변형된 동물을 제공한다. 어떤 경우, 예컨대 표적화된 재조합의 경우, 인간 핵산의 한 개의 복사물은 유전자 변형된 동물의 게놈 안에 통합될 것이다. 다른 경우, 예컨대 무작위 통합의 경우에, 인간 핵산의 서로 인접해 있거나 떨어져 있는 다수의 복사물이 유전자 변형된 동물의 게놈 안으로 통합될 수 있다.

[0100] 그러므로, 어떤 구체예에서, 본 발명의 유전자 변형된 비-인간 동물은 해당하는 비-인간 동물 프로모터에 작동가능하게 연결된 인간 폴리펩티드를 코드화하는 핵산을 포함하는 게놈을 포함하는 면역결핍성 동물일 수 있고, 이때 그 동물은 코드화된 인간 폴리펩티드를 발현한다. 다르게 표현하면, 본 발명의 유전자 변형된 면역결핍성 비-인간 동물은 적어도 하나의 인간 폴리펩티드를 코드화하는 핵산을 포함하는 발현 카세트를 포함하는 게놈을 포함하고, 이때 그 핵산은 해당하는 비-인간 프로모터 및 폴리아데닐화 신호에 작동가능하게 연결되며, 그 동물은 코드화된 인간 폴리펩티드를 발현한다.

[0101] 활용성

[0102] 본 발명의 다양한 구체예에서 제공된 유전자 변형된 비-인간 동물은 많은 용도, 이를테면 예를 들어 조혈 세포의 성장 및 분화의 모델로서 사용하기 위해, 인간 혈액생성의 생체 내 평가를 위해, 암세포의 생체 내 평가를 위해, 면역 반응의 생체 내 연구를 위해, 백신 및 백신접종 양생법의 생체 내 평가를 위해, 암세포 성장 또는 생존을 조절하는 제제의 효과를 시험하는 데 사용하기 위해, 암치료의 생체 내 평가를 위해, 면역 조절제, 예컨대 항체의 생체 내 생성 및 수집을 위해, 및 조혈 및 면역세포 기능에 영향을 미치는 제제의 효과를 시험하는 데 사용하기 위해 사용될 수 있다.

[0103] 이 목적을 위해, 어떤 경우에, 본 발명의 유전자 변형된 비-인간 동물("숙주")은 적어도 하나의 인간 조혈 세포

로 이식된다. 어떤 구체예에서, 본 발명의 유전자 변형된 비-인간 동물("숙주")안에 인간 조혈 세포를 이식시키는 것을 포함하는, 인간 조혈 시스템의 연구를 위한 동물 모델의 제조를 위한 방법이 제공된다. 특정 구체예에서, 본원에 개시된 유전자 변형된 비-인간 동물안에 인간 조혈 세포를 이식시키기 위한 방법들이 제공된다.

[0104] 어떤 특별한 경우에, 본 발명의 유전자 변형된 비-인간 동물에는 적어도 하나의 인간 다발성 골수종 세포가 이식된다. 그런 어떤 구체예에서, 본 발명의 유전자 변형된 비-인간 동물 안에 인간 다발성 골수종 세포를 이식시키는 것을 포함하는, 암연구를 위한 동물 모델의 제조 방법이 제공된다. 그런 어떤 구체예에서, 본 발명은 본 발명의 유전자 변형된 비-인간 동물안에 인간 다발성 골수종 세포를 이식시키는 방법이다. 본 발명의 조성물 및 방법에 유용한 이식된 인간 다발성 골수종 세포는 어떠한 인간 다발성 골수종 세포든지 포함한다.

[0105] 본 발명의 유전자 변형된 비-인간 동물의 이식에 유용한 인간 조혈 세포는 어떠한 편리한 인간 조혈 세포를 포함한다. 본 발명에 유용한 인간 조혈 세포의 비-제한적인 실례로는, 그것들에 한정되는 것은 아니지만, HSC, HSPC, 백혈병 개시 세포(LIC) 및 어떠한 혈통이든지 마지막으로 분화된 조혈 세포를 포함하여, 어떠한 분화 단계에서의 어떠한 혈통의 조혈 세포를 포함한다. 어떤 경우에, 인간 조혈 세포는 일차 세포이고, 이때 "일차 세포", "일차 셀라인" 및 "일차 배양물"은 본원에서 대상으로부터 유도된 정확하게 분리되고 제한된 수의 계대 동안 시험관 내에서 성장, 즉 배양물의 분열이 허용된 세포 또는 세포 배양물을 포함하는 것으로 상호교환적으로 사용된다. 예를 들어 이차 배양물은 0회, 1회, 2회, 4회, 5회, 10회 또는 15회 계대될 수 있지만, 위기 단계를 통과하기에는 충분하지 않다. 다른 구체예에서, 인간 조혈 세포는 셀라인으로부터 유래된다, 즉 세포는 불멸화된, 예컨대 약 15회 이상 계대된 배양물로부터 유래된다. 어떤 경우에, 이식된 조혈 세포는 건강한 세포를 포함한다. 다른 경우에 이식된 조혈 세포는 질병에 걸린 조혈 세포, 예컨대 암성 조혈 세포, 예를 들면 암성 이펙터 B 세포, 즉 다발성 골수종 세포를 포함한다. 어떤 경우에, 이식된 조혈 세포는 건강하고 질병에 걸린 세포 둘다, 예컨대 건강한 B 세포와 암성 이펙터 B 세포, 건강한 T 세포와 암성 이펙터 B 세포 등을 포함한다.

[0106] 조혈 세포, 즉 일차 세포, 그것으로부터 생성된 셀라인 등은 인간 공여체의 어떠한 조직 또는 위치로부터, 이를테면, 그것들에 한정되는 것은 아니지만, 골수, 말초혈, 간, 태아 간 또는 제대혈로부터 유도될 수 있다. 그런 조혈 세포는 어떠한 인간 공여체, 이를테면 건강한 공여체뿐 아니라, 질병, 예컨대 암, 이를테면 백혈병이 있는 공여체로부터도 분리될 수 있다. 본 발명의 유전자 변형된 동물에 조혈 세포의 이식은 이식된 동물의 인간 조혈 세포의 존재를 특징으로 한다. 특별한 구체예에서, 본 발명의 유전자 변형된 동물에 조혈 세포의 이식은 적절한 대조 동물과 비교하여, 조혈 세포가 제공되는 이식된 동물에서 분화된 인간 조혈 세포의 존재를 특징으로 한다.

[0107] 인간 조혈 세포의 분리, 인간 조혈 세포의 숙주 동물에의 투여 및 그것의 이식을 평가하는 방법은 해당 기술분야에 잘 알려져 있다. 숙주 동물에 투여하기 위한 정상 및 신생 세포, 또는 그것들의 조합을 포함하여 조혈 세포는 조혈 세포, 예컨대 그것들에 한정되는 것은 아니지만 제대혈, 골수, 말초혈, 사이토킨 또는 화학요법-고정된 말초혈 및 태아 간을 함유하는 어떠한 조직으로부터든지 얻어질 수 있다. 인간 조혈 세포를 분리하고, 숙주 동물에 인간 조혈 세포를 투여하며, 숙주 동물에서 인간 조혈 세포의 이식을 평가하는 방법의 실례는 본원에 및 Pearson 등(2008, Curr. Protoc. Immunol. 81: 1-15), Ito 등(2002, Blood 100:3175-3182), Traggiai 등(2004, Science 304: 104-107), Ishikawa 등(2005, Blood 106: 1565-1573), Shultz 등(2005, J. Immunol. 174:6477-6489) 및 Holyoake 등(1999, Exp Hematol. 27: 1418-27)에서 기술된다.

[0108] 발명의 어떤 구체예에서, 정상 및 신생 세포 또는 그것들의 조합을 포함하여 인간 조혈 세포는 특별한 조혈 세포 집단(예컨대 HSCs, HSPCs, LICs, CD34+, CD34-, 혈통 특이적 마커, 암세포 마커 등)에 대해 풍부해진 세포 집단을 얻기 위해 원재료 물질로부터 분리된다. 분리된 조혈 세포는 순수한 집단일 수도 있고 그렇지 않을 수도 있다. 한 구체예에서, 본 발명의 조성물 및 방법에 유용한 조혈 세포는 특별한 마커를 가지는 세포가 고갈된다. 다른 구체예에서, 본 발명의 조성물 및 방법에 유용한 조혈 세포는 마커에 대한 선택에 의해 풍부해진다. 어떤 구체예에서, 본 발명의 조성물 및 방법에 유용한 조혈 세포는 선택된 세포가 세포의 약 1 내지 100%를 구성하는 세포 집단이지만, 특정 구체예에서는 선택된 세포가 총 세포의 1%보다 적은 세포 집단도 또한 사용될 수 있다. 한 구체예에서, 본 발명의 조성물 및 방법에 유용한 조혈 세포는 특별한 마커, 예컨대 CD34를 가지는 세포가 고갈된다. 다른 구체예에서, 본 발명의 조성물 및 방법에 유용한 조혈 세포는 마커, 예컨대 CD34에 대한 선택에 의해 풍부해진다. 어떤 구체예에서, 본 발명의 조성물 및 방법에 유용한 조혈 세포는 CD34+ 세포가 세포의 약 1 내지 100%를 구성하는 세포 집단이지만, 특정 구체예에서는 CD34+ 세포가 총 세포의 1%보다 적은 세포 집단도 또한 사용될 수 있다. 특정 구체예에서, 본 발명의 조성물 및 방법에 유용한 조혈 세포는 CD34+ 세포가 총 세포의 약 1 내지 3%를 구성하는 세포의 T 세포-고갈된 집단, CD34+ 세포가 총 세포의 약 50%를 구성하는 세포의 혈통-고갈된 집단, 또는 CD34+ 세포가 총 세포의 약 90%를 구성하는 세포의 CD34+ 포지티브 선택된 집단이다.

[0109] 투여된 조혈 세포의 수는 적어도 하나의 인간 유전자를 발현하는 유전자 변형된 비-인간 동물에서 인간 조혈 및/또는 면역 시스템의 생성과 관련하여 제한되는 것으로 여겨지지 않는다. 그러므로 비-제한적인 실례에 의하여, 투여된 조혈 세포의 수는 약 1×10^{3} 내지 약 1×10^{7}이지만, 다양한 구체예에서, 더 많거나 더 적은 수도 또한 사용될 수 있다. 다른 비-제한적인 실례에 의하여, 투여된 HSPC의 수는 수용체가 마우스일 때 약 3×10^{3} 내지 약 1×10^{6} CD34+ 세포이지만, 다양한 구체예에서, 더 많거나 더 적은 수도 사용될 수 있다. 수용체의 다른 종에 대해서는, 투여에 필요한 세포 수는 단지 기본적인 실험만을 사용하여 측정될 수 있다.

[0110] 예를 들어 한 구체예에서, 유전자 변형되고 처리된 마우스는 인간 조혈 세포 또는 인간 조혈 줄기세포(HPSC)로 이식되어 유전자가 변형되고 이식된 마우스가 형성된다. 한 구체예에서, 조혈 세포는 이간 제대혈 세포 및 인간 태아 간 세포로부터 선택된다. 한 구체예에서, 이식은 약 1 내지 2×10^{5} 인간 CD34+ 세포로 이루어진다.

[0111] 어떤 경우에, 조혈 세포(예컨대 정상 또는 신생)의 투여는 조건화, 예를 들면 보통 감마 또는 X-선 방사선을 사용하여 고주파 전자기 방사선으로 수용체 동물을 치사량에 가깝게 조사하거나, 또는 부설판 또는 질소 머스타드와 같은 방사선 유사작용 약물로 처리하는 것이 선행될 수 있다. 조건화는 숙주 조혈 세포의 수를 감소시키거나, 인간 조혈 세포의 이식을 위한 적절한 미세환경 인자를 생성하거나, 및/또는 인간 조혈 세포의 이식을 위한 미세환경 틈새를 생성하는 것으로 여겨진다. 조건화에 대한 표준 방법은 해당 기술분야에 알려져 있고, 예를 들면 본원에 기술되거나 J. Hayakawa 등, 2009, Stem Cells, 27(1):175-182에 기술된다. 한 구체예에서, 유전자 변형된 마우스는 마우스에 존재할 수 있는 내인성 조혈 세포를 제거하기 위해 처리된다. 한 구체예에서, 처리는 유전자 변형된 마우스를 조사(irradiating)하는 것을 포함한다. 특정 구체예에서, 신생 유전자 변형된 마우스 새끼들은 거의 치사에 가깝게 조사된다. 특정 구체예에서, 신생 새끼들은 4시간 간격으로 2x200 cGy로 조사된다.

[0112] 조혈 세포(예컨대 정상 또는 신생)는 신생 또는 다 자란 동물에게 다양한 경로를 통한 투여에 의해, 예를 들면 그것들에 한정되는 것은 아니지만, 정맥 내, 간 내, 복강 내, 대퇴부 내 및/또는 경골 내로 투여될 수 있다. 본 발명의 구체예를 따라 조혈 세포를 투여하기 전에 동물을 조사하거나 조사하지 않은 채로 인간 조혈 세포를 면역결핍 동물에게 제공하는 것을 포함하는, 면역결핍 동물에서 정상 및 신생 세포, 또는 그것들의 조합을 포함하여 인간 조혈 세포의 이식을 위한 방법이 제공된다. 본 발명의 구체예에 따라 정상 및 신생 세포, 또는 그것들의 조합을 포함하여 인간 조혈 세포를 방사선 유사작용 약물, 예컨대 부설판 또는 질소 머스타드를 조혈 세포의 투여 전에 동물에게 투여하거나 투여하지 않은 채로 본 발명의 유전자 변형된 비-인간 동물에게 제공하는 것을 포함하는, 면역결핍 동물에 인간 조혈 세포를 이식하기 위한 방법이 제공된다.

[0113] 본 발명의 유전자 변형된 동물 에서 정상 및 신생 세포, 또는 그것들의 조합을 포함하여 인간 조혈 세포의 이식은 다양한 방법 중 어느 것, 예를 들면 그것들에 한정되는 것은 아니지만, 인간 조혈 세포가 투여되는 동물에서 조혈 세포의 투여 후에 하나 또는 여러 시점에서 동물 세포의 유동 세포분석에 의해 평가될 수 있다.

[0114] 일반적으로, 이식은 유전자 변형된 비-인간 동물에 존재하는 정상 및 신생 세포, 또는 그것들의 조합을 포함하여 인간 조혈 세포의 수(또는 백분율)가, 투여된 인간 조혈 세포의 수명을 넘어선 시점에서 비-인간 동물에 투여된 인간 세포의 수(또는 백분율)보다 더 클 때 성공적인 것으로 간주될 수 있다. 투여된 조혈 세포의 자손의 검출은 수용체 동물에서 인간 DNA의 검출에 의해, 또는 무상 인간 조혈 세포의 검출에 의해, 예컨대 인간 세포 마커, 예를 들면 인간 CD45, 인간 CD34 또는 sIL-6R의 검출에 의해 이루어질 수 있다. 첫 번째 수용체로부터 두 번째 수용체로의 인간 조혈 세포의 연속적인 전달, 및 두 번째 수용체에서 인간 조혈 세포의 이식은 일차 수용체에서 이식의 추가의 임의의 시험이다. 이식은 인간 조혈 세포의 이식 후 1 내지 4개월에 혈액, 비장 또는 골수에서 0.05% 또는 그것보다 큰 인간 CD45+ 세포로서 유동 세포분석에 의해 검출될 수 있다. 사이토킨(예컨대 GM-CSF)은 예를 들면 Watanabe(1997, Bone Marrow Transplantation 19: 1175-1181)에 기술된 것과 같이 줄기 세포를 고정시키기 위해 사용될 수 있다.

[0115] 한 구체예에서, 면역결핍성 유전자 변형되고 이식된 동물은 CD34+ 세포, 조혈 줄기 세포, 조혈 세포, 골수성 전구 세포, 골수성 세포, 수지상 세포, 단핵세포, 과립구, 호중구, 비만 세포, 흉선세포, T 세포, B 세포, 혈소판 및 그것들의 조합으로부터 선택된 인간 세포에 대해 발생한다. 한 구체예에서, 인간 세포는 이식후 4개월, 5개월, 6개월, 7개월, 8개월, 9개월, 10개월, 11개월 또는 12개월에 존재한다.

[0116] 한 구체예에서, 면역결핍성 유전자 변형되고 이식된 동물은 인간 조혈 줄기 및 전구 세포, 인간 골수성 전구 세포, 인간 골수성 세포, 인간 수지상 세포, 인간 단핵세포, 인간 과립구, 인간 호중구, 인간 비만 세포, 인간 흉

선세포, 인간 T 세포, 인간 B 세포 및 인간 혈소판을 포함하는 인간 혈액-림프구 시스템에 대해 발생한다. 한 구체예에서, 인간 혈액-림프구 시스템은 이식후 4개월, 5개월, 6개월, 7개월, 8개월, 9개월, 10개월, 11개월 또는 12개월에 존재한다.

[0117] 한 구체예에서, 면역결핍성 유전자 변형되고 이식된 동물은 암성 인간 조혈 세포, 예를 들면 신생 혈장(이펙터 B) 세포를 포함하는 인간 혈액-림프구 시스템에 대해 발생한다. 한 구체예에서, 암성 인간 조혈 세포는 이식 후 4주, 6주, 8주, 12주에 또는 12주 이후에도 존재한다. 특정 구체예에서, 암성 인간 조혈 세포는 이식 후 2주, 4주, 6주, 8주, 12주에 또는 12주 이후에도 존재한다.

[0118] 일단 인간 조혈 세포로 이식되면, 본 발명의 유전자 변형된 비-인간 동물은 해당 기술분야에서 많은 용도를 가진다. 예를 들어 본 발명의 이식된 유전자 변형된 동물은 말초혈의 인간 조혈 세포의 기능을 연구하는 데 유용하다. 작업 실시예 2에서 증명되는 것과 같이, 면역결핍성이고 IL-6 마우스 유전자좌에서 IL-6 프로모터에 작동가능하게 연결된 인간 IL-6를 코드화하는 핵산을 포함하는 유전자 변형된 마우스(예컨대 *Rag2*$^{-/-}$ *IL2rg*^{null} *IL-6*$^{h/h}$ 마우스, *Rag2*$^{-/-}$ *IL2rg*^{null} *IL-6*$^{h/h}$ *hSIRPa*$^{+}$ 마우스 및 *Rag2*$^{-/-}$ *IL2rg*$^{-/-}$ *IL-6*$^{h/h}$ *M-CSF*$^{h/h}$ *IL-3*$^{h/h}$ *GM-CSF*$^{h/h}$ *TPO*$^{h/h}$, *hSIRPa*+)는 인간 IL-6를 발현하지 않는 면역결핍성 마우스, 즉 *Rag2*$^{-/-}$ *IL2rg*^{null} 마우스보다 더 나은 인간 조혈 세포, 예컨대 CD34+ 전구 세포의 말초혈 및 비장 안으로의 이식을 지지한다. 더욱이, 이들 유전자 변형된 마우스들은 인간 IL-6를 발현하지 않는 면역결핍성 마우스보다 더 효율적으로 인간 조혈 세포의 분화를 촉진한다. 예를 들어 이들 유전자 변형된 마우스는 CD5+ B 세포 및 CD27+ B 세포의 분화를 더 잘 촉진한다. CD5는 B-1 세포로 불리는 IgM-분비 B 세포의 하위세트 상에서 발견되는 단백질이고, B 세포 수용체로부터의 활성화 신호를 경감시키는 작용을 하여 B-1 세포가 매우 강력한 자극(예컨대 박테리아 단백질)에 의해서만 활성화될 수 있고 정상적인 조직 단백질에 의해서는 활성화되지 않는다. 추가로, 이들 유전자 변형된 마우스는 인간 IL-6를 발현하지 않는 면역결핍성 마우스보다 더 잘 기능하는 인간 조혈 세포의 발달을 지지한다. 예를 들어 B 세포는 이들 유전자 변형된 마우스에서 인간 IL-6를 발현하지 않는 면역결핍성 마우스보다 더 빠르게 IgG 분비 혈장 세포로 분화한다. 이와 같이, 본 발명의 이식된 유전자 변형된 동물은 조혈 세포 발달 및 기능, 보다 구체적으로는 B 림프구 분화 및 기능을 연구하는데 사용된다.

[0119] 다른 실례로서, 본 발명의 이식된 유전자 변형된 동물은 조혈 세포 암을 연구하는 데 유용하다. 아래의 작업 실시예 1에서 증명되는 것과 같이, 면역결핍성이고 마우스 IL-6 유전자좌에서 IL-6 프로모터에 작동가능하게 연결된 인간 IL-6를 코드화하는 핵산을 포함하는 유전자 변형된 마우스, 예컨대 *Rag2*$^{-/-}$ *IL2rg*^{null} *IL-6*$^{h/h}$ 마우스, *Rag2*$^{-/-}$ *IL2rg*^{null} *IL-6*$^{h/h}$ *hSIRPa*$^{+}$ 마우스 및 *Rag2*$^{-/-}$ *IL2rg*$^{-/-}$ *IL-6*$^{h/h}$ *M-CSF*$^{h/h}$ *IL-3*$^{h/h}$ *GM-CSF*$^{h/h}$ *TPO*$^{h/h}$, *hSIRPa*+는 일차 인간 다발성 골수종 세포 및 인간 다발성 골수종 셀라인의 세포로 이식되는 한편, 인간 IL-6를 발현하지 않는 면역결핍성 마우스, 즉 *Rag2*$^{-/-}$ *IL2rg*^{null} 마우스는 그렇지 못하다. 인간 SIRPa의 유전자 변형된 숙주에 의한 발현은 관찰된 이식의 비율 및 정도를 한층 더 개선시킨다. 나아가, 다발성 골수종 세포를 직접 본원에 개시된 이들 면역결핍성이고 유전자 변형된 마우스의 뼈에 이식하는 것은 전형적으로 인간 다발성 골수종과 관련된 뼈 병리학, 예컨대 μCT 스캔에 의해 정량된 바 뼈 파괴 및 뼈흡수를 재생한다.

[0120] 이와 같이, 본 발명의 이식된 유전자 변형된 동물은 조혈 세포 암을 치료할 제제를 확인하기 위해 후보 제제들을 선별하는 데 사용된다. 용어 "치료", "치료하는" 등은 본원에서 일반적으로 원하는 약물학적 및/또는 약리학적 효과를 얻는 것을 포함하기 위해 사용된다. 그 효과는 질병 또는 그것의 증상을 완전히 또는 부분적으로 방지하는 관점에서 예방적일 수 있고 및/또는 질병 및/또는 질병에 기인하는 부작용에 대한 부분적이거나 완전한 치료의 관점에서 치료적일 수 있다. 본원에서 사용되는 것과 같은 "치료"는 포유류의 질병의 어떠한 치료를 포함하고, 다음을 포함한다: (a) 질병의 성향이 있을 수 있지만 아직 그 질병에 걸린 것으로 진단되지는 않은 대상에게서 질병이 발생하는 것을 방지하는 것; (b) 질병을 억제하는 것, 즉 질병의 발달을 저지하는 것; 또는 (c) 질병을 완화시키는 것, 즉 질병의 퇴행을 유발시키는 것. 조혈 세포 암에 대한 치료제로서 관심의 후보 제제는 암의 개시 전에, 중에 또는 후에 투여될 수 있는 것들을 포함한다. 치료가 환자의 바람직하지 못한 임상적 증상들을 안정화시키거나 감소시키는, 진행중인 질병의 치료가 특히 관심이 있다. 용어 "개체", "대상", "숙주" 및 "환자"는 본원에서 상호교환적이며, 그것에 대한 진단, 치료 또는 치료요법이 요구되는 어떠한 포유류 대상, 특히 인간을 포함한다.

[0121] 다른 실례로서, 본 발명의 이식된 유전자 변형된 동물은 인간 병원체, 즉 인간을 감염시키는 병원체; 인간 병원체에 의한 감염에 대한 인간 면역 시스템의 반응; 및 인간 병원체에 대한 보호 및/또는 그것에 의한 감염의 치료에서 제제의 유효성을 연구하는데 유용하다. 병원체는 바이러스, 진균, 박테리아 등일 수 있다. 바이러스 병

원체의 비-제한적인 실례로는 인간 또는 돼지 또는 조류 인플루엔자 바이러스를 포함한다. 박테리아 병원체의 비-제한적인 실례로는 미코박테리움, 예를 들면 미코박테리움 튜베르큘로시스(M. tuberculosis) 및 엔테로박테리움, 예를 들면 살모넬라 타이피(S. typhi)를 포함한다. 마우스를 S. typhi로 감염시키고 감염을 평가하기 위한 방법들의 실례는 예를 들면 미국 공개 출원 번호 2011/0200982(그것의 내용은 본원에 참조로 포함된다)에서 찾아볼 수 있다. 마우스를 M. tuberculosis로 감염시키고 감염을 평가하기 위한 방법은 예를 들면 미국 공개 출원 번호 2011/0200982(그것의 내용은 본원에 참조로 포함된다)에서 찾아볼 수 있다. 야생형 마우스를 감염시키지 않거나, 또는 야생형 마우스를 감염시키지만 감염된 마우스가 그 병원체에 대한 반응으로 인간이 일으키는 면역 반응을 모델화하지 못하는 인간 병원체의 다른 실례는 해당 기술분야의 통상적인 지식을 가진 숙련자들에게 잘 알려져 있을 것이다. 그런 병원체 감염의 마우스 모델은 예컨대 인간 감염의 진전을 더 잘 이해하기 위한 연구에 유용하다. 그런 마우스 감염 모델은 또한 예컨대 감염에 대해 보호하거나 치료하는 후보 제제들을 확인하기 위한 약물 발견에 유용하다.

[0122] 본 발명의 이식된 유전자 변형된 마우스는 또한 예를 들면 예컨대 건강하거나 질병 상태의, 예컨대 암성 세포의 병원체 감염 중에 조혈 세포 발달 및/또는 활성, 예컨대 B 세포, T 세포, NK 세포, 마크로파지, 호중구, 호산성 과립구, 호염기성 세포 등의 활성을 조절(즉 촉진 또는 억제)할 수 있는 제제를 확인하기 위하여, 예를 들면 신규한 치료제를 확인하거나 및/또는 면역 시스템의 발달 및 기능의 분자적 기초의 더 나은 이해를 개발하기 위하여, 생체 내에서 원하는 활성에 대한 후보 제제들; 조혈 세포, 예컨대 B 세포, T 세포, NK 세포, 마크로파지, 호중구, 호산성 과립구, 호염기성 세포등 및 그것들의 전구체에 대해 독성인 제제들; 및 조혈 세포, 예컨대 B 세포, T 세포, NK 세포, 마크로파지, 호중구, 호산성 과립구, 호염기성 세포등 및 그것들의 전구체에 대한 독성 제제의 독성 효과를 방지하거나, 경감시키거나 또는 반전시키는 제제들을 선별하기 위한 유용한 시스템을 제공한다. 또 다른 실례로서, 본 발명의 이식된 유전자 변형된 동물은, 예를 들면 제제, 예컨대 치료제에 대한 개체의 면역 반응의 반응성을 선별하기 위한 생체 내 플랫폼을 제공하여 그 제제에 대한 개체의 반응성을 예측함으로써 질병 치료법에 대한 개체의 반응성을 예측하기 위한 유용한 시스템을 제공한다.

[0123] 생물학적 활성 제제에 대한 선별 분석에서, 본 발명의 인간 조혈 세포-이식된 유전자 변형된 마우스, 예를 들면 이식된 *Rag2*$^{-/-}$ *IL2rg*$^{-/-}$ *IL-6*$^{h/h}$ *hSIRPa*+ 마우스, 이식된 *Rag2*$^{-/-}$ *IL2rg*$^{-/-}$ *IL-6*$^{h/h}$ *M-CSF*$^{h/h}$ *IL-3*$^{h/h}$ *GM-CSF*$^{h/h}$ *TPO*$^{h/h}$, *hSIRPa*+ 마우스 등은 관심의 후보 제제와 접촉되고, 그 후보 제제의 효과는 하나 또는 그 이상의 생산 매개변수를 모니터함으로서 평가된다. 이들 생산 매개변수들은 해당 기술분야에 잘 알려져 있는 방법들에 의한 세포의 생존력, 예컨대 조혈 세포의 총 수 또는 특별한 조혈 세포 유형의 세포의 수 또는 세포의 아폽토시스 상태의 수, 예를 들면 DNA 단편화의 양, 세포 기포형성의 양, 세포 표면 상의 포스파티딜세린의 양 등을 반영하는 것일 수 있다. 다르게는 또는 추가로, 생산 매개변수들은 세포의 분화 능력, 예를 들면 분화된 세포 및 분화된 세포 유형의 비율을 반영하는 것일 수 있다. 다르게는 또는 추가로, 생산 매개변수들은 세포의 기능, 예컨대 세포에 의해 생성된 사이토킨 및 케모카인, 세포에 의해 생성된 항체(예컨대 양 또는 유형), 세포의 도전 부위로의 복귀 및 분출 능력, 세포의 조절 능력, 즉 촉진 또는 억제 능력, 시험관 내 또는 생체 내에서의 다른 세포의 활성 등을 반영하는 것일 수 있다. 다른 생산 매개변수들은 질병에 걸린 조혈 세포에 의해 유도된 손상의 정도, 예컨대 다발성 골수성 세포에 의해 유도된 뼈 파괴 및 흡수를 반영하는 것일 수 있다. 또 다른 매개변수들은 수행되는 연구와 관련되는 바 감염, 예컨대 동물에서 병원체 감염에 미치는 제제의 효과, 예를 들면 마우스에서 병원체의 역가, 마우스에서 육아종의 존재 등을 반영하는 것일 수 있다.

[0124] 매개변수들은 세포의 수량화할 수 있는 성분들, 특히, 바람직하게는 고도의 처리량 시스템에서 정확하게 측정될 수 있는 성분들이다. 매개변수는 세포 표면 결정기, 수용체, 단백질 또는 형태적 변형 또는 그것의 번역후 변형, 지질, 탄수화물, 유기 또는 무기 분자, 핵산, 예컨대 mRNA, DNA 등, 또는 그런 세포 성분으로부터 유도된 부분 또는 그것들의 조합을 포함하여 어떠한 세포 성분 또는 세포 생성물일 수 있다. 대부분의 매개변수들이 정량적인 판독을 제공하는 한편, 어떤 경우에는 반-정량적인 또는 정량적인 결과가 용인될 것이다. 판독은 단일한 측정 값을 포함할 수 있고, 또는 평균, 중간값 또는 변수 등을 포함할 수도 있다. 특징적으로, 매개변수 판독값의 범위는 각 매개변수에 대해 동일한 분석의 다중성으로부터 얻어질 수 있다. 가변성이 예상되며 시험 매개변수들의 세트의 각각에 대한 값의 범위는 단일 값을 제공하기 위해 사용된 공통 통계학적 방법으로 표준 통계학적 방법을 사용하여 얻어질 것이다.

[0125] 선별하기 위한 관심의 후보 제제들은 수많은 화학적 부류를 포함하는 공지되거나 미지의 화합물, 주로 유기금속 분자를 포함할 수 있는 유기 분자, 무기 분자, 유전자 서열, 백신, 항생물질 또는 항생물질 특성을 가지는 것으로 추정되는 다른 제제, 펩티드, 폴리펩티드, 항체, 인간에게 사용하기 위해 승인된 약학적 제제 등을

포함한다. 본 발명의 중요한 측면은 독성 시험 등을 포함하여 후보 약물을 평가하는 것이다.

[0126] 후보 제제는 구조적 상호작용, 특히 수소 결합에 필요한 기능성 기들을 포함하는 유기 분자를 포함하고, 전형적으로 적어도 아민, 카보닐, 하이드록실 또는 카복실기를 포함하며, 빈번하게 기능성 화학기 중 적어도 2개를 포함한다. 후보 제제는 자주 고리형 탄소 또는 상기 기능성 기 중 하나 또는 그 이상으로 치환된 헤테로고리형 구조 및/또는 방향족 또는 다중방향족 구조를 포함한다. 후보 제제는 또한 생체분자, 이를테면 펩티드, 폴리뉴클레오티드, 당, 지방산, 스테로이드, 퓨린, 피리미딘, 유도체, 그것들의 구조적 유사체 또는 조합 중에서 발견된다. 약물학적으로 활성인 약물, 유전적으로 활성인 분자 등이 포함된다. 관심의 화합물은 화학적 치료제, 호르몬 또는 호르몬 길항제 등을 포함한다. 본 발명에 적당한 약학적 제제의 실례는 "The Pharmacological Basis of Therapeutics," Goodman and Gilman, McGraw-Hill, New York, N.Y., (1996), Ninth edition에 기술된 것들이다. 또한 독소, 및 생물학적 및 화학적 작용제가 포함된다(예컨대 Somani, S. M. (Ed.), "Chemical Warfare Agents," Academic Press, New York, 1992 참조).

[0127] 선별하기 위한 관심의 후보 제제는 또한 핵산, 예를 들면 siRNA, shRNA, 안티센스 분자 또는 miRNA를 코드화하는 핵산, 또는 폴리펩티드를 코드화하는 핵산을 포함한다. 핵산을 표적화 세포 안으로 전달하기에 유용한 많은 벡터가 활용될 수 있다. 벡터는 에피솜으로, 예컨대 플라스미드, 미니서클 DNA, 바이러스-유도된 벡터, 예컨대 사이토메갈로바이러스, 아데노바이러스 등으로 유지될 수 있거나, 또는 상동성 재조합 또는 무작위 통합을 통해 표적 세포 게놈, 예컨대 MMLV, HIV-1, ALV 등과 같은 레트로바이러스 유도된 벡터 안에 통합될 수 있다. 벡터는 대상 세포에 직접 제공될 수 있다. 다르게 표현하면, 다능 세포는 관심의 핵산을 포함하는 벡터와 접촉되어 세포에 의해 그 벡터가 흡수된다.

[0128] 세포, 예컨대 배양 중의 세포 또는 마우스의 세포를 핵산 벡터와 접촉시키기 위한 방법, 예컨대 일렉트로포레이션, 염화칼슘 형질전환 및 리포펙션은 해당 기술분야에 잘 알려져 있다. 다르게는, 관심의 핵산은 바이러스를 통해 세포에 제공될 수 있다. 다르게 표현하면, 세포는 관심의 핵산을 포함하는 바이러스 입자와 접촉된다. 레트로바이러스, 예를 들어 렌티바이러스가 특히 본 발명의 방법에 적당하다. 통상적으로 사용되는 레트로바이러스 벡터는 "결핍성", 즉 생산적인 감염에 필요한 바이러스 단백질을 생성할 수 없다. 오히려, 벡터의 복제는 패키징 셀라인에서의 성장을 필요로 한다. 관심의 핵산을 포함하는 바이러스 입자를 생성하기 위해, 핵산을 포함하는 레트로바이러스 핵산은 패키징 셀라인에 의해 바이러스 캡시드 안에 패키지된다. 상이한 패키징 셀라인은 캡시드 안에 통합될 상이한 엔벨로프 단백질을 제공하고, 이 엔벨로프 단백질은 세포에 대한 바이러스 입자의 특이성을 결정한다. 엔벨로프 단백질은 적어도 세 가지 유형, 즉 동종지향성, 양쪽지향성 및 이종지향성의 것이다. 동종지향성 엔벨로프 단백질로 패키지된 레트로바이러스, 예컨대 MMLV는 대부분의 쥐과 및 쥐 세포 유형을 감염시킬 수 있고, BOSC23(Pear et al. (1993) P.N.A.S. 90:8392-8396)과 같은 동종지향성 패키징 셀라인을 사용함으로써 생성된다. 양쪽지향성 엔벨로프 단백질을 포함하는 레트로바이러스, 예컨대 4070A(Danos 등)는 대부분의 포유류 세포 유형, 이를테면 인간, 개 및 마우스 세포 유형을 감염시킬 수 있으며, PA12(Miller et al. (1985) Mol. Cell. Biol. 5:431-437); PA317(Miller et al. (1986) Mol. Cell. Biol. 6:2895-2902); GRIP(Danos et al. (1988) PNAS 85:6460-6464)과 같은 양쪽지향성 패키징 셀라인을 사용함으로써 생성된다. 이종지향성 엔벨로프 단백질로 패키지된 레트로바이러스, 예컨대 AKR env는 쥐과 세포를 제외한 대부분의 포유류 세포 유형을 감염시킬 수 있다. 적절한 패키징 셀라인은 관심의 세포--어떤 경우에는 이식된 세포, 어떤 경우에는 숙주 세포, 즉 유전자 변형된 동물의 세포--가 패키지된 바이러스 입자에 의해 표적화되는 것을 보장하기 위해 사용될 수 있다.

[0129] 관심의 핵산을 대상 세포에 제공하기 위해 사용되는 벡터는 전형적으로 발현, 즉 관심의 핵산의 전사적 활성화를 유도하기에 적당한 프로모터를 포함할 것이다. 이것은 어디에서나 작용하는 프로모터, 예를 들면 CMV-P-액틴 프로모터, 또는 유도성 프로모터, 예컨대 특히 세포 집단에서 활성이거나 또는 테트라사이클린과 같은 약물의 존재에 반응하는 프로모터를 포함할 수 있다. 전사적 활성화란 전사가 표적 세포에서 기준선 이상으로, 적어도 약 10배, 적어도 약 100배, 보다 통상적으로는 적어도 약 1000배 증가될 것으로 의도된다. 또한, 대상 세포에 재프로그래밍 인자들을 제공하기 위해 사용된 벡터는 예컨대 재조합효소 시스템, 예를 들면 Cre/Lox를 사용하여 나중에 제거되어야 하는 유전자, 또는 예컨대 선택적인 독성을 허용하는 유전자, 예를 들면 헤르페스바이러스 TK, bcl-xs 등을 포함함으로써 파괴되는 것들을 발현하는 세포를 포함할 수 있다.

[0130] 선별하기 위한 관심의 후보 제제는 또한 폴리펩티드를 포함한다. 그런 폴리펩티드는 임의로 생성물의 용해도를 증가시키는 폴리펩티드 도메인에 융합될 수 있다. 도메인은 규정된 프로테아제 절단 부위, 예컨대 TEV 프로테아제에 의해 절단되는 TEV 서열을 통해 폴리펩티드에 연결될 수 있다. 링커는 또한 하나 또는 그 이상의 가요성 서열, 예컨대 1 내지 10개의 글리신 잔기를 포함할 수 있다. 어떤 구체예에서, 융합 단백질의 절단은 생성물의

용해도를 유지시키는 완충액 중에서, 예컨대 0.5 내지 2M의 우레아의 존재 하에, 용해도를 증가시키는 폴리펩티드 및/또는 폴리뉴클레오티드 등의 존재 하에 수행된다. 관심의 도메인은 엔도솜 분해성 도메인, 예컨대 인플루엔자 HA 도메인; 및 생성을 보조하는 다른 폴리펩티드, 예컨대 IF2 도메인, GST 도메인, GRPE 도메인 등을 포함한다. 추가로 또는 다르게는, 그런 폴리펩티드는 개선된 안정성을 위해 제형될 수 있다. 예를 들어 펩티드는 페길화될 수 있는데, 그때에 폴리에틸렌옥시기는 혈류에 증가된 수명을 제공한다. 폴리펩티드는 부가된 기능성을 제공하기 위해, 예컨대 생체 내 안정성을 증가시키기 위하여 다른 폴리펩티드에 융합될 수 있다. 일반적으로 그런 융합 파트너는 안정한 혈장 단백질이고, 그것은 예를 들면 융합물로서 존재할 때, 특히 그런 안정한 혈장 단백질이 면역글로불린 불변 도메인인 경우에 생체 내 혈장 반감기를 연장시킬 수 있다. 안정한 혈장 단백질이 정상적으로 다량체 형태, 예컨대 면역글로불린 또는 리포단백질로 발견되고, 동일하거나 상이한 폴리펩티드 사슬은 정상적으로 이황화 및/또는 비공유적으로 결합되어 조립된 다중사슬 폴리펩티드가 형성되는 대부분의 경우에, 폴리펩티드를 함유하는 본원의 융합물은 또한 안정한 혈장 단백질 전구체와 실질적으로 동일한 구조를 가지는 다량체로서 생성되고 사용될 것이다. 이들 다량체는 그것들이 하나 이상의 폴리펩티드 제제를 포함하거나 함유하는 폴리펩티드 제제와 관련하여 동종성이다.

[0131] 후보 폴리펩티드 제제는 진핵생물 세포로부터 제조되거나, 또는 원핵생물 세포에 의해 생성될 수 있다. 그것은 풀림에 의해, 예컨대 열 변성, DTT 감소 등에 의해 추가로 처리될 수 있고, 해당 기술분야에 공지되어 있는 방법을 사용하여 추가로 다시 접혀질 수 있다. 일차 서열을 변경시키지 않는 관심의 변형은 폴리펩티드의 화학적 유도체화, 예를 들면 아실화, 아세틸화, 카복실화, 아미드화 등을 포함한다. 또한 글리코실화의 변형, 예컨대 그것의 합성 및 프로세싱 중에 또는 추가의 프로세싱 단계에서 폴리펩티드의 글리코실화 패턴을 변형시킴으로써 만들어진 변형; 예컨대 퍼유류 글리코실화 또는 탈글리코실화 효소와 같은 글리코실화에 영향을 미치는 효소에 폴리펩티드를 노출시킴으로써 만들어진 변형들이 포함된다. 또한 인산화된 아미노산 잔기, 예컨대 포스포티로신, 포스포세린 또는 포스포쓰레오닌을 가지는 서열들이 포함된다. 폴리펩티드는 그것의 단백질 가수분해성 분해에 대한 내성을 개선하기 위하여 또는 용해도 특성을 최적화하기 위하여 또는 그것들을 치료제로서 보다 적당하게 만들기 위하여 통상적인 분자생물학 기법 및 합성 화학을 사용하여 변형될 수 있다. 그런 폴리펩티드의 유사체는 자연적으로 발생하는 L-아미노산 이외의 잔기를 함유하는 것들, 예컨대 D-아미노산 또는 비-자연적으로 발생하는 합성 아미노산을 포함한다. D-아미노산은 아미노산 잔기의 일부 또는 전부에 대해 치환될 수 있다.

[0132] 후보 폴리펩티드 제제는 해당 기술분야에 공지되어 있는 것과 같은 종래 방법들을 사용하여 시험관 내 합성에 의해 제조될 수 있다. 다양한 상업적 합성 장치, 예를 들면 Applied Biosystems, Inc., Beckman 등에 의해 제작된 자동 합성기가 활용될 수 있다. 합성기를 사용함으로써, 자연적으로 발생하는 아미노산은 비천연 아미노산으로 치환될 수 있다. 특별한 서열 및 제조 방식은 편리함, 경제성, 필요한 순도 등에 의해 결정될 것이다. 다르게는, 후보 폴리펩티드 제제는 재조합 합성의 종래 방법에 따라 분리되고 정제될 수 있다. 발현 숙주의 용해물이 제조될 수 있고, 용해물은 HPLC, 축출 크로마토그래피, 겔 전기영동, 친화성 크로마토그래피 또는 다른 정제 기법을 사용하여 정제될 수 있다. 대부분의 경우에, 사용되는 조성물은 생성물의 제조 방법 및 그것의 정제와 관련된 오염물과 관련하여, 적어도 20 중량%, 보다 통상적으로는 적어도 약 75 중량%, 바람직하게는 적어도 약 95 중량%, 및 치료적 목적을 위해서는 보통 적어도 약 99.5 중량%의 원하는 생성물을 포함할 것이다. 통상 백분율은 총 단백질을 토대로 할 것이다.

[0133] 어떤 경우에, 선별되어야 하는 후보 폴리펩티드 제제는 항체이다. 용어 "항체" 또는 "항체 부분"은 에피토프에 맞고 그것을 인지하는 특이한 형상을 가지는 어떠한 폴리펩티드 사슬-함유 분자 구조를 포함하는 것으로 의도되며, 이때 하나 또는 그 이상의 비-공유 결합 상호작용은 분자 구조와 에피토프 사이의 복합체를 안정화시킨다. 주어진 구조 및 그것의 특이한 에피토프의 특이한 또는 선택적인 맞춤은 때로 "자물쇠와 열쇠" 맞춤으로서 언급된다. 원형적인 항체 분자는 면역글로불린이고, 모든 공급원, 예컨대 인간, 설치류, 토끼, 소, 양, 돼지, 개, 다른 포유류, 닭, 다른 조유 등으로부터의 면역글로불린의 모든 유형, IgG, IgM, IgA, IgE, IgD 등은 "항체"로서 간주된다. 본 발명에서 활용된 항체는 다클론성 항체 또는 단클론성 항체일 수 있다. 항체는 전형적으로 세포가 배양되는 배지로 제공된다. 항체 제조 및 선별은 아래에서 보다 상세하게 논의된다.

[0134] 후보 제제들은 합성 또는 천연 화합물의 라이브러리를 포함하여 광범위한 공급원으로부터 얻어질 수 있다. 예를 들어 많은 수단이 생체 분자를 포함하여 광범위한 유기 화합물의 무작위 및 특정 합성, 이를테면 무작위한 올리고뉴클레오티드 및 올리고펩티드의 발현에 대해 활용가능하다. 다르게는, 박테리아, 진균, 식물 및 동물 추출물 형태의 천연 화합물의 라이브러리가 활용가능하거나 쉽게 제조된다. 추가로, 천연 또는 합성적으로 제조된 라이브러리 및 화합물은 종래의 화학적, 물리적 및 생화학적 수단을 통해 쉽게 변형되고, 조합적인 라이브러리를 생

성하기 위해 사용될 수 있다. 공지된 약물학적 제제에 대해서는 직접 또는 무작위 화학적 변형, 예컨대 아실화, 알킬화, 에스터화, 아미드화 등이 이루어져 구조적 유사체가 생성될 수 있다.

[0135] 후보 제제들은 적어도 하나 및 보통은 다수의 샘플에, 때로는 그 제제가 부족한 샘플과 함께 제제를 투여함으로써 생물학적 활성에 대해 선별된다. 그 제제에 대한 반응의 매개변수들의 변화가 측정되고, 그 결과는 예컨대 제제의 존재 및 부재하에 다른 제제 등으로 얻어진 참조 배양물에의 비교에 의해 평가된다. 선별이 독성 제제의 효과를 방지, 경감 또는 반전시킬 후보 제제를 확인하기 위해 수행되는 경우에, 선별은 전형적으로 독성 제제의 존재 하에 수행되며, 그 경우에 독성 제제는 그 결과가 측정되기에 가장 적절한 시간에 첨가된다. 예를 들어 후보 제제의 보호/방지 능력이 시험되는 경우에, 후보 제제는 독성 제제 전에, 후보 제제와 동시에, 또는 후보 제제로 치료한 후 이어서 첨가될 수 있다. 다른 실례로서, 독성 제제의 효과를 반전시키는 후보 제제의 능력이 시험되는 경우에, 그 후보 제제는 후보 제제로 치료한 후 이어서 첨가될 수 있다. 상기에서 언급된 것과 같이, 어떤 경우에 "샘플"은 세포로 이식된 유전자 변형된 비-인간 동물인데, 예를 들면 후보 제제는 인간 조혈 세포로 이식된 IL-6 프로모터에 작동가능하게 연결된 인간 IL-6를 코드화하는 핵산을 포함하는 면역결핍 동물, 예컨대 마우스에 제공된다. 어떤 경우에, 샘플은 이식될 인간 조혈 세포이다, 즉 후보 제제는 면역결핍성 유전자 변형된 동물에 이식되기 전에 세포에 제공된다.

[0136] 만약 후보 제제가 이식된 유전자 변형된 동물에 직접적으로 투여될 예정이라면, 제제는 펩티드, 작은 분자 및 핵산을 마우스에 투여하기 위한 해당 기술분야에 잘 알려져 있는 많은 방법들 중 어느 것에 의해 투여될 수 있다. 예를 들어 제제는 경구로, 점막으로, 국소적으로, 피내로 또는 주사에 의해, 예컨대 복강 내, 피하, 근육내, 정맥 내 또는 두개골 내 주사 등에 의해 투여될 수 있다. 제제는 완충액으로 투여되거나 또는 다양한 제형 중 어느 것에, 예를 들면 약학적으로 허용되는 적절한 비히클과의 조합에 의해 통합될 수 있다. "약학적으로 허용되는 비히클"은 미국 연방 또는 주 정부의 관리 기관에 의해 승인되거나 미국 약전 또는 포유류, 예컨대 인간에 사용하기 위한 일반적으로 인지된 다른 약전에 열거된 비히클일 수 있다. 용어 "비히클"은 그것과 본 발명의 화합물이 함께 포유류에 투여하기 위해 제형되는 희석제, 보조제, 부형제 또는 담체를 말한다. 그런 약학적 비히클은 지질, 예컨대 리포솜, 예컨대 리포솜 덴드리머; 액체, 예컨대 물 및 오일, 이를테면 석유, 동물, 식물성 또는 합성 기원의 것들, 예컨대 땅콩 오일, 대두유, 미네랄 오일, 참기름 등, 식염수; 아카시아 고무, 젤라틴, 전분 페이스트, 탈크, 케라틴, 콜로이드상 실리칼, 우레아 등일 수 있다. 또한, 보조제, 안정화제, 농축제, 윤활제 및 착색제가 사용될 수 있다. 약학적 조성물은 고체, 반-고체, 액체 또는 가스 형태의 제제, 예컨대 정제, 캡슐, 분말, 과립, 연고, 용액, 좌제, 주사액, 흡입제, 겔, 마이크로스피어 및 에어로졸로 제형될 수 있다. 제제는 투여 후 전신적이 되거나 지역적 투여, 교내 투여의 사용에 의해 또는 이식 부위에서 활성 용량을 보유하는 작용을 하는 이식편의 사용에 의해 국지적일 수 있다. 활성 제제는 즉각적인 활성을 위해 제형되거나 지속성 방출을 위해 제형될 수 있다. 어떤 조건, 특히 중추신경계 조건에 대해서는, 혈액-뇌 장벽(BBB)을 가로지르기 위해 제제를 제형할 필요가 있을 수 있다. 혈액-뇌 장벽(BBB)을 통해 약물을 전달하기 위한 한 가지 전략은 만니톨 또는 류코트리엔과 같은 삼투 수단에 의해 또는 브래디키닌과 같은 혈관 작용성 물질의 사용에 의해 생화학적으로 BBB의 파괴를 수반한다. BBB 파괴제는 조성물이 혈관 내 주사에 의해 투여될 때 제제와 함께 공동 투여될 수 있다. BBB를 통과하기 위한 다른 전략은 내인성 수송 시스템, 이를테면 카베올린-1 중재된 트랜스사이토시스(transcytosis), 예컨대 글루코스 및 아미노산 담체와 같은 담체-중재된 수송, 인슐린 또는 트란스페린에 대한 수용체-중재된 트랜스사이토시스 및 p-당단백질과 같은 활성 유출물 수송체의 사용을 수반한다. 활성 수송 부분은 또한 혈관의 내피 벽을 가로질러 수송을 용이하게 하기 위해 본 발명에 사용하기 위한 치료 화합물에 포합될 수 있다. 다르게는, BBB 뒤로 제제의 약물 전달은 국소 전달에 의해, 예를 들면 기관지 내 전달에 의해, 예컨대 Ommaya 저장소를 통해(예컨대 미국 특허 번호 5,222,982호 및 5385582호 참조, 본원에 참고로 포함됨); 볼루스 주사에 의해, 예컨대 주사기에 의해, 예를 들면 유리체강 내 또는 두개골 내로; 연속적인 주입에 의해, 예를 들면 대류를 사용한 예컨대 캐뉼레이션에 의해(예컨대 미국 공개 출원 번호 20070254842호, 본원에 참고로 포함됨); 또는 그 위에 제제가 가역적으로 첨부되는 장치를 이식함으로써(예컨대 미국 공개 출원 번호 20080081064호 및 20090196903,호, 본원에 참고로 포함됨)이루어질 수 있다.

[0137] 만약 제제(들)이 이식 전에 세포에 제공된다면, 제제는 편리하게 용액으로, 또는 쉽게 가용성 형태로, 배양 중의 세포 배지에 첨가된다. 제제는 흐름-관통 시스템(flow-through system)으로, 스트림으로서, 간헐적으로 또는 연속적으로, 또는 교대로, 화합물의 볼루스를 단독으로 또는 점점 증가시켜가면서, 그렇지 않으면 고정된 용액에 첨가될 수 있다. 흐름-관통 시스템에서, 두 개의 유체가 사용되는데, 하나는 생리적으로 중성 용액이고, 다른 하나는 첨가된 시험 화합물과 동일한 용액이다. 첫 번째 유체는 세포를 통과하고, 이어서 두 번째도 통과한다. 단일 용액 방법에서, 시험 화합물의 볼루스는 세포를 둘러싸고 있는 배지의 부피에 첨가된다. 배양 배지의 성분들의 전체 농도는 볼루스의 첨가로, 또는 흐름 관통 방법에서 두 용액 사이에서 유의미하게 변해서는 안된

다.

[0138] 다양한 농도에 대한 차등 반응을 얻기 위해 상이한 제제 농도와 병행하여 다수의 분석법이 시행될 수 있다. 해당 기술분야에 알려져 있는 것과 같이, 제제의 유효 농도를 측정하는 것은 전형적으로 1:10 또는 다른 로그 축척의 희석을 유발하는 농도 범위를 사용한다. 농도는 필요하다면 두 번째 시리즈의 희석으로 한층 더 정제될 수 있다. 전형적으로 이들 농도 중 하나가 네거티브 대조표준으로서, 즉 제로 농도에서 또는 제제의 검출 수준 아래에서 또는 표현형의 검출가능한 변화를 초래하지 않는 제제의 농도에서 또는 그 아래에서 작용한다.

[0139] 이식된 유전자 변형된 동물에서 후보 제제에 대한 반응의 분석은 그 제제로 처리한 후 어떠한 시점에서 수행될 수 있다. 예를 들어 세포는 후보 제제와 접촉한 후 1, 2 또는 3일 후, 때로는 4, 5 또는 6일 후, 때로는 8, 9 또는 10일 후, 때로는 14일 후, 때로는 21일 후, 때로는 28일 후, 때로는 1개월 또는 그 이상, 예컨대 2개월, 4개월, 6개월 또는 그 후에 분석될 수 있다. 어떤 구체예에서, 분석은 다수의 시점에서의 분석을 포함한다. 분석을 위한 시점(들)의 선택은 통상적인 지식을 가진 숙련자에 의해 쉽게 인지될 것과 같이, 수행될 분석의 유형에 좌우될 것이다.

[0140] 분석은 세포 생존력, 세포 증식, 세포 정체성, 세포 형태 및 세포 기능을 측정하기 위해 본원에서 기술되거나 해당 기술분야에 공지되어 있는 매개변수들 중 어느 것을 측정하는 것을 포함할 수 있는데, 특히 그것들이 면역 세포의 세포와 관련이 있기 때문이다. 예를 들어 유동 세포분석은 조혈 세포의 총 수 또는 특별한 조혈 세포 유형의 세포 수를 측정하기 위해 사용될 수 있다. 조직화학 또는 면역조직화학, 예를 들면 DNA 단편화를 측정하기 위한 말단 데옥시뉴클레오티드 트란스페라제 dUTP 닉 단부 표지화(TUNEL), 또는 세포 표면 상의 포스파티딜세린에의 아넥신 V 결합을 검출하기 위한 면역조직화학이 세포의 아폽토시스 상태를 측정하기 위해 수행될 수 있다. 유동 세포분석은 또한 분화된 세포의 비율 및 분화된 세포 유형을 평가하기 위해, 예컨대 제제의 존재 하에 분화하는 조혈 세포의 능력을 측정하기 위해 사용될 수 있다. ELISA, 웨스턴 및 노던 블롯이 사이토킨, 케모카인, 면역글로불린 등의 수준을 측정하기 위해 수행될 수 있다.

[0141] 이식된 유전자 변형된 마우스에서 발현된, 예컨대 이식된 세포의 기능을 평가하기 위하여, 암성 혈장 세포의 생존을 평가하기 위하여 수행될 수 있다. μCT 스캔은 병에 걸린 조혈 세포에 위해 유도된 손상, 예컨대 다발성 골수종 세포에 의해 유도된 뼈 파괴 및 재흡수의 정도를 측정하기 위하여 수행될 수 있다. 면역 세포의 기능을 시험하기 위한 생체 내 분석뿐 아니라 당뇨병, 자가면역 질병, 이식편 대 숙주 질병, AMD 등과 같은 관심의 특정 질병 또는 장애와 관련된 분석이 또한 수행될 수 있다. 예컨대 Current Protocols in Immunology (Richard Coico, ed. John Wiley & Sons, Inc. 2012) 및 Immunology Methods Manual(I. Lefkovits ed., Academic Press 1997) 참조(상기 문헌들의 내용은 참고로 본원에 포함된다).

[0142] 그러므로 예를 들면 다발성 골수종에 미치는 제제의 효과를 측정하기 위한 방법이 제공되는데, 그 방법은 인간 다발성 골수종 세포로 이식된 인간화된 IL-6 마우스, 예컨대 마우스에 그 제제를 투여하고; 제제의 존재 하에 시간 경과에 따른 다발성 골수종 세포의 생존력 및/또는 증식 능력의 매개변수를 측정하며; 그 측정치를 제제에 노출되지 않은 이식된 인간화된 IL-6 마우스로부터의 측정치에 비교하는 것을 포함한다. 제제는 만약 그것이 마우스의 혈액 또는 조직에서, 제제의 단일 투여 후에 또는 2회 또는 그 이상의 투여 후에 선택된 시간 기간이 지난 후에 다발성 골수종 세포의 증식 및/또는 세포 수를 적어도 20%, 30%, 40% 또는 그 이상, 어떤 경우에는 50%, 60%, 70% 또는 그 이상, 예컨대 80%, 90% 또는 100%, 즉 검출할 수 없는 양으로 감소시킨다면 항암성인 것으로 측정된다. 특정 구체예에서, 약물 또는 약물 조합의 투여는 다발성 골수종 세포의 이식 후 적어도 1주, 10일, 2주, 3주 또는 4주 후에 이루어진다.

[0143] 본 발명의 마우스에 사용되는 다른 실례는 본원의 다른 곳에서 제공된다. 본 명세서에서 기술된 유전자 변형되고 이식된 마우스의 추가의 용도는 본 명세서를 읽음에 따라 해당 기술분야의 숙련자들에게 명백해질 것이다.

[0144] 인간 항체 제조

[0145] 본원의 다른 곳에서 기술된 것과 같이, 이식된 면역결핍 동물로부터 인간 단클론성 항체를 제조하는 데 유용한 조성물 및 방법이 또한 제공된다. 다양한 구체예에서, 그 방법은 면역결핍 동물을 인간 조혈 세포와 접촉시켜서 면역 시스템-이식된 비-인간 동물(이식된 동물)을 제조하고, 이어서 그 이식된 동물을 항원과 접촉시키며, 그 이식된 동물로부터 항원에 대한 인간 항체를 생성하는 인간 세포를 수집하고, 그 항체 생성 세포로부터 항체를 분리하는 것을 포함한다.

[0146] 다양한 구체예에서, 본 발명은 형질전환 방법(예컨대 EBV) 또는 세포 융합 방법(예컨대 하이브리도마)에 의해 항체 생성 세포(예컨대 인간 B-세포)를 수립하는 것을 포함하는 방법을 포함한다. 바람직하게는 항체 생성 세포

는 적당한 세포 배양 조건 하에서 적어도 약 50 계대 동안 유지될 수 있다.

[0147] 다양한 구체예에서, 이식된 동물은 비-인간 동물이다. 어떤 구체예에서, 이식된 동물은 마우스, 쥐 또는 토끼이다.

[0148] 발명의 다양한 구체예에서, 인간 조혈 세포는 인간 태아 간, 골수, 제대혈, 말초혈 또는 비장 샘플로부터 얻어진 CD34+ 세포이다.

[0149] 다양한 구체예에서, 항원은 펩티드, 폴리펩티드, MHC/펩티드 복합체, DNA, 살아있는 바이러스, 죽은 바이러스 또는 그것의 일부, 살아있는 박테리아, 죽은 박테리아 또는 그것의 일부, 또는 암세포 또는 그것의 일부 중 적어도 하나이다.

[0150] 어떤 구체예에서, 이식된 동물은 동물이 인간 조혈 세포와 접촉된 후 1 내지 5개월 후에 항원과 접촉되었다. 어떤 구체예에서는, 이식된 동물은 항원과 단지 1회 접촉되는 한편, 다른 구체예에서는, 이식된 동물은 항원과 2회, 3회, 4회, 5회, 6회, 7회, 8회 또는 그 이상 접촉된다.

[0151] 한 구체예에서, 이식된 동물로부터 수집된 인간 항체 생성 세포는 B 세포이다. 다양한 구체예에서, 동물로부터 수집된 인간 항체 생성 세포는 그것의 표면에서 CD19, CD20, CD22 및 CD27 중 적어도 한 가지를 발현한다. 본 발명의 인간 항체-생성 세포는 동물로부터 면역 시스템의 어떠한 적당한 세포 성분을 제거함으로써 회수될 수 있다. 다양한 구체예에서, 항체-생성 세포는 이식된 동물로부터 비장, 림프절, 말초혈, 골수 또는 그것의 일부 중 적어도 하나의 제거에 의해 제거된다.

[0152] 다양한 구체예에서, 본 발명의 방법은 적당한 융합 파트너를 사용하는 종래의 하이브리도마 기법을 사용한다. 다양한 구체예에서, 융합 파트너는 MOPC21, P3X63AG8, SP2/0, NS-1, P3.X63AG8.653, F0, S194/5.XXO.BU-1, FOX-NY, SP2/0-Ag14, MEG-01, HEL, UT-7, MO7e, MEG-A2 및 DAMI, 및 이들 세포로부터 유도된 셀라인으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 세포이다.

[0153] 본 발명의 이식된 동물로부터 항체를 분리하는 방법은 해당 기술분야에 잘 알려져 있다. 항체 생성 세포, 그 항체 생성 세포가 배양되는 배지 및/또는 이식된 동물의 복수로부터 항체의 분리는 해당 기술분야에 알려져 있는 방법들에 따라, 예를 들면 크로마토그래피 및 투석에 의해 수행될 수 있다. 다른 다양한 구체예에서, 항체는 면역친화성 정제, 암모늄 설페이트 침전, 단백질 A/G 정제, 이온 교환 크로마토그래피 및 겔 여과 중 한 가지 또는 그 이상을 사용하여 분리될 수 있다. 그런 방법들은 다음 문헌에서 기술되어 있다: Nau(1989, Optimization of monoclonal antibody purification, In: Techniques in Protein Chemistry, Hugli, T. (ed.), Academic Press, New York) 및 Coligan 등(2005, Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, Inc.).

[0154] 항원은 이식된 동물에 해당 기술분야에 공지되어 있는 어떠한 적당한 수단에 의해 투여될 수 있다. 다양한 구체예에서, 항원은 비장 내로, 정맥 내로, 복강 내로, 피부 내로, 근육 내로 및 피하로 중 적어도 한 가지에 의해 이식된 동물에 투여될 수 있다. 어떤 구체예에서, 항원은 단독으로 투여되고, 다른 구체예에서, 항원은 적절한 면역조절제 또는 보조제와 함께 투여된다. 발명의 방법에 유용한 보조제의 실례로는, 그것들에 한정되는 것은 아니지만, 완전 프로인트 보조제(CFA), 불완전 프로인트 보조제(IFA) 및 명반($Al_3(OH)_4$)이 있다.

[0155] 시약 및 키트

[0156] 본원에는 또한 하나 또는 그 이상의 상기 기술된 방법을 실시하기 위한 시약 및 그것의 키트가 제공된다. 본 발명의 시약 및 그것의 키트는 크게 다를 수 있다. 어떤 구체예에서, 시약 또는 키트는 본 발명의 유전자 변형된 비-인간 동물의 생성 및/또는 유지에 사용하기 위한 한 가지 또는 더 많은 시약을 포함할 것이다. 예를 들어 키트는 IL-6 프로모터에 작동가능하게 연결된 인간 IL-6를 코드화하는 핵산 및 SIRPa 프로모터에 작동가능하게 연결된 인간 SIRPa를 코드화하는 핵산을 포함하는 면역결핍 마우스; 또는 IL-6 프로모터에 작동가능하게 연결된 인간 IL-6를 코드화하는 핵산을 포함하고 추가로 M-CSF 프로모터에 작동가능하게 연결된 인간 M-CSF를 코드화하는 핵산; IL-3 프로모터에 작동가능하게 연결된 인간 IL-3를 코드화하는 핵산; GM-CSF 프로모터에 작동가능하게 연결된 인간 GM-CSF를 코드화하는 핵산; 및/또는 SIRPa 프로모터에 작동가능하게 연결된 인간 SIRPa를 코드화하는 핵산을 포함하는 마우스를 포함할 수 있다. 키트는 그런 마우스들을 교배하기 위한 시약, 예를 들면 인간 IL-6 유전자, 인간 M-CSF 유전자, 인간 IL-3 유전자, 인간 GM-CSF 유전자, 인간 SIRPa 유전자 및/또는 인간 TPO 유전자의 유전자형 분석을 위한 프라이머, PCR 완충액, $MgCl_2$ 용액 등을 포함할 수 있다.

[0157] 어떤 구체예에서, 시약 또는 키트는 본 발명의 유전자 변형된 비-인간 동물을 이식시키는 데 사용하기 위한 하나 또는 더 많은 시약, 예를 들면 본 발명의 유전자 변형된 비-인간 동물에 이식하기 위한 인간 조혈 세포, 인

간 조혈 전구 세포의 풍부화된 집단, 조혈 셀라인, 신생 조혈 셀라인 등, 또는 본 발명의 유전자 변형된 비-인간 동물에 이식하기 위한 조혈 세포의 집단, 인간으로부터의 조혈 세포의 풍부해진 집단, 조혈 셀라인, 신생 조혈 셀라인 등을 제조하기 위한 시약을 포함할 것이다.

[0158] 어떤 구체예에서, 시약 또는 키트는 예컨대 상이한 유형의 조혈 세포에 의해 발현된 마커에 특이적인 하나 또는 더 많은 항체의 존재 하에 조혈 세포의 생존력 및/또는 기능을 측정하기 위한 시약, 예를 들면 후보 제제, 또는 특별한 사이토킨, 케모카인 등을 검출하기 위한 시약을 포함할 것이다. 다른 시약은 배양 배지, 배양 보충물, 매트릭스 성분 등을 포함할 수 있다.

[0159] 상기 성분 외에, 본 발명의 키트는 추가로 본 발명의 방법을 실시하기 위한 지시사항을 포함할 것이다. 이들 지시사항은 다양한 형태로 본 발명의 키트에 존재할 수 있고, 그것들 중 하나 또는 그 이상이 키트에 존재할 수 있다. 이들 지시사항이 존재할 수 있는 한 가지 형태는 적당한 매체 또는 물질, 예를 들면 정보가 인쇄되어 있는 종이 또는 종이 조각 위에, 키트의 포장재에, 포장재 삽입물 등에 인쇄된 정보로서이다. 또 다른 수단은 그 위에 정보가 기록되어 있는 컴퓨터 판독가능 매체, 예를 들면 디스켓, CD 등일 것이다. 존재할 수 있는 또 다른 수단은 제거된 사이트에서 정보에 접근하기 위해 인터넷을 통해 사용될 수 있는 웹사이트 주소이다. 어떠한 편리한 수단이든지 키트에 존재할 수 있다.

[0160] **실험 실시예**

[0161] 본 발명은 다음의 실험 실시예를 참조로 상세하게 더 기술된다. 이들 실시예는 예시의 목적만으로 제공되며, 다른 표시가 없는 한 제한하는 것으로 의도되지 않는다. 그러므로, 본 발명은 다음의 실시예로 한정되는 것으로 해석되어서는 안되고, 오히려 본원에 제공되는 교시의 결과로서 명백해지는 어떠한 및 모든 변동을 포함하는 것으로 해석되어야 한다.

[0162] 추가의 설명이 없어도, 해당 기술분야의 통상적인 지식을 가진 사람은 전술한 설명과 다음의 예시적인 실시예를 사용하여, 본 발명의 화합물을 제조하고 활용하며 청구된 방법을 실시할 수 있는 것으로 여겨진다. 그러므로 다음의 작업 실시예는 구체적으로 본 발명의 바람직한 구체예를 주목하며, 어떤 방식으로든 명세서의 나머지를 제한한 것으로 해석되지 않는다.

[0163] 실시예 1: 사이토킨 유전자의 유전자 인간화는 인간 다발성 골수종 세포를 가지는 마우스의 이식을 가능하게 한다

[0164] 여기에서 기술되는 데이터는 본원에 기술된 유전자 변형된 비-인간 동물이 다발성 골수종에 대한 새로운 생체내 동물 모델을 나타내는 것을 증명한다.

[0165] 재료 및 방법

[0166] 마우스. 6.8kb의 쥐의 IL-6 유전자 유전자좌를 인간 IL-6 유전자의 3' 미번역 영역을 포함하는 엑손 1 내지 5를 함유하는 4.8-kb의 인간 IL-6 유전자 서열로 대체함으로써 인간화된 IL-6 녹-인 마우스를 제조하였다.

[0167] 간단히 설명하면, 단일 처리 단계에서 마우스를 인간 IL-6 유전자로 대체하기 위한 표적화 구성물을 VELOCIGENE® 유전자 공학처리 기법(Valenzuela et al. (2003) High-throughput engineering of the mouse genome coupled with high-resolution expression analysis, Nature Biotech, 21(6):652-659)을 사용하여 구성하였다. 마우스와 인간 IL-6 DNA를 박테리아 인공 염색체(BAC) RCPI-23 클론 368C3로부터, 및 BAC CTD 클론 2369M23으로부터 각각 얻었다. 간단히 설명하면, 갭 복구 클로닝에 의해 생성된, 엑손 1의 ATG로부터 엑손 5까지 뻗어 있고 3' 하류 서열의 16 뉴클레오티드(게놈 좌표: NCBIh37.1:ch7:22,766,882 내지 22,771,637) 및 플록스된(floxed) 네오 선택 카세트를 가지는 4.8kb의 인간 IL-6 서열의 양옆에 있는 마우스 IL-6 상류 및 하류 상동성 아암을 함유하고 있는 NotI 선형화된 표적화 구성물을 $Rag2^{-/-}Il2rg^{Y/-}$ ES 세포에 일렉트로포레이션하였다. Rg2 유전자 및 IL2rg 유전자 녹아웃이 만들어져 있는 원래의 ES 셀라인은 상업적으로 활용할 수 있는 V17 ES 세포(BALB/cx129 이형접합체)였다. 정확하게 표적화된 ES 세포를 일시적인 Cre-발현 벡터로 일렉트로포레이션하여 약물 선택 카세트를 제거하였다.

[0168] 정확하게 표적화된 ES 세포 클론을 천연의 미변형 116 유전자의 많은 복사물을 결실에 대해 표적화된 마우스 I16 유전자의 서열들에 특이한 2개의 TaqMan™ 정량 중합효소 연쇄 반응(qPCR)에 의해 측정하였다. qPCR 분석은 다음의 프라이머-프로브 세트를 포함하였다(5'에서 3' 쪽으로 표시됨): 상류 전방 프라이머, TTGCCGGTTT TCCCTTTTCT C(SEQ ID NO:1); 상류 역 프라이머, AGGGAAGGCC GTGGTTGTC(SEQ ID NO:2); 상류 프로브, FAM-

CCAGCATCAG TCCCAAGAAG GCAACT-BHQ(SEQ ID NO:3); 하류 전방 프라이머, TCAGAGTGTG GGCGAACAAA G(SEQ ID NO:4); 하류 역 프라이머, GTGGCAAAAG CAGCCTTAGC(SEQ ID NO:5); 하류 프로브, FAM-TCATTCCAGG CCCTTCTTAT TGCATCTG-BHQ(SEQ ID NO:6); 여기서 FAM은 5-카복시플루오레세인 형광 프로브를 나타내고 BHQ는 검은색 구멍 퀀처 유형의 형광 퀀처를 나타낸다(Biosearch Technologies). 표적화 벡터를 받아들이고 그것의 게놈에 통합시킨 ES 세포 클론으로부터 정제된 DNA를 TaqMan™ 유전자 발현 매스터 믹스(Life Technologies)와 제조업체의 제안을 따라 384-웰 PCR 플레이트(Micro Amp™ Optical 384-웰 반응 플레이트, Life Technologies)에서 조합하고 PCR의 과정 동안 형광 데이터를 수집하고 축적된 형광이 사전 설정된 역치에 도달할 때의 분획 PCR 사이클인 역치 사이클(Ct)을 측정하는 Applied Biosystems Prism 7900HT에서 사이클링하였다. 상류 및 하류 116-특이적 qPCR 및 비-표적화된 참조 유전자에 대한 두 개의 qPCR을 각 DNA 샘플에 대해 작동시켰다. 각각의 116-특이적 qPCR과 각각의 참조 유전자 qPCR 사이의 Ct 값(ΔCt)의 차이를 계산하고, 그런 다음 분석된 모든 샘플에 대한 각 ΔCt와 중간 ΔCt 사이의 차이를 계산하여 각 샘플에 대한 ΔΔCt 값을 얻었다. 각 샘플의 *IL-6* 유전자의 복사 수를 다음 식으로부터 계산하였다: 복사 수 = $2 \cdot 2^{-\Delta\Delta Ct}$. 그것의 천연 복사물 중 하나를 잃어버린, 정확하게 표적화된 클론은 하나와 동일한 *IL-6* 복사 수를 가질 것이다. 인간 *IL-6* 유전자 서열이 인간화된 대립유전자에서 고갈된 마우스 *IL-6* 유전자 서열을 대체한 확인을 다음의 프라이머-프로브 세트(5'에서 3' 쪽으로 표시됨)를 포함하는 TaqManTM qPCR 분석에 의해 확인하였다: 인간 전방 프라이머, CCCCACTCCACTGGAATTTG(SEQ ID NO:7); 인간 역 프라이머, GTTCAACCACAGCCAGGAAAG(SEQ ID NO:8); 및 인간 프로브, FAM-AGCTACAACTCATTGGCATCCTGGCAA-BHQ(SEQ ID NO:9).

[0169] 쥐 유전자좌와 hJI-6 유전자를 함유하는 서열의 상류 접합은 5'-AATTAGAGAG TTGACTCCTA ATAAATATGA GACTGGGGAT GTCTGTAGCT CATTCTGCTC TGGAGCCCAC CAAGAACGAT AGTCAATTCC AGAAACCGCT ATGAACTCCT TCTCCACAAG TAAGTGCAGG AAATCCTTAG CCCTGGAACT GCCAGCGGCG GTCGAGCCCT GTGTGAGGGA GGGGTGTGTG GCCCAGG(SEQ ID NO:10) 내에 있도록 디자인하고, 이때 인간 유전자의 첫 번째 뉴클레오티드 앞의 최종 마우스 뉴클레오티드는 CCGCT에서는 "T"이며, 인간 서열의 첫 번째 뉴클레오티드는 ATGAA에서 첫 번째 "A"이다. hIL-6 유전자를 함유하는 서열과 쥐 유전자좌의 하류 접합은 5'-TTTTAAAGAA ATATTTATAT TGTATTTATA TAATGTATAA ATGGTTTTTA TACCAATAAA TGGCATTTTA AAAAATTCAG CAACTTTGAG TGTGTCACGC TCCCGGGCTC GATAACTATA ACGGTCCTAA GGTAGCGACT CGAGATAACT T-3'(SEQ ID NO:11) 내에 있도록 디자인하고, 이때 인간 서열의 최종 뉴클레오티드는 TCACG의 최종 "G"이며 마우스 서열의 첫 번째 뉴클레오티드는 CTCCC의 첫 번째 "C"이고; 하류 접합 영역은 또한 플록스된 유비퀴틴 프로모터-구동된 네오 카세트의 제거를 위해 3' 단부에서 loxP 부위를 함유하였다(그것의 시작이 도시된다). 네오 카세트와 마우스 IL-6 유전자좌의 접합은 5'-TATACGA AGT TATCCTAGGT TGGAGCTCCT AAGTTACATC CAAACATCCT CCCCCAAATC AATAATTAAG CACTTTTTAT GACATGTAAA GTTAAATAAG AAGTGAAAGC TGCAGATGGT GAGTGAGA(SEQ ID NO:12) 내에 있도록 디자인하고, 이때 AGCTC의 최종 "C"는 네오 카세트의 최종 뉴클레오티드이며; 카세트 다음의 마우스 게놈의 첫 번째 뉴클레오티드는 CTAAG의 처음 "C"이다.

[0170] hIL-6를 포함하고 *Rag2* 및 *I12rg*가 결핍된 마우스를 제조하기 위하여, 정확하게 표적화된 ES 세포를 확인하고, 해당 기술분야에 공지되어 있는 기법을 사용하여 착상 전 배에 도입한다.

[0171] 그런 다음 인간화된 IL-6 KI 마우스를 역교배하여 *Rag2* 및 *I12rg*가 결핍되고 hIL-6를 발현하는 마우스를 제조하고, 인간 SIRPa 이식유전자를 발현하는 마우스(Strowig et al., 2011, Proc Natl Acad Sci USA, 108(32):13218-13223)에 교배하여 *Rag2* 및 *I12rg*가 결핍될 뿐만 아니라 hIL-6 및 hSIRPa를 발현하는 마우스($Rag2^{-/-}I12rg^{null}I16^{h/h}hSIRPa^{+}$)를 제조하였다. 또한, $Rag2^{-/-}$, $IL\text{-}2rg^{Y/-}$, *hIL-6* KI 마우스를 인간 TPO를 발현하는 마우스(Rongvaux et al., 2011, Proc Natl Acad Sci USA, 108(6):2378-2383), 인간 IL-3 및 인간 GM-CSF를 발현하는 마우스(Willinger et al, 2011, Proc Natl Acad Sci USA, 108(6):2390-2395) 및 인간 M-CSF(Rathinam et al, 2011, Blood, 118(11):3119-3128)뿐 아니라 hSIRPa(Strowig et al., 2011, Proc Natl Acad Sci USA, 108(32):13218-13223)를 발현하는 마우스와 교배시켜서 이들 인간 단배질의 조합을 발현하는 마우스를 제조하였다($Rag2^{-/-}I12rg^{null}hSIRPa^{+}Tpo^{h/h}Mcsf^{h/h}I13/Gmcsf^{h/h}I16^{h/h}$).

[0172] 셀라인 및 일차 세포. 다발성 골수종 셀라인 INA-6(Burger et al., 2001, Hematol J, 2(1):42-53)를 37℃ 및 5% CO_2의 표준 인큐베이터에서 20% FCS, 페니실린/스트렙토마이신, L-글루타민 및 2.5ng/ml의 hIL-6가 첨가된 RPMI1640 배지 중에서 유지시켰다.

[0173] 다발성 골수종 환자로부터의 일차 세포를 환자로부터 고지에 입각한 동의서를 얻은 후 골수 흡인물(bone marrow aspirates)로부터 분리하였다. 단핵 세포를 Ficoll 밀도-구배 원심분리에 의해 정제하고, 이어서 상이한 세포

하위세트를 자기-활성화 세포 분류(MACS®)에 의하여 분리하였다. T 세포-고갈된 집단을 얻기 위하여, CD3+ 세포를 항-CD3 마이크로비즈(Miltenyi Biotec)를 사용하여 AutoMACS 시스템에 대한 네거티브 선택에 의해 고갈시켰다. CD138+ 세포를 얻기 위하여, CD138+ 세포를 항-CD138 마이크로비즈(Miltenyi Biotec)를 사용하여 AutoMACS 시스템에 대한 포지티브 선택에 의해 고갈시켰다. MACS® 선택 후에 세포의 순도를 유동 세포분석에 의해 분석하였다.

[0174] 세포의 이식. INA6 세포의 대퇴골 내 이식을 위해, $Rag2^{-/-}$ $Il2rg^{null}$ $Il6^{h/h}$ hSIRPa+ 마우스를 X-선원으로부터 200 rad로 2회 조사하였다. 그런 다음 표시된 양의 세포를 수용체 마우스의 대퇴골 안에 이식하였다. 간단히 설명하면, 마우스를 케타민/자일라진을 사용하여 마취시키고, 26 게이지 바늘을 사용하여 대퇴골의 슬개골 표면안으로 구멍을 뚫었다. 그런 다음 세포를 27 게이지 바늘을 사용하여 20㎕의 부피로 서서히 주사하였다. 일차 환자-유도 세포의 이식을 위해, $Rag2^{-/-}$ $Il2rg^{null}$ $hSIRPa^{+}$ $Tpo^{h/h}$ $Mcsf^{h/h}$ $Il3/Gmcsf^{h/h}$ $Il6^{h/h}$ 마우스를 X-선원으로부터 150rad로 W회 조사하고 상기에서 기술한 것과 같이 이식을 수행하였다.

[0175] ELISA. 상업용 ELISA 키트를 사용하여 인간 가용성 IL-6R(R&D Systems), 인간 Igκ 및 Igλ(Bethyl Laboratories)의 농도를 측정하였다. 이들 단백질의 검출을 제조자의 지시를 따라 수행하였다.

[0176] μCT. 대퇴골 형태계측을 콘-빔 미소초점 x-선 전산화 단층촬영(μCT40; ScancoMedicalAG)을 사용하여 정량하였다. 단층촬영 영상을 연속적으로 얻었고, 3D 영상을 재구성하여 매개변수를 측정하는 데 사용하였다. 섬유주 형태계측은 뼈 부피 계수, 섬유주 두께, 섬유주 수 및 섬유주 분리를 측정함으로써 특성확인하였다. 피질 측정은 평균 피질 두께, 피질골의 단면적, 골막하 단면적 및 골수 영역을 포함하였다.

[0177] 조직학. 대퇴골의 연조직을 벗겨내고, 10% 완충된 포르말린에 고정시킨 후 탈수시키고, 메틸 메타크릴레이트에 삽입한 후 절개하고 표준 과정에 따라 톨루이딘 블루로 염색하였다.

[0178] 결과

[0179] 인간화된 IL-6 유전자로 마우스에서 다발성 골수종 셀라인의 이식. 인간 IL-6 의존성 MM 셀라인(INA6-gfp)을 활용하여 인간 SIRPα 및 IL-6를 발현하는 마우스가 다발성 골수종(MM) 셀라인에 대한 적당한 숙주인지를 평가하였다. INA6-gfp 셀라인은 scid-hu 마우스(Epstein et al., 2005, Methods Mol Med, 113:183-190)의 이종이식 시스템에 이식될 때 인간 미세환경, 즉 인간 태아 골세편(bone chips)에 고도의 의존성을 나타낸다. 구체적으로, INA-6 세포는 단지 scid-hu 마우스에서 인간 뼈 이식편을 이식할 수 있는데, 그것은 일차 MM 세포와 유사하게 인간 골수 미세환경에 대한 의존성을 시사한다(Tassone et al., 2005, Blood, 106(2):713-716).

[0180] 그러므로, 골수종 세포의 성장을 가능하게 하는 IL-6 인간화의 잠재력을 직접적으로 시험하기 위하여, INA-6 세포를 i) $Rag2^{-/-}$ $Il2rg^{null}$, ii) $Rag2^{-/-}$ $Il2rg^{null}$ hSIRPa+, iii) $Rag2^{-/-}$ $Il2rg^{null}$ $Il6^{h/h}$ 및 iv) $Rag2^{-/-}$ $Il2rg^{null}$ $Il6^{h/h}$ hSIRPa+ 마우스에 정맥 내로 이식하였다. 이식을 혈액에서 INA-6 세포에 의해 분비된 sIL-6R 단백질을 측정함으로써 분석하였다. 이식은 오로지 인간 IL-6를 발현하는 마우스에서만 검출되었는데(도 1), 그것은 INA-6 세포가 실제로 인간 IL-6를 발현하는 마우스를 이식할 수 있음을 증명한다. 다음으로, 이식된 마우스에서 INA-6 세포(GFP를 발현하도록 변형됨)의 위치를 형광 현미경에 의해 조사하였다. 골수에서 소수의 GFP+ 세포가 검출되었지만(도 2), 증가된 수의 GFP+ 세포를 이식된 마우스의 폐에서 검출하였다(도 3).

[0181] 인간 Il6 유전자 발현의 분석은 가장 높은 인간 Il6 유전자 발현 수준이 폐에서 발견되었고(도 3), 그러므로 폐의 INA-6 세포의 존재와 관련이 있다. 요약하면, 본원에 개시된 데이터는 인간 IL6 또는 인간 IL6 및 SIRPa를 발현하도록 유전자 변형된 마우스로의 정맥 내 주사(i.v.) 후의 INA-6 세포의 성공적인 이식을 증명하고, 그것은 유전자 인간화가 마우스에서 인간 MM 세포의 성장 제약을 극복할 수 있음을 시사한다.

[0182] 도 3의 데이터는 INA-6 세포가 골수로 효율적으로 복귀하지 못하고 대신 비-생리적 부위에서 성장할 수 있음을 시사한다. 그러므로, 다음으로 종양 셀라인의 그것의 원래 미세환경으로의 이식이 인간 MM과 전형적으로 관련된 병리학을 재생할 수 있는지를 조사하였다. 그렇게 하기 위해 INA6 세포의 뼈 내 주사를 시험하였다. 이것은 놀랍게도 뼈 파괴 및 재흡수를 초래하였고, 그것은 MM 환자에서 볼 수 있는 병리학의 측면들이다(도 4 내지 6). 구체적으로, 섬유주 뼈 질량의 손실을 조직학에 의해 관찰하였고, 그것을 μCT에 의해 정량하였다. 더욱이, 말초 부위, 예컨대 폐로의 제한된 전이만이 관찰되었고, 그것은 모델이 이 병리학을 간섭하는 신규한 약물을 조사하기 위해 추가로 탐구될 수 있다는 결론을 유도한다. 이 결론을 시험하기 위하여, INA-6-이식된 마우스를 통상적으로 다발성 골수종 환자를 치료하기 위해 사용되는 두 가지 약물 Zometa 또는 Velcade로 처리하였다. 놀랍게

도, INA-6 세포를 주사한 마우스의 Zometa 처리는 μCT에 의해 정량되는 것과 같이 미처리 마우스에 비료하여 뼈 재흡수를 감소시킬 수 있었다(도 7).

[0183] 본원에 개시된 데이터는 I16 유전자의 인간화가 전형적으로 인간 미세환경을 필요로 하는 다발성 골수종 셀라인의 이식을 가능하게 하는 것을 증명한다. 이식은 뼈 손실을 포함하여 환자에게서 관찰되는 여러 병리학적 증상들을 개괄한다. 나아가 이들 증상은 새로운 약물을 시험하기 위한 이 모델의 활용성을 강조하는 승인된 약물을 사용하여 치료될 수 있다.

[0184] 사이토킨 유전자의 유전자 인간화는 일차 환자-유도 다발성 골수종 세포의 이식을 가능하게 한다. 다음으로, 일차 MM 세포의 유전자 인간화된 마우스 안으로의 이식을 조사하기 위한 실험들을 수행하였다. 트롬보포이에틴, IL-3, GM-CSF 및 M-CSF를 포함하는 다수의 사이토킨뿐 아니라 마크로파지 억제성 수용체 SIRPa의 인간화는 면역결핍 마우스에서 인간 조혈 세포의 개선된 이식을 초래한다는 것은 앞서 증명된 바 있다(Strowig et al., 2011, Proc Natl Acad Sci USA, 108(32):13218-13223; Rathinam et al, 2011, Blood, 118(11):3119-3128; Rongvaux et al., 2011, Proc Natl Acad Sci USA, 108(6):2378-2383; Willinger et al, 2011, Proc Natl Acad Sci USA, 108(6):2390-2395). 구체적으로, IL-3 및 GM-CSF 뿐 아니라 M-CSF의 인간화는 MM 병리학의 특수한 측면에 중요한 것으로 증명되어 있는 골수성 세포의 이식을 개선시켰다. hSIRPa의 이식유전자 발현은 인간 세포 이식을 개선시키지만, SIRPa-CD47 축은 또한 최근에 종양 형성에 관련된 것으로 나타났다. 이전에 생성된 인간화된 마우스를 인간 IL-6 녹-인 마우스와 조합하여 *Rag2*$^{-/-}$ *Il2rg*^{null} *hSIRPa*$^{+}$ *Tpo*$^{h/h}$ *Mcsf*$^{h/h}$ *Il3/Gmcsf*$^{h/h}$ *Il6*$^{h/h}$ 마우스를 생성시켰다. 이 계통이 인간 세포 이식을 지지하는 능력을 평가하기 위하여, MM 환자로부터 CD3-고갈된 골수 세포를 마우스의 골수에 주입하였다. CD138+CD38+CD19- 세포로서 확인되는 바, 고빈드수의 골수종 세포를 주입된 뼈에서 검출한 한편, 단지 소수의 세포만을 부행 뼈에서 검출하였다(도 8).

[0185] 이들 결과는 본원에서 기술된 유전자 인간화된 마우스가 생체 내에서 일차 인간 MM 세포의 이식을 지지하는 것을 시사한다. 본 데이터는 IL-6, TPO, IL-3, GM-CSF 및/또는 M-CSF 사이토킨 유전자의 인간화가 성공적인 이식을 위해 전형적으로 인간 미세환경을 필요로 하는 환자로부터의 일차 다발성 골수종 세포의 이식을 가능하게 하는 것을 증명한다.

[0186] 실시예 2: IL-6 유전자의 유전자 인간화는 인간 조혈 세포로 마우스를 이식하는 것을 가능하게 한다

[0187] 재료 및 방법

[0188] 마우스. 인간화된 IL-6 KI 마우스를 상기에서 기술된 것과 같이 제조하였다. 키메릭 마우스를 먼저 BALB/c 마우스와 교배시킨 후 동형접합성의 hIL-6를 가지는 새끼를 얻기 위해 역교배시켰다. 동일한 혼합형 BALB/c x 129 배경을 가지는 마우스를 대조표준으로서 사용하였다.

[0189] 신생 새끼들(생애 첫 날 안에)을 2 x 150cGy로 4-시간 간역으로 X-선 조사에 의해 거의 치사량에 가깝게 조사하였다. 조사 후 4시간 후에 마우스에 30-게이지 바늘(Hamilton Company, NV, USA)을 사용하여 20㎕의 PBS 중의 1 내지 2x10^{5} $CD34^{+}$ 태아 간(FL) 세포를 주사하였다. 마우스들을 3주째에 이유식을 시작하였다. 마우스를 특이한 병원균-유리 조건 하에서 유지시키고, 모든 실험을 예일대 동물 보호 및 사용 연구 위원회(Yale Institutional Animal Care and Use Committee) 프로토콜에 따라 수행하였다.

[0190] 인간 및 마우스 혈액학적 세포 집단의 분석. 이식 후 상이한 시간에 아이소플루오레인 마취 하에 안와 정맥총으로부터 마우스를 출혈시켰다. 혈장 샘플을 수집하고 추가의 Ig 측정을 위해 -20℃에서 보관하였다. 적혈구를 암모늄-클로라이드(ACK) 용해 완충액을 사용함으로써 2회 용해하고 남아 있는 PBMC를 FACS 완충액(5% FBS 및 5mM EDTA가 첨가된 PBS)에 재현탁하였다.

[0191] 마우스가 죽었을 때, 세포의 단일-세포 현탁액을 골수(BM), 흉선 및 비장으로부터 얻었다. 그런 다음 샘플을 마우스 및 인간 세포 표면 항원에 대한 플루오로크롬-표지된 mAb로 제조자의 지시를 따라 염색하였다. 다음의 항-인간 mAb들을 사용하였다: CD45(HBO), CD19(HIB19), CD3(UCHT1), CD4(RPA-T4), CD8(HIT8a), CD20(2H7), CD5(UCHT2), CD27(0323), CD24(ML5), CD10(HI10a)(이상 모두 Biolegend, CA, USA); CD33(WM53), CD38(HIT2), IgM(G20-127), CD138(Mil 5)(BD Biosciences) 및 CD34(AC136)(Miltenyi Biotec). 마우스 세포를 항-쥐 CD45 Ab(30-F11, Biolegend)로 염색하였다. 샘플을 LSRII(BD Biosciences) 사이토메터 상에서 획득하고 FlowJo(Treestar, OR, USA) 소프트웨어로 분석하였다.

[0192] 인간 면역글로불린의 측정. 총 면역글로불린(Ig)을 ELISA에 의해 마우스로부터 수집한 혈장에서 측정하였다. 96 웰 플레이트(Nunc, NY, USA)를 4℃에서 밤새 20㎍/ml의 정제된 염소 항-인간 IgM 및 IgG(Southern

Biotechnology, AL, USA)로 코팅하였다. PBS로 세척 및 차단한 후에 1% 소혈청 알부민(BSA, Sigma- Aldrich)으로 적절하게 희석한 샘플을 2시간 동안 실온(RT)에서 첨가하였다. 플레이트를 세척하고 1시간 동안 RT에서 아이소타입 특이적 이차 비오티닐화된 항체(Southern Biotechnology)와 이어서 스트렙트아비딘-HRP(Pierce Protein Research Products, IL, USA)와 함께 인큐베이션하였다. 최종 세척 후에 효소 활성을 TMB 기질 용액을 사용하고 이어서 중지 용액(둘 다 Pierce Protein Research Products)을 사용하여 측정하였다. 흡광도를 450nm에서 측정하였다. Bethyl(TX, USA)로부터의 인간 혈청 샘플을 참조로서 사용하였다.

[0193] 통계학적 분석. 모든 데이터를 평균±평균의 표준 편차(SEM)로 표시하되, Ab 수준은 기하학적 평균으로서 도표화하였다. 비모수 Mann-Whitney U 시험을 사용하여 두 그룹 간의 통계학적 유의미를 측정하였다. p 값이 0.05보다 낮을 때 그 차이는 유의미한 것으로 간주하였다.

[0194] 결과

[0195] 인간 $CD34^+$ 세포 이식된 $RAG2^{-/-}\gamma_c^{-/-}$ 마우스에서의 말초혈 이식. IL6h/h 마우스는 IL6m/m 마우스와 비교할 때 분석의 전 시간을 통해 더 높은 말초혈(PB) 이식을 나타냈고 시간이 경화함에 따라 그것들의 이식은 증가하였다(도 9). 시험한 어떤 시점에서도 2 그룹 간에 인간 세포의 조성물의 중요한 차이는 없었다(도 10). 두 그룹에서 B와 T 세포 백분율은 8주 및 16 내지 20주에 유사한 반면, 11 내지 15주에는 B세포의 백분율(IL6m/m에서 69.23±3.97 및 IL6h/h에서 55.91±4.86)이 T 세포의 백분율보다 더 높았다(IL6m/m에서 16.86±3.14 및 IL6h/h에서 30.26±6.23). 골수성 CD33+ 세포는 소량의 인간 세포를 나타냈고 시간이 갈수록 그것의 백분율은 감소하였다.

[0196] 인간 $CD34^+$ 세포 재구성된 $RAG2^{-/-}\gamma_c^{-/-}$ 마우스에서의 기관 세포 이식 및 조성. 인간 기원의 세포를 혈액-림프구성 기관, 예컨대 BM, 비장 및 흉선에서 발견하였다(도 11A). 흥미롭게도, IL6h/h 마우스의 비장은 IL6m/m 마우스보다 더 큰 인간 이식을 나타냈다(61.75% ± 10.87 대 23.56% ± 5.2). 이들 데이터는 인간 세포의 절대 수의 배가에 의해 확인하였다($14.21x10^6$ ± 1.38 대 $7.26x10^6$ ± 0.66)(도 11B).

[0197] 인간 $CD34^+$ 이식된 $RAG2^{-/-}\gamma_c^{-/-}$ 마우스에서의 B 세포 성숙. 인간 B 세포의 성숙 단계를 도 12A에서 예시한 것과 같이, CD24, CD38 및 표면 IgM 항체의 조합의 용법을 토대로 하여, 이식된 마우스의 BM 및 비장에서 게이팅 전략을 사용하여 연구하였다. 이 전략은 특히 과도기 B 세포 하위세트의 존재를 조사하는 데 도움이 된다. BM에서 주요 구획을 Pro/Pre-B 세포(도 12B)에 의해 만들었고, 이때 IL6m/m과 IL6h/h 마우스 사이에 차이는 없었다(각각 76.04% ± 9.09 and 79.07% ± 3.43). 두 그룹의 비장은 성숙한 B 세포를 함유하였지만(~20%) 여전히 미성숙/과도기 세포의 백분율이 높았다(27.13% ± 8.99 및 36.45% ± 5.12).

[0198] 비장에서 B 세포의 상당한 백분율이 $CD5^+$였고(도 13B), 인간 BM 및 말초 B 세포상에서 마커는 공통적으로 발현되지 않았지만 FL B 세포 상에서 낮은 백분율로 발견되었다(도 13A).

[0199] IL6h/h 마우스는 IL6m/m 마우스와 비교할 때 비장의 $CD27^+$ B 세포의 백분율의 급증가를 보였지만(24.73% ± 8.94 대 9.46% ± 2.32) BM에서는 매우 적은 수의 $CD27^+$ 세포가 발견되었다(도 14A 및 14B).

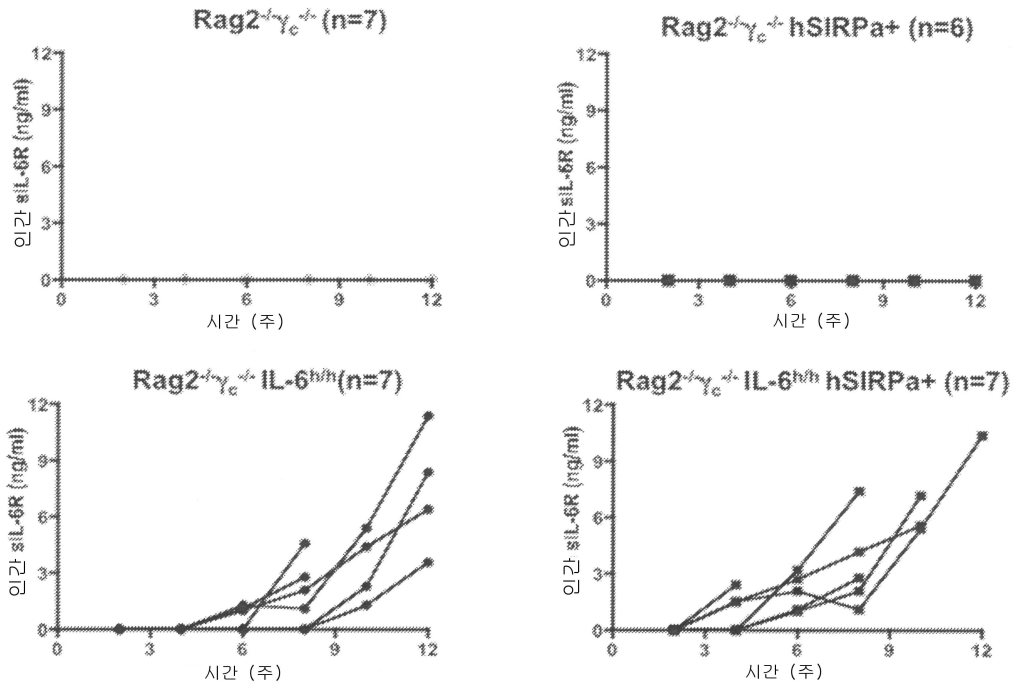
[0200] 인간 $CD34^+$ 세포 이식된 $RAG2^{-/-}\gamma_c^{-/-}$ 마우스에서의 항체 생성. B 세포가 이식된 마우스에서 발견되었기 때문에, 다음으로 인간 세포 이식 후 12 및 20주에 수집한 혈장의 인간 IgM 및 IgG의 농도를 측정하였다. IL6m/m 및 IL6h/h 마우스 둘 다 인간 IgM 및 IgG를 분비하였다(도 15).

[0201] 일반적으로 항체를 분비하는 IL6h/h 마우스의 백분율은 IL6m/m 마우스와 비교하여 더 높았는데, 전자는 더 적은 수준의 IgM 수준을 보였지만(12주에 14.69㎍/ml 대 33.66㎍/ml 및 20주에 18.25㎍/ml 대 190.2㎍/ml) IgG 수준은 증가하였다(12주에 243㎍/ml 대 49.6㎍/ml 및 20주에 553.6㎍/ml 대 297.2㎍/ml)(도 15A).

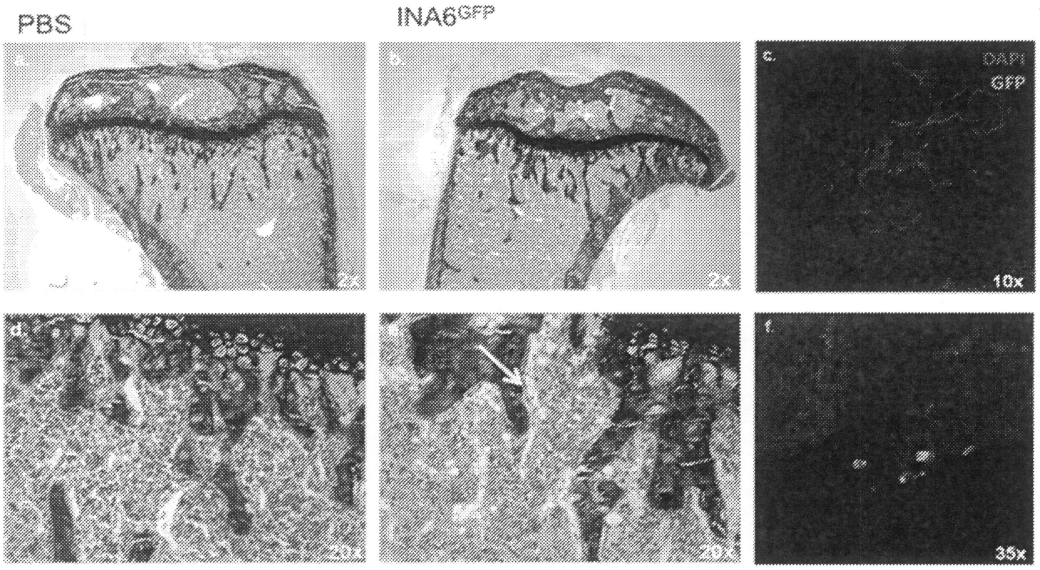
[0202] 본원에서 인용된 각각의 및 모든 특허, 특허 출원 및 공개의 개시 내용은 본원에 그것의 전체가 참조로 포함된다. 본 발명이 특정 구체예를 참조로 하여 개시되었지만, 본 발명의 다른 구체예 및 변화가 본 발명의 진정한 사상 및 범주로부터 벗어남이 없이 해당 기술분야에 숙련된 다른 사람들에 의해 고안될 수 있음이 명백하다. 첨부된 청구범위는 그러한 구체예 및 동등한 변화를 모두 포함하는 것으로 해석되어야 할 것으로 의도된다.

도면

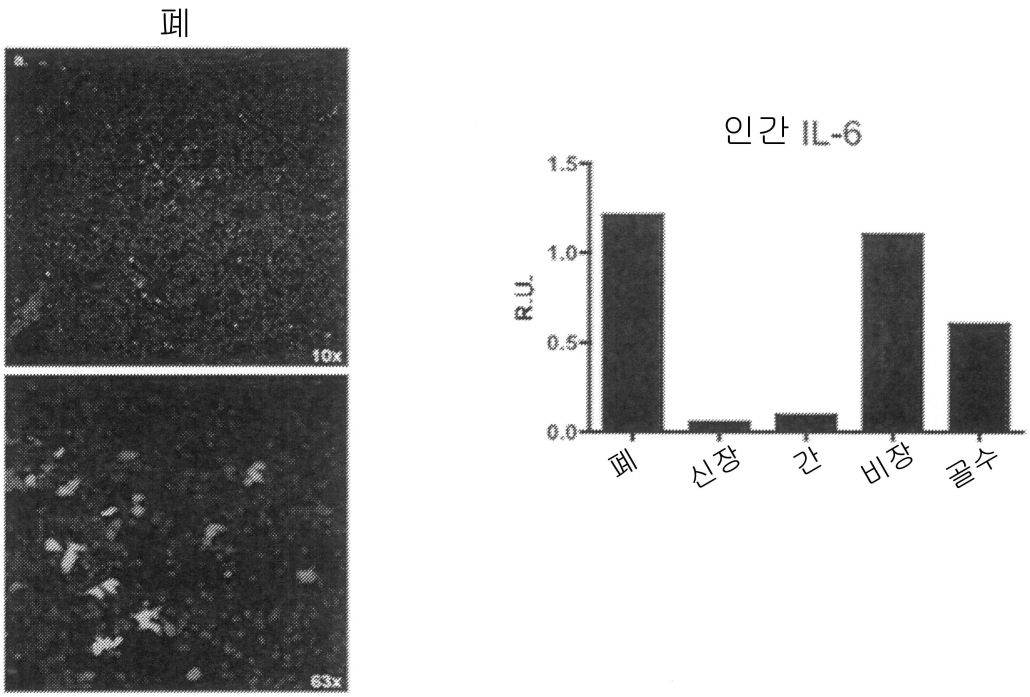
도면1


Rag2-/-γc-/- (n=7)
Rag2-/-γc-/- hSIRPa+ (n=6)
Rag2-/-γc-/- IL-6h/h(n=7)
Rag2-/-γc-/- IL-6h/h hSIRPa+ (n=7)
인간 sIL-6R (ng/ml)
시간 (주)
0
3
6
9
12

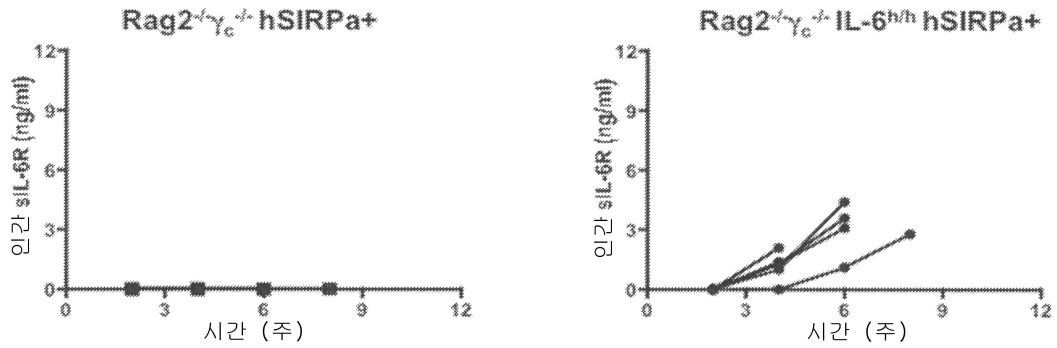
도면2


PBS
INA6GFP
a.
b.
c.
DAPI
GFP
2x
2x
10x
d.
e.
f.
20x
20x
35x

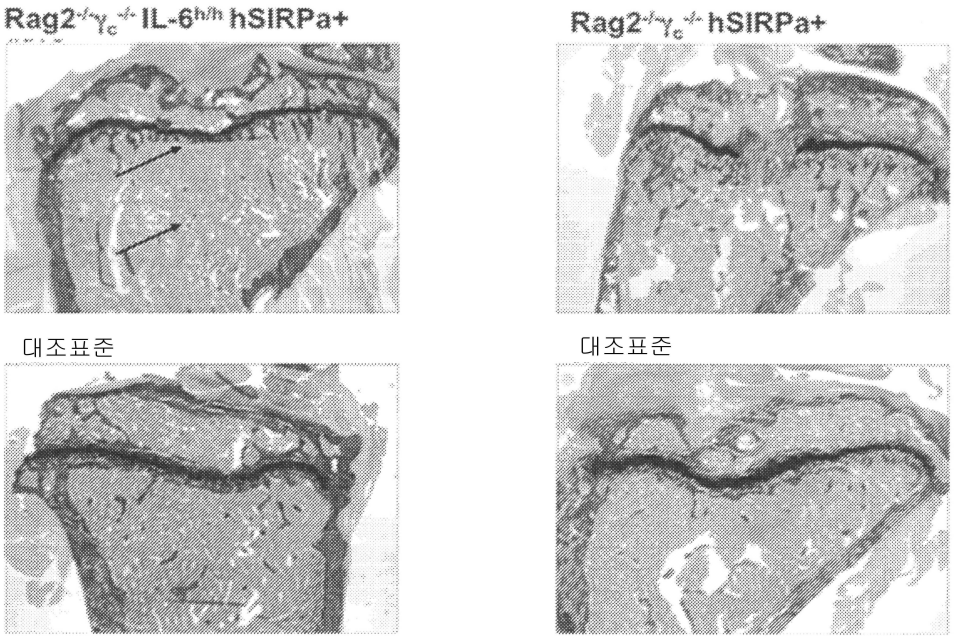
도면3


폐
10x
63x
인간 IL-6
R.U.
1.5
1.0
0.5
0.0
폐
신장
간
비장
골수

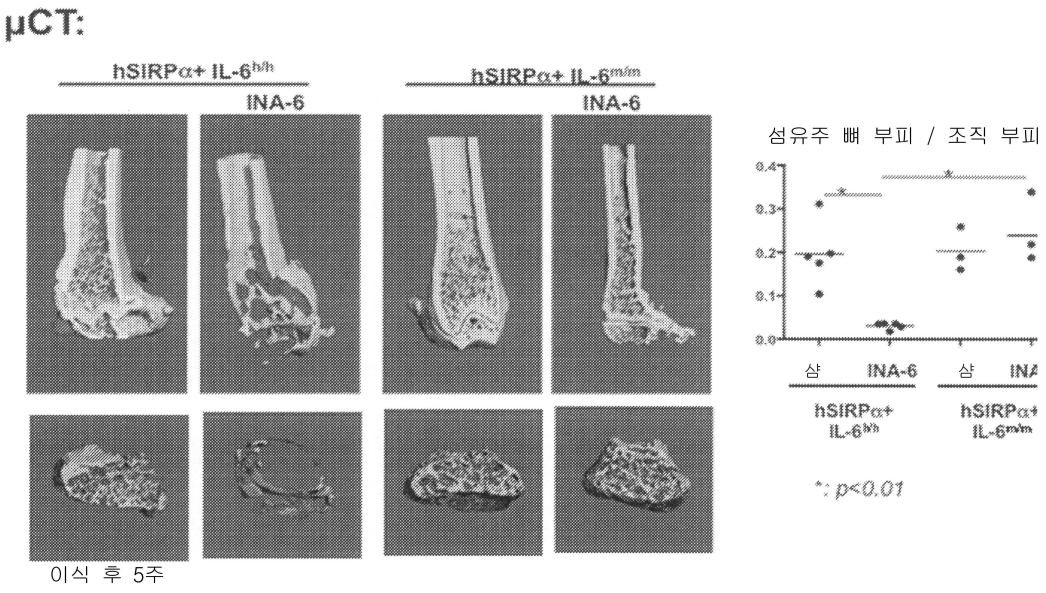
도면4


Rag2-/-γc-/- hSIRPa+
인간 sIL-6R (ng/ml)
12
9
6
3
0
0
3
6
9
12
시간 (주)
Rag2-/-γc-/- IL-6h/h hSIRPa+
인간 sIL-6R (ng/ml)
12
9
6
3
0
0
3
6
9
12
시간 (주)

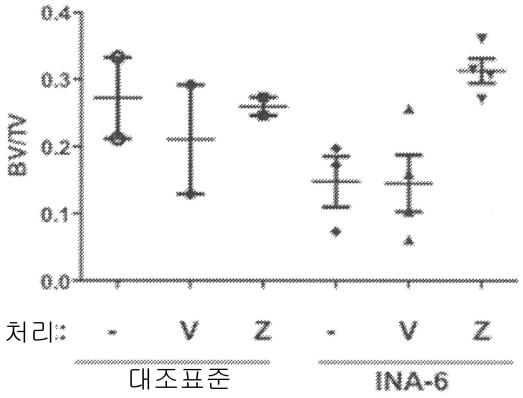
도면5


Rag2-/-γc-/- IL-6h/h hSIRPa+
Rag2-/-γc-/- hSIRPa+
대조표준
대조표준

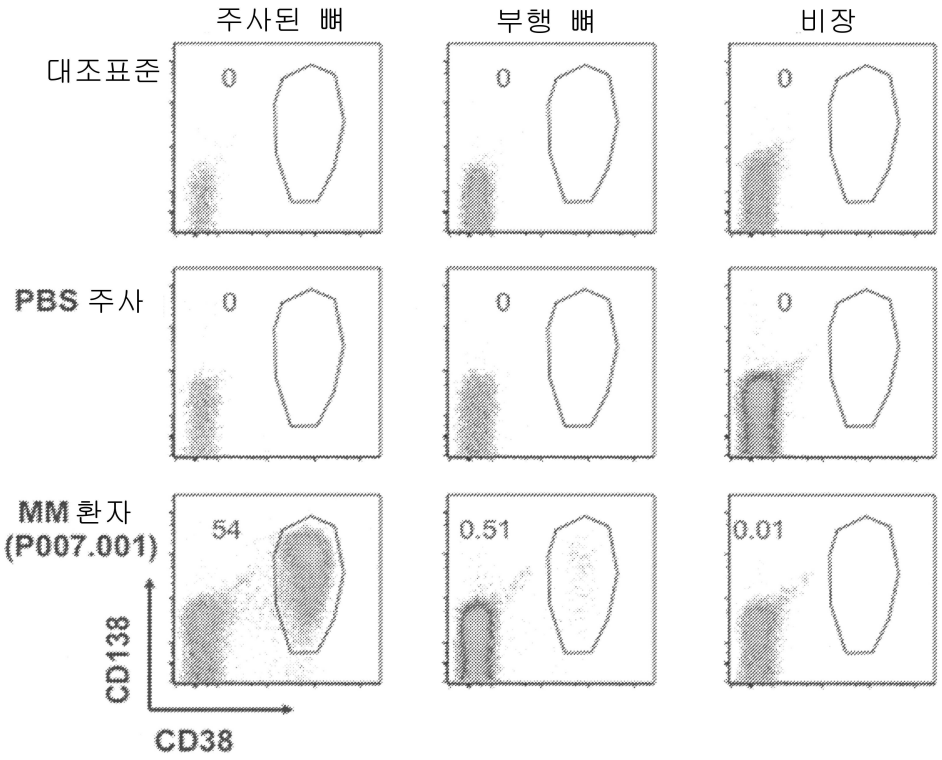
도면6


μCT:
hSIRPα+ IL-6h/h
INA-6
hSIRPα+ IL-6m/m
INA-6
이식 후 5주
섬유주 뼈 부피 / 조직 부피
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
삼
INA-6
삼
INA
hSIRPα+
IL-6h/h
hSIRPα+
IL-6m/m
*: p<0.01

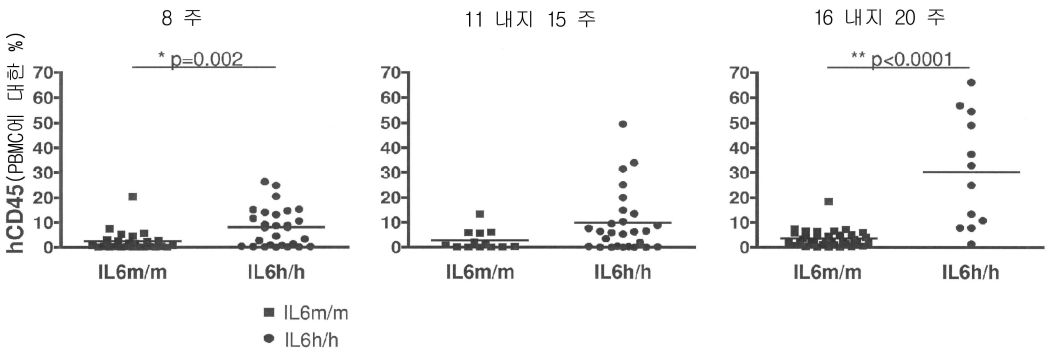
도면7


BV/TV
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
처리:
-
V
Z
-
V
Z
대조표준
INA-6

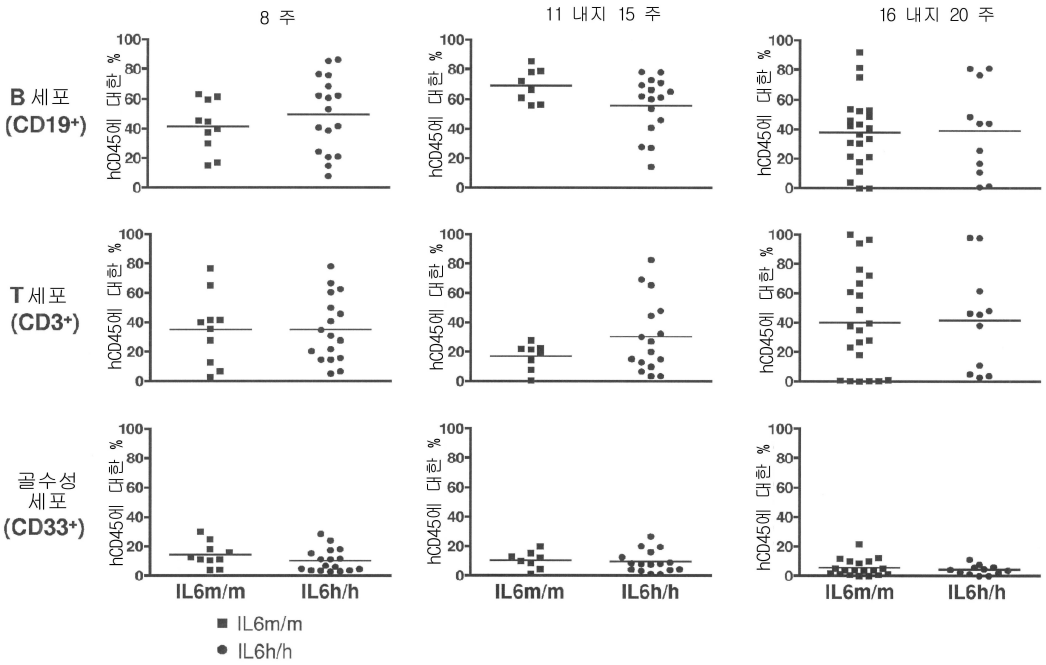
도면8


주사된 뼈
부행 뼈
비장
대조표준
PBS 주사
MM 환자
(P007.001)
0
54
0.51
0.01
CD138
CD38

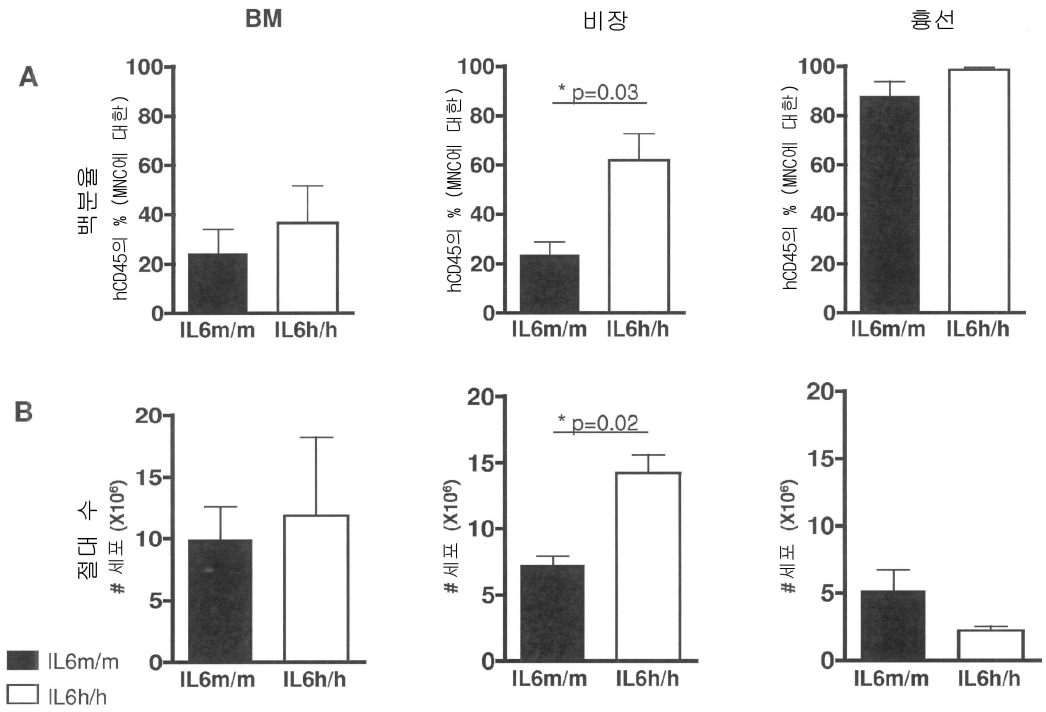
도면9


8 주
11 내지 15 주
16 내지 20 주
* p=0.002
** p<0.0001
hCD45(PBMC에 대한 %)
IL6m/m
IL6h/h
IL6m/m
IL6h/h

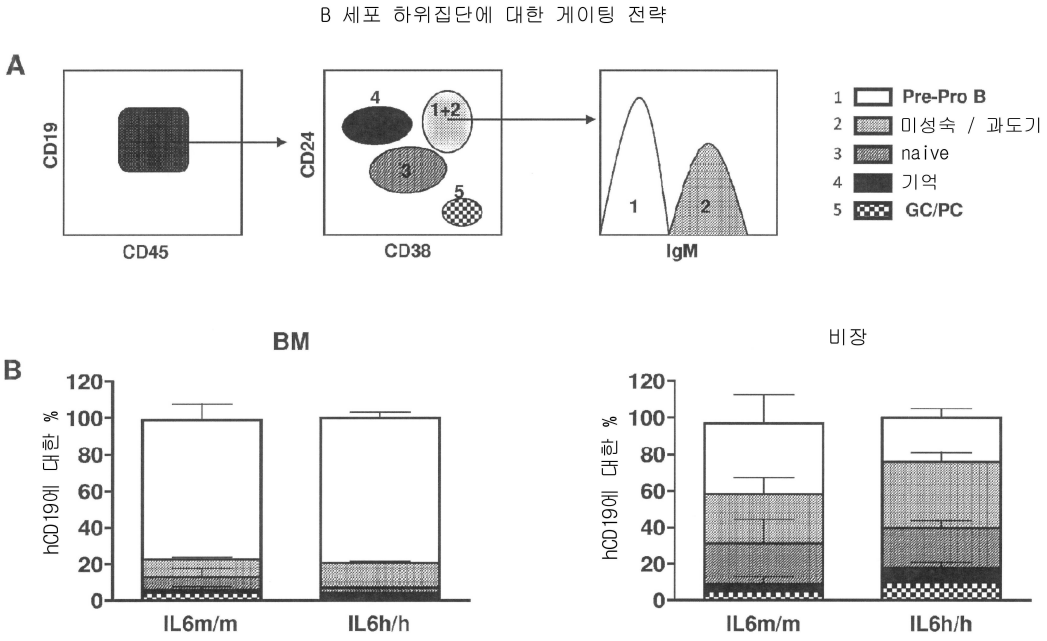
도면10


8 주
11 내지 15 주
16 내지 20 주
B 세포 (CD19+)
T 세포 (CD3+)
골수성 세포 (CD33+)
hCD45에 대한 %
IL6m/m
IL6h/h

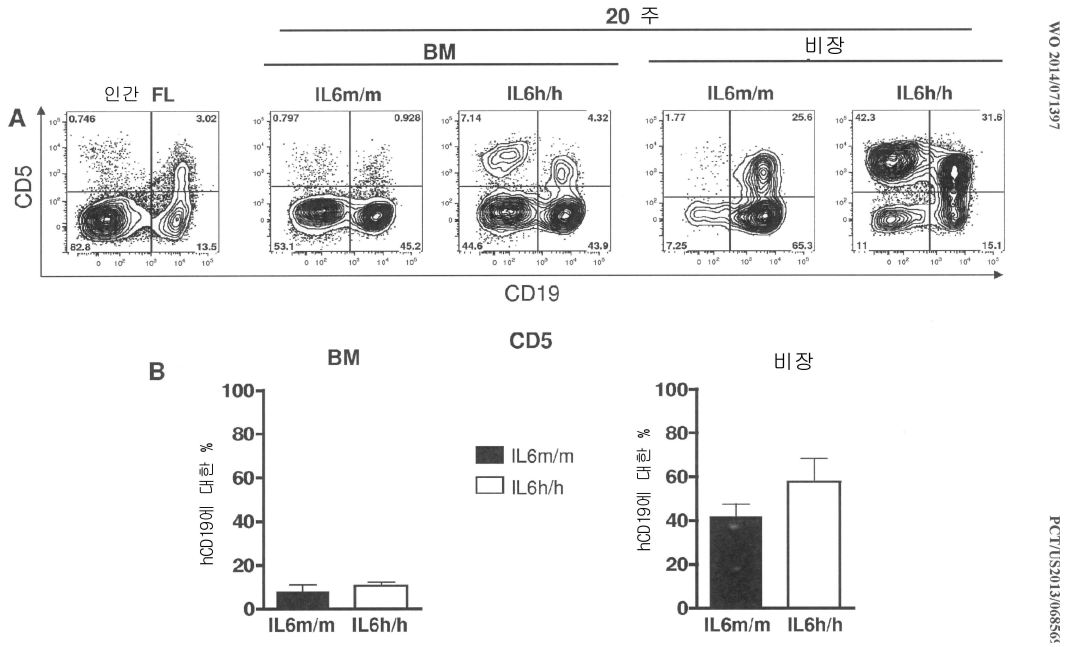
도면11


BM
비장
흉선
A
백분율
hCD45의 % (MNC에 대한)
* p=0.03
B
절대 수
세포 (X10⁶)
* p=0.02
IL6m/m
IL6h/h

도면12

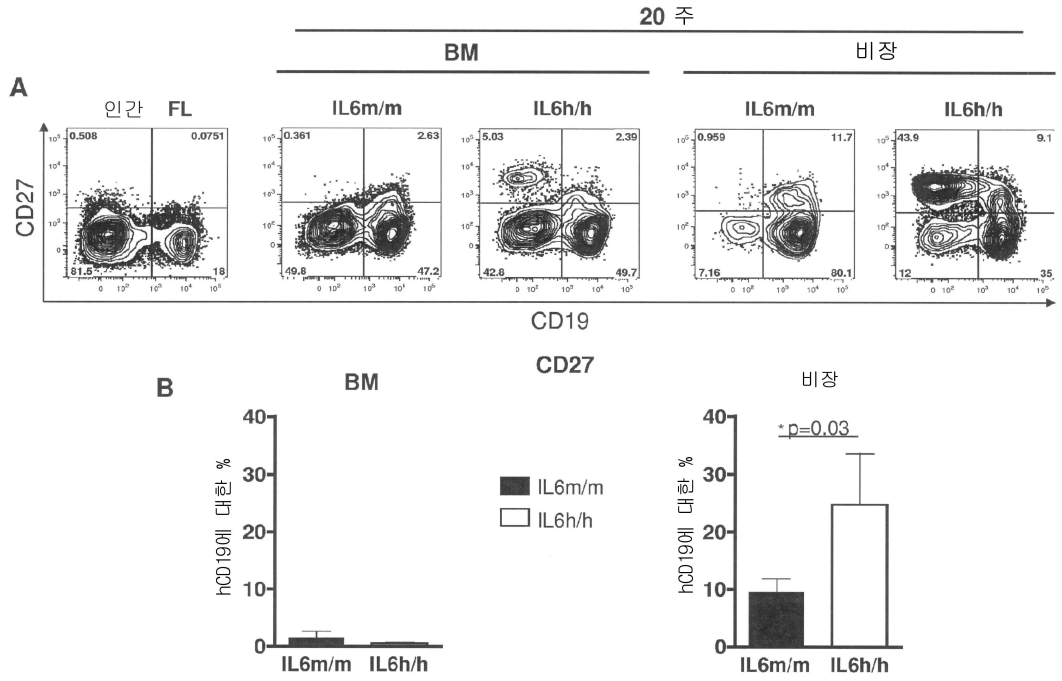


도면13

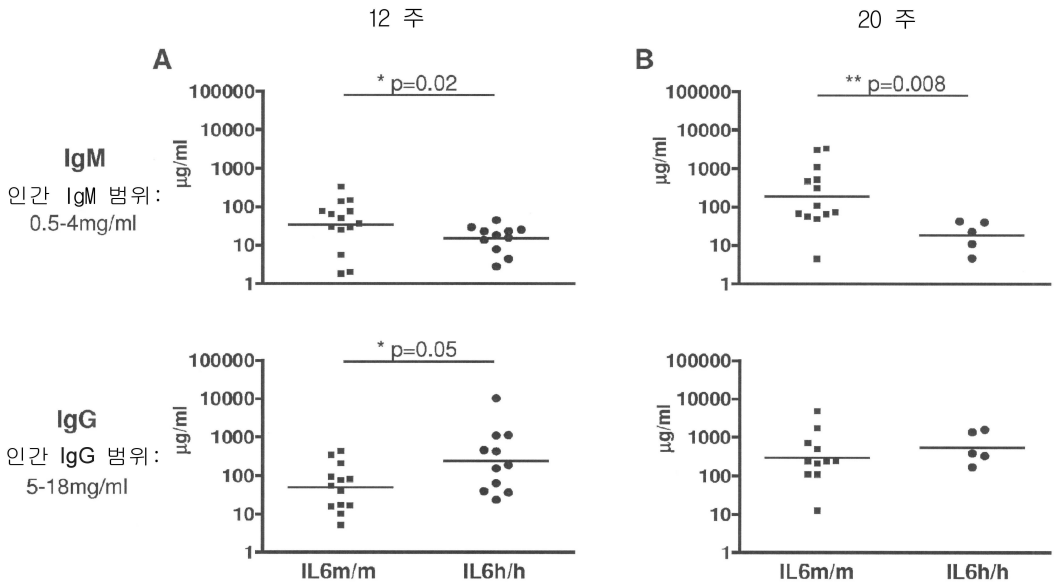


WO 2014/071397
PCT/US2013/068856

도면14


20 주
BM
비장
A
인간 FL
IL6m/m
IL6h/h
IL6m/m
IL6h/h
CD27
CD19
0.508
0.0751
81.5
18
0.361
2.63
49.8
47.2
5.03
2.39
42.6
49.7
0.959
11.7
7.16
80.1
43.9
9.1
12
35
B
BM
CD27
비장
hCD19에 대한 %
IL6m/m
IL6h/h
*p=0.03
IL6m/m
IL6h/h
IL6m/m
IL6h/h

도면15


12 주
20 주
A
B
IgM
인간 IgM 범위:
0.5-4mg/ml
* p=0.02
** p=0.008
μg/ml
IgG
인간 IgG 범위:
5-18mg/ml
* p=0.05
IL6m/m
IL6h/h
IL6m/m
IL6h/h