



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102725400 A

(43) 申请公布日 2012. 10. 10

(21) 申请号 201080038847. 9

代理人 陈文平

(22) 申请日 2010. 06. 28

(51) Int. Cl.

(30) 优先权数据

C12N 5/071 (2006. 01)

61/221, 438 2009. 06. 29 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2012. 02. 29

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2010/040260 2010. 06. 28

(87) PCT申请的公布数据

W02011/002727 EN 2011. 01. 06

(71) 申请人 麻省理工学院

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 陈清风 陈建竹

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所

11256

权利要求书 5 页 说明书 24 页 附图 21 页

(54) 发明名称

制造人源化的非人类哺乳动物的方法

(57) 摘要

在此提供了在一种非人类哺乳动物体内重建功能性人类血细胞谱系的方法,包括将人类造血干细胞 (HSC) 和编码一种或多种人类细胞因子的核酸引入到一种免疫缺陷型非人类哺乳动物体内。在其中在该非人类哺乳动物体内该核酸被表达并且这些人类 HSC 分化成多种功能性人类血细胞谱系的条件下维持该非人类哺乳动物,由此在该非人类哺乳动物体内重建功能性人类血细胞谱系。还提供了在一种非人类哺乳动物体内生产出针对一种免疫原的人类抗体的多种方法、分泌这些单克隆抗体的杂交瘤以及由这些 B 细胞生产的抗体 (例如多克隆抗体、单克隆抗体) 以及由这些方法生产的非人类哺乳动物。

1. 一种在非人类哺乳动物体内重建功能性人类血细胞谱系的方法,包括
 - a) 将人类造血干细胞 (HSC) 和编码一种或多种人类细胞因子的核酸引入到一种免疫缺陷型非人类哺乳动物体内;并且
 - b) 在其中在该非人类哺乳动物体内该核酸被表达并且这些人类 HSC 分化成多种功能性人类血细胞谱系的条件下维持该非人类哺乳动物,由此在该非人类哺乳动物体内重建功能性人类血细胞谱系。
2. 如权利要求 1 所述的方法,其中在将 HSC 引入该非人类哺乳动物体内之后引入编码该一种或多种人类细胞因子的核酸。
3. 如权利要求 1 所述的方法,其中编码该一种或多种人类细胞因子的核酸以裸 DNA 的形式或在一种载体中引入。
4. 如权利要求 3 所述的方法,其中该载体是一种质粒、一种病毒载体、或它们的一种组合。
5. 如权利要求 4 所述的方法,其中该病毒载体是一种慢病毒或一种腺病毒载体。
6. 如权利要求 1 所述的方法,其中编码该一种或多种人类细胞因子的核酸以质粒 DNA 的形式使用流体动力学注射方法引入。
7. 如权利要求 1 所述的方法,其中该一种或多种人类细胞因子是选自下组,该组由以下各项组成:白细胞介素 -12(IL-12)、白细胞介素 -15(IL-15)、Flt3L(Fms- 相关酪氨酸激酶 3 配体)、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF)、白细胞介素 -4(IL-4)、白细胞介素 -3(IL-3)、巨噬细胞集落刺激因子 (M-CSF)、促红细胞生成素 (EPO) 以及它们的一种组合。
8. 如权利要求 1 所述的方法,其中该非人类哺乳动物是一个小鼠。
9. 如权利要求 8 所述的方法,其中该小鼠是选自下组,该组由以下各项组成:一种携带重度联合免疫缺陷突变的非肥胖糖尿病小鼠 (NOD/scid 小鼠)、一种携带重度联合免疫缺陷突变并且缺少针对细胞因子受体 γ 链的一种基因的非肥胖糖尿病小鼠 (NOD/scid IL2R $\gamma^{-/-}$ 小鼠) 以及一种 Balb/c rag $^{-/-}$ γ c $^{-/-}$ 小鼠。
10. 如权利要求 1 所述的方法,其中被重建的该功能性人类血细胞谱系是功能性人类髓样细胞、功能性人类淋巴样细胞或它们的组合。
11. 如权利要求 10 所述的方法,其中这些人类髓样细胞是人类单核细胞、人类巨噬细胞、人类树突状细胞、人类红细胞、以及它们的组合;并且该人类淋巴样细胞是人类 NK 细胞、人类 B 细胞、人类 T 细胞、以及它们的组合。
12. 如权利要求 1 所述的方法,其中该一种或多种人类细胞因子是白细胞介素 -15(IL-15) 以及 Fms- 相关酪氨酸激酶 3 配体 (Flt3L),并且在该非人类哺乳动物体内重建的这些功能性血细胞谱系是人类 NK 细胞。
13. 如权利要求 1 所述的方法,其中该一种或多种人类细胞因子是粒细胞巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF) 以及白细胞介素 4(IL-4),并且在该非人类哺乳动物体内重建的这些功能性血细胞谱系是人类树突状细胞。
14. 如权利要求 1 所述的方法,其中该一种或多种细胞因子是巨噬细胞集落刺激因子 (M-CSF),并且在该非人类哺乳动物体内重建的这些功能性血细胞谱系是人类单核细胞 / 巨噬细胞。

15. 如权利要求 1 所述的方法,其中该一种或多种细胞因子是促红细胞生成素 (EPO) 以及白细胞介素 3 (IL-3), 并且在非人类哺乳动物体内重建的这些功能性血细胞谱系是人类红细胞。

16. 一种在非人类哺乳动物体内重建功能性人类 NK 细胞的方法,包括

a) 将人类造血干细胞 (HSC) 和编码一种或多种人类细胞因子的核酸引入一种免疫缺陷型非人类哺乳动物体内,其中当表达于该非人类哺乳动物体内时,这些人类细胞因子促进人类 HSC 分化成功能性人类 NK 细胞;并且

b) 在其中在该非人类哺乳动物体内该核酸被表达并且这些人类 HSC 分化成多种功能性人类 NK 细胞的条件下维持该非人类哺乳动物,

由此增强了该非人类哺乳动物体内人类 NK 细胞的重建。

17. 如权利要求 16 所述的方法,其中该核酸编码人类 IL-15 以及人类 Flt-3/Flk-2 配体。

18. 如权利要求 17 所述的方法,其中该非人类哺乳动物的外周血中约 5% 至约 21% 的白细胞是人类 NK 细胞。

19. 如权利要求 18 所述的方法,其中在该非人类哺乳动物体内将人类 NK 细胞的表达维持约 30 天。

20. 一种在非人类哺乳动物体内重建功能性人类树突状细胞的方法,包括:

a) 将人类造血干细胞 (HSC) 和编码一种或多种人类细胞因子的核酸引入一种免疫缺陷型非人类哺乳动物体内,其中当表达于该非人类哺乳动物体内时,这些人类细胞因子促进人类 HSC 分化成功能性人类树突状细胞;并且

b) 在其中在该非人类哺乳动物体内该核酸被表达并且这些人类 HSC 分化成多种功能性人类树突状细胞的条件下维持该非人类哺乳动物,

由此增强了该非人类哺乳动物体内功能性人类树突状细胞的重建。

21. 如权利要求 20 所述的方法,其中该核酸编码人类 GM-CSF 以及人类 IL-4。

22. 如权利要求 21 所述的方法,其中进一步包括引入编码人类 Flt-3/Flk-2 配体的核酸。

23. 一种在非人类哺乳动物体内重建功能性人类单核细胞 / 巨噬细胞的方法,包括:

a) 将人类造血干细胞 (HSC) 和编码一种或多种人类细胞因子的核酸引入一种免疫缺陷型非人类哺乳动物体内,其中当表达于该非人类哺乳动物体内时,这些人类细胞因子促进人类 HSC 分化成功能性人类单核细胞 / 巨噬细胞;并且

b) 在其中在该非人类哺乳动物体内该核酸被表达并且这些人类 HSC 分化成多种功能性人类单核细胞 / 巨噬细胞的条件下维持该非人类哺乳动物,

由此增强了该非人类哺乳动物体内功能性人类单核细胞 / 巨噬细胞的重建。

24. 如权利要求 23 所述的方法,其中该核酸编码人类巨噬细胞集落刺激因子。

25. 一种在非人类哺乳动物体内重建功能性人类红细胞的方法,包括:

a) 将人类造血干细胞 (HSC) 和编码一种或多种人类细胞因子的核酸引入一种免疫缺陷型非人类哺乳动物体内,其中当表达于该非人类哺乳动物体内时,这些人类细胞因子促进人类 HSC 分化成功能性人类红细胞;并且

b) 在其中在该非人类哺乳动物体内该核酸被表达并且这些人类 HSC 分化成多种功能

性人类红细胞的条件下维持该非人类哺乳动物，

由此增强了该非人类哺乳动物体内功能性人类红细胞的重建。

26. 如权利要求 25 所述的方法，其中该核酸编码人类促红细胞生成素以及人类 IL-3。

27. 如权利要求 26 所述的方法，其中这些红细胞构成该非人类哺乳动物体内全部红细胞的约 3% 至约 5%。

28. 一种在非人类哺乳动物体内重建功能性人类 T 细胞以及人类 B 细胞的方法，包括：

a) 将人类造血干细胞 (HSC) 和编码一种或多种人类细胞因子的核酸引入一种免疫缺陷型非人类哺乳动物体内，其中当表达于该非人类哺乳动物体内时，这些人类细胞因子促进人类 HSC 分化成功能性人类 T 细胞以及人类 B 细胞；并且

b) 在其中在该非人类哺乳动物体内该核酸被表达并且这些人类 HSC 分化成多种功能性人类 T 细胞和人类 B 细胞的条件下维持该非人类哺乳动物，

由此在该非人类哺乳动物体内重建功能性人类 T 细胞和人类 B 细胞。

29. 如权利要求 28 所述的方法，其中在将 HSC 引入该非人类哺乳动物体内之后引入编码该一种或多种人类细胞因子的核酸。

30. 如权利要求 28 所述的方法，其中编码该一种或多种人类细胞因子的核酸以裸 DNA 的形式或在一种载体中引入。

31. 如权利要求 30 所述的方法，其中该载体是一种质粒、一种病毒载体、或它们的一种组合。

32. 如权利要求 31 所述的方法，其中该病毒载体是一种慢病毒或一种腺病毒载体。

33. 如权利要求 28 所述的方法，其中编码该一种或多种人类细胞因子的核酸以质粒 DNA 的形式使用流体动力学注射方法引入。

34. 如权利要求 28 所述的方法，其中该一种或多种人类细胞因子是粒细胞巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF) 以及白细胞介素 -4 (IL-4)。

35. 如权利要求 28 所述的方法，其中该非人类哺乳动物是一个小鼠。

36. 如权利要求 35 所述的方法，其中该小鼠是选自下组，该组由以下各项组成：一种携带重度联合免疫缺陷突变的非肥胖糖尿病小鼠 (NOD/scid 小鼠)、一种携带重度联合免疫缺陷突变并且缺少针对细胞因子受体 γ 链的一种基因的非肥胖糖尿病小鼠 (NOD/scid IL2R $\gamma^{-/-}$ 小鼠) 以及一种 Balb/c rag $^{-/-}$ γ c $^{-/-}$ 小鼠。

37. 如权利要求 28 所述的方法，其中该人类抗体是人类 IgG、人类 IgM 或它们的一种组合。

38. 如权利要求 28 所述的方法，进一步包括：

c) 用一种免疫原将该非人类哺乳动物免疫；并且

d) 在其中该非人类哺乳动物生产针对该免疫原的人类抗体的条件下维持该非人类动物。

39. 如权利要求 38 所述的方法，进一步包括从该非人类哺乳动物体内分离出生产该人类抗体的人类 B 细胞，由此生产出分离的人类 B 细胞。

40. 如权利要求 39 所述的方法，进一步包括将这些分离的人类 B 细胞与无限增殖的细胞接触，由此生成一种组合；并且在其中这些人类 B 细胞以及这些无限增殖的细胞融合从而形成一种杂交瘤的条件下维持该组合，该杂交瘤生产针对该免疫原的单克隆抗体。

41. 如权利要求 39 所述的方法,进一步包括对编码由这些人类 B 细胞表达的人类抗体的全部或一个功能性部分的序列进行克隆。

42. 一种在非人类哺乳动物体内生成针对一种免疫原的人类抗体的方法,包括:

a) 将人类造血干细胞 (HSC) 引入一种免疫缺陷型非人类哺乳动物体内并且将编码一种或多种人类细胞因子的核酸引入该非人类哺乳动物体内,其中这些人类细胞因子促进人类 HSC 分化成功能性人类 T 细胞以及人类 B 细胞;

b) 在其中在该非人类哺乳动物体内该核酸被表达并且这些人类 HSC 分化成多种功能性人类 T 细胞和人类 B 细胞的条件下维持该非人类哺乳动物;

c) 用该免疫原将该非人类哺乳动物免疫;并且

d) 在其中在该非人类哺乳动物体内这些人类 B 细胞产生针对该免疫原的人类抗体的条件下维持该非人类动物,

由此在该非人类哺乳动物体内产生针对该免疫原的人类抗体。

43. 如权利要求 42 所述的方法,其中在将 HSC 引入该非人类哺乳动物体内之后引入编码该一种或多种人类细胞因子的核酸。

44. 如权利要求 42 所述的方法,其中编码该一种或多种人类细胞因子的核酸以裸 DNA 的形式或在一种载体中引入。

45. 如权利要求 44 所述的方法,其中该载体是一种质粒、一种病毒载体、或它们的一种组合。

46. 如权利要求 45 所述的方法,其中该病毒载体是一种慢病毒或一种腺病毒载体。

47. 如权利要求 42 所述的方法,其中编码该一种或多种人类细胞因子的核酸以质粒 DNA 的形式使用流体动力学注射方法引入。

48. 如权利要求 42 所述的方法,其中该一种或多种人类细胞因子是粒细胞巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF) 以及白细胞介素 -4 (IL-4)。

49. 如权利要求 42 所述的方法,其中该非人类哺乳动物是一个小鼠。

50. 如权利要求 49 所述的方法,其中该小鼠是选自下组,该组由以下各项组成:一种携带重度联合免疫缺陷突变的非肥胖糖尿病小鼠 (NOD/scid 小鼠)、一种携带重度联合免疫缺陷突变并且缺少针对细胞因子受体 γ 链的一种基因的非肥胖糖尿病小鼠 (NOD/scid IL2R $\gamma^{-/-}$ 小鼠) 以及一种 Balb/c rag $^{-/-}$ $\gamma c^{-/-}$ 小鼠。

51. 如权利要求 42 所述的方法,其中该人类抗体是人类 IgG、人类 IgM 或它们的一种组合。

52. 如权利要求 42 所述的方法,进一步包括从该非人类哺乳动物体内分离出生产非人类的人类抗体的人类 B 细胞,由此生产出分离的人类 B 细胞。

53. 如权利要求 52 所述的方法,进一步包括将这些分离的人类 B 细胞与无限增殖的细胞接触,由此生成一种组合;并且在其中这些人类 B 细胞以及这些无限增殖的细胞融合从而形成一种杂交瘤的条件下维持该组合,该杂交瘤生产针对该免疫原的单克隆抗体。

54. 如权利要求 42 所述的方法,其中该免疫原是破伤风类毒素。

55. 如权利要求 52 所述的方法,进一步包括对编码由这些人类 B 细胞表达的人类抗体的全部或一个功能性部分的序列进行克隆。

56. 一种由权利要求 1 所述的方法制造的非人类哺乳动物。

57. 一种由权利要求 16 所述的方法制造的非人类哺乳动物。
58. 一种由权利要求 20 所述的方法制造的非人类哺乳动物。
59. 一种由权利要求 23 所述的方法制造的非人类哺乳动物。
60. 一种由权利要求 25 所述的方法制造的非人类哺乳动物。
61. 一种由权利要求 28 所述的方法制造的非人类哺乳动物。
62. 一种由权利要求 40 所述的方法制造的杂交瘤。
63. 一种由权利要求 62 所述的杂交瘤分泌的单克隆抗体。
64. 一种由权利要求 53 所述的方法制造的杂交瘤。
65. 一种由权利要求 64 所述的杂交瘤分泌的单克隆抗体。

制造人源化的非人类哺乳动物的方法

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求于 2009 年 6 月 29 日提交的美国临时申请号 61/221,438 的权益。通过引用将以上一项或多项申请的全部传授内容结合在此。

[0003] 发明背景

[0004] 对于以合成的和控制的方式在小型动物模型中研究针对病原体感染的人类免疫应答存在巨大的需求。过去二十年来,已经投入了巨大的努力用人血谱系细胞重新构建缺少 T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞的重症联合免疫缺陷 (scid) 型小鼠 (Shultz LD, Ishikawa F, Greiner DL (2007) Nat Rev Immunol 7:118-130)。然而,由于在受体小鼠体内移入较差、人类 T 细胞和 B 细胞快速消失、或造血细胞恶性肿瘤的快速发展,早期的尝试是不成功的。通过使用不仅缺乏 T 细胞和 B 细胞 (由于 scid 突变亦或重组活化基因 (Rag) 突变) 而且缺乏自然杀伤 (NK) 细胞 (由于缺失共同的 γ 链 (γc 或 $I12rg$)) 的受体小鼠实现了突破 (Hiramatsu H, et al. (2003) Blood 102:873-880; Traggiai E, et al. (2004) Science 304:104-107)。将人类造血干细胞 (HSC) 过继性转移到 $NOD-scid I12rg^{-/-}$ (NSG) 受体亦或 $BALB/c-Rag2^{-/-}I12rg^{-/-}$ 受体体内导致 HSC 在受体骨髓 (BM) 中稳定地、长期地移入并且在外周 (人源化小鼠或 humice) 体内产生全人血谱系细胞 (Hiramatsu H, et al. (2003) Blood 102:873-880; Traggiai E, et al. (2004) Science 304:104-107)。

[0005] 现存的人源化小鼠模型提供了用于研究人类病原体感染的一种重要工具 (Davis PH, Stanley SL, Jr. (2003) Cell Microbiol 5:849-860; Bente DA, et al. (2005) J Virol 79:13797-13799; Islas-Olmayer M, et al. (2004) J Virol 78:13891-13900; Guirado E, et al. (2006) Microbes Infect 8:1252-1259; Kneteman NM, et al. (2006) Hepatology 43:1346-1353; Jiang Q, et al. (2008) Blood 112:2858-2868) (尤其是感染人血谱系细胞的那些)。它们也开始允许在小型动物模型中研究针对病原体的人类免疫应答。然而,目前可用的模型远不是最佳的。例如,在不同的细胞谱系之间人类细胞重建的水平是显著不同的。B 细胞的重建是强劲的并且 T 细胞的重建是适当的,但是这些 B 细胞和 T 细胞都是无功能的。此外, NK 细胞和髓系细胞的重建通常是较差的或不可检出的。

[0006] 因此,对于人类免疫系统的改进的非人类模型以及制造它们的方法存在巨大的需求。

[0007] 发明概述

[0008] 在此所示的是,人类血细胞谱系被人类造血干细胞 (HSC) 的较差重建的主要是由于在该非人类哺乳动物体内缺乏对于这些细胞谱系的发育和维持所必需的适当的人类细胞因子。当将编码人 IL-15 和 Flt-3/Flk-2 配体的质粒 DNA 递送到人源化小鼠体内时 (例如通过流体动力学尾静脉注射),人类细胞因子的表达持续 2 至 3 周,并且诱导出高水平的 NK 细胞持续一个月以上。细胞因子诱导的 NK 细胞表达活化和抑制受体两者,在体外杀死靶细胞,并且在体内对病毒性感染强烈地应答。类似地,人类 GM-CSF 和 IL-4、巨噬细胞集落刺激因子、或促红细胞生成素以及 IL-3 的表达对应地导致树突状细胞、单核细胞 / 巨噬细胞、或红细胞的重建显著地增强 (参见 Chen, Q., et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 106:

21783-21788(2009)),通过引用将其结合在此。而且,GM-CSF 和 IL-4 增强了人类 T 细胞以及人类 B 细胞的重建。因此,使用人类细胞因子基因表达(例如通过流体动力学递送)连同人类 HSC 一起是用于改善人源化小鼠体内特异性人类血细胞谱系的重建的一种简单且有效的方法,这为在小型动物模型体内针对人类疾病以及它们的进展进行建模以及为针对人类免疫应答进行研究提供了一种重要的工具。

[0009] 因此,在此提供了在非人类哺乳动物体内重建功能性人类血细胞谱系的方法,由此制造出一种人源化的非人类哺乳动物。在具体实施方案中,制造出多种人源化小鼠(humice)。

[0010] 一方面,本发明是针对在一种非人类哺乳动物体内重建功能性人类血细胞谱系的方法,该方法包括将多种人类造血干细胞(HSC)以及编码一种或多种人类细胞因子的一种(一种或多种)核酸引入到一种免疫缺陷型非人类哺乳动物体内。在其中在该非人类哺乳动物体内该核酸被表达并且这些人类 HSC 分化成多种功能性人类血细胞谱系的条件下维持该非人类哺乳动物,由此在该非人类哺乳动物体内重建功能性人类血细胞谱系。

[0011] 在另一方面,本发明是针对在一种非人类哺乳动物体内重建功能性人类 NK 细胞的方法,该方法包括将人类造血干细胞(HSC)和编码一种或多种人类细胞因子的核酸引入到一种免疫缺陷型非人类哺乳动物体内,其中当在该非人类哺乳动物体内表达时这些人类细胞因子促进这些人类 HSC 分化成功能性人类 NK 细胞。在其中在该非人类哺乳动物体内该核酸被表达并且这些人类 HSC 分化成功能性人类 NK 细胞的条件下维持该非人类哺乳动物,由此增强了在该非人类哺乳动物体内这些人类 NK 细胞的重建。

[0012] 在又另一方面,本发明是针对在一种非人类哺乳动物体内重建功能性人类树突状细胞的方法,该方法包括将人类造血干细胞(HSC)和编码一种或多种人类细胞因子的核酸引入到一种免疫缺陷型非人类哺乳动物体内,其中当在该非人类哺乳动物体内表达时这些人类细胞因子促进这些人类 HSC 分化成功能性人类树突状细胞。在其中在该非人类哺乳动物体内该核酸被表达并且这些人类 HSC 分化成功能性人类树突状细胞的条件下维持该非人类哺乳动物,由此增强了在该非人类哺乳动物体内这些功能性人类树突状细胞的重建。

[0013] 在另一方面,本发明是针对在一种非人类哺乳动物体内重建功能性人类单核细胞/巨噬细胞的方法,该方法包括将人类 HSC 和编码一种或多种人类细胞因子的核酸引入到一种免疫缺陷型非人类哺乳动物体内,其中当在该非人类哺乳动物体内表达时这些人类细胞因子促进这些人类 HSC 分化成功能性人类单核细胞/巨噬细胞。在其中在该非人类哺乳动物体内该核酸被表达并且这些人类 HSC 分化成多种功能性人类单核细胞/巨噬细胞的条件下维持该非人类哺乳动物,由此在该非人类哺乳动物体内重建功能性人类单核细胞/巨噬细胞。

[0014] 在另一方面,本发明是针对在一种非人类哺乳动物体内重建功能性人类红细胞的方法,该方法包括将人类 HSC 和编码一种或多种人类细胞因子的核酸引入到一种免疫缺陷型非人类哺乳动物体内,其中当在该非人类哺乳动物体内表达时这些人类细胞因子促进这些人类 HSC 分化成功能性人类红细胞。在其中在该非人类哺乳动物体内该核酸被表达并且这些人类 HSC 分化成多种功能性人类红细胞的条件下维持该非人类哺乳动物,由此在该非人类哺乳动物体内重建功能性人类红细胞。

[0015] 在另一方面,本发明是针对在一种非人类哺乳动物体内重建功能性人类 T 细胞和

人类 B 细胞的方法,该方法包括将人类造血干细胞 (HSC) 和编码一种或多种人类细胞因子的核酸引入到一种免疫缺陷型非人类哺乳动物体内,其中当在该非人类哺乳动物体内表达时这些人类细胞因子促进这些人类 HSC 分化成功能性人类 T 细胞和人类 B 细胞。在其中在该非人类哺乳动物体内该核酸被表达并且这些人类 HSC 分化成多种功能性人类 T 细胞和人类 B 细胞的条件下维持该非人类哺乳动物,由此在该非人类哺乳动物体内重建功能性人类 T 细胞和人类 B 细胞。

[0016] 另一方面,本发明是针对在一种非人类哺乳动物体内生产出针对一种免疫原的人类抗体的方法,该方法包括将人类造血干细胞 (HSC) 和编码一种或多种人类细胞因子的核酸引入到一种免疫缺陷型非人类哺乳动物体内,其中这些人类细胞因子促进这类人类 HSC 分化成功能性人类 T 细胞以及功能性人类 B 细胞。在其中在该非人类哺乳动物体内该核酸被表达并且这些人类 HSC 分化成多种功能性人类 T 细胞和功能性人类 B 细胞的条件下维持该非人类哺乳动物。用该免疫原免疫该非人类哺乳动物并且在其中在该非人类哺乳动物体内这些人类 B 细胞生产出针对该免疫原的人类抗体的条件下进行维持,由此在该非人类哺乳动物体内生产出针对该免疫原的人类抗体。生产出针对该免疫原的抗体的 B 细胞可以被进一步分离并且用于制造出杂交瘤,这些杂交瘤分泌出针对该免疫原的单克隆抗体。

[0017] 分泌出单克隆抗体的杂交瘤以及由这些 B 细胞生产出的多种抗体(例如多克隆抗体、单克隆抗体)也被本发明包括。由在此提供的方法所制造的非人类哺乳动物也被本发明包括。

[0018] 在此说明的这些方法为在一种非人类哺乳动物体内(例如,一种人源化小鼠)重建功能性人类血细胞谱系(例如,髓样细胞、淋巴样细胞)以及为在多种非人类哺乳动物体内生产出人类抗体提供了一种简单并且有效的方法。

[0019] 附图简要说明

[0020] 图 1A-1B:在体外可以刺激来自 humice 的骨髓 (BM) 的人类 CD34⁺ 细胞分化成 NK 细胞。(图 1A) 来自 humice 的 BM 的单核细胞(左)和用 MACS 的抗 CD34 珠粒纯化之后(右)的 CD34 对 CD133 染色图的比较。显示的事项是在人类 CD45⁺ 细胞上预选通。这些数字表示选通区中细胞的百分比。显示来自四只小鼠之一的代表性数据。(图 1B) 在缺少(对照)或存在 IL-15 和 FL 下培养 7 天的人类 CD34⁺ 细胞的 NKp46 对 CD56 染色图。这些数字表示 CD56⁺ NKp46⁺ 细胞的百分比。

[0021] 图 2:流体动力学注射介导的基因递送在小鼠体内产生一个全身性人类细胞因子环境。将表达人类 IL-15 和 FL 的 pcDNA 载体混合在一起(各 50 μg)并且流体动力学地注入 humice 体内。在指示的时间点处(对于每个时间点 n = 3)通过 ELISA 来分析小鼠血清中人类 IL-15 和 FL 的水平。

[0022] 图 3A-3C:在体内 IL-15 和 FL 的表达刺激了人类 NK 细胞的发育。将空的 pcDNA 载体(对照)或表达 IL-15 和 / 或 FL 的 pcDNA 载体流体动力学地注入人源化的小鼠体内。九天之后,从指示的组织中制备细胞并且针对人类 CD45、CD3、以及 CD56 进行染色。(图 3A) 点状图显示了在 CD45⁺ 细胞上 CD3 对 CD56 染色图选通。这些数字表示选通区中 CD56⁺CD3⁺ 细胞的百分比。显示来自每组五只小鼠之一的代表性数据。用三种不同供体 HSC 来构建这些 humice。(图 3B) 在细胞因子基因递送之后 9 天在不同器官的 CD45⁺ 人类白细胞中 CD56⁺CD3⁺NK 细胞的频率(平均值 ± SEM) 的比较 (n = 5)。(图 3C) 血液中 CD45⁺ 人

类白细胞中 CD56⁺CD3⁻NK 细胞的随着时间的频率 (平均值 ± SEM) (n = 3)。

[0023] 图 4A-4E :人类 NK 细胞是功能性的。(图 4A) 在 humice 体内在腺病毒感染之后 NK 细胞介导肝损伤。细胞因子基因递送之后九天,将 PBS 或复制缺陷型腺病毒 (Ad) 流体动力学地注入这些 humice 体内。在感染之后 3 天收集这些 humice 的肝进行 H&E 染色 (每组 n = 3)。箭头指示坏死区域以及白细胞渗透。对照,无细胞因子基因递送的 humice ;IL-15/FL, 具有细胞因子基因递送的 humice。显示放大率。(图 4B) 血清中 ALT 水平的比较。在感染之后 5 天从腺病毒或 PBS 处理的 humice 体内收集血清,并且检测 ALT 活性 (平均值 ± SEM, 每组 n = 3)。IL-15/FL/Ad 和其他组之间 P < 0.05。(图 4C) 腺病毒感染的 humice 体内 IFN- γ 的血清水平。从腺病毒感染的 humice 体内收集血清并且通过 ELISA 测量 IFN- γ 。显示平均值 ± SEM (每组 n = 3)。P < 0.05。(图 4D) 不同 humice 的肝中 MNC 的数量。在腺病毒感染之后 5 天收获这些肝脏。对总肝脏 MNC 进行计数并且通过流式细胞术分析对人类 CD45⁺ 细胞的数量进行确定 (平均值 ± SEM, 每组 n = 3)。IL-15/FL/Ad 和其他组之间 P < 0.05。(图 4E) 将 CD56⁺ 人类 NK 细胞定位到肝脏中的损伤上。将肝组织包埋到石蜡中,切片,针对 CD56 染色,并且通过显微术进行分析。箭头指示损伤区。显示了来自三只小鼠之一的代表性图像。

[0024] 图 5A-5C :通过对应的人类细胞因子基因递送来诱导特异性人血谱系细胞。(图 5A) 树突状细胞的增强的重建。用空的 pcDNA 载体或表达指示的人类细胞因子基因的 pcDNA 载体来流体动力学注射 Humice。注射之后九天,从不同器官制备单细胞悬浮液,并且针对人类 CD45、CD11c、以及 CD209 进行染色。显示了在 CD45⁺ 人类细胞上 CD209 对 CD11c 染色图选通。显示了来自五只小鼠之一的代表性数据。(图 5B) 单核细胞 / 巨噬细胞的增强的重建。进行与 (图 5A) 中相同的实验,除了注射编码 M-CSF 的 pcDNA,并且将这些细胞针对人类 CD45 和 CD14 进行染色之外。显示了在 CD45⁺ 人类细胞上 CD14 对 CD45⁺ 染色图选通。显示了来自三只小鼠之一的代表性数据。(图 5C) 红细胞的增强的重建。进行与图 5A 中相同的实验,除了注射编码 EPO 以及 IL-3 的 pcDNA、并且在注射之后 7 天和 30 天针对人类 CD235ab 将血液染色之外。显示了全血细胞的 CD235ab 对 DAPI 染色图。显示了来自三只小鼠之一的代表性数据。这些数字表示选通区中细胞的百分比。

[0025] 图 6A-6B :在人源化小鼠体内人类 NK 细胞的重建。(图 6A) 在 HSC 移入之后十二周,通过流式细胞术对外周血的单核细胞中人类细胞谱系的重建进行分析。点状图显示在活的有核细胞上人类 CD45 对小鼠 CD45 选通的染色图,或在 CD45⁺ 人类细胞上 CD3 对 CD19, 或 CD14 对 CD56 选通的染色图。(图 6B) 在一种人源化小鼠的血液、骨髓、脾、肺、以及肝中人类 CD45⁺ 细胞的 CD14 对 CD56 染色图。这些数字表示选通区中这些细胞的百分比。显示来自六只小鼠之一的代表性数据。

[0026] 图 7A-7B :当用 IL-2 信号肽序列表达时循环中 IL-15 水平增加。(图 7A) IL-15 表达载体的示意图。将 IL-15 基因 (具有其内源性信号序列 (SP) 或 IL-2SP) 克隆到具有一个 CMV 启动子的 pcDNA 载体中。(图 7B) IL-15 的血清水平的比较。将空 pcDNA 载体 (对照)、编码 IL-15 的 pcDNA 载体、以及具有一个 IL-2 信号序列的编码 IL-15 的 pcDNA 载体流体动力学地注入 NSG 小鼠体内。注射之后七天,收集血清并且通过 ELISA 测定 IL-15 水平。

[0027] 图 8A-8G :在 IL-15 和 FL 表达之后人类细胞的数量增加。(图 8A-8G) 将空 pcDNA 载体 (对照) 或表达 IL-15 和 FL 两者的 pcDNA 载体流体动力学地注入人源化的小鼠体内。

九天之后,从这些指定的组织中制备细胞,并且针对人类 CD45 加 CD3、CD56、CD14、CD11c、CD1c、ILT7、CD303、以及 CD19 进行染色。通过用总细胞数量乘以特定细胞类型的频率来计算不同器官中人类 CD45⁺ 白细胞、CD56⁺NK 细胞、CD11c⁺CD1c⁺ 树突状细胞、ILT7⁺CD303⁺ 浆细胞样树突状细胞、CD14⁺ 单核细胞 / 巨噬细胞、CD3⁺T 细胞、以及 CD19⁺B 细胞的绝对数量。显示平均值 \pm SEM (n = 3)。骨髓 (BM) 中细胞数量是来自两个股骨。

[0028] 图 9 :在 IL-15 和 FL 处理的 humice 体内人类 NK 细胞的细胞表面表型。在递送 IL-15 和 FL 基因之后九天,从指示的器官中制备细胞,并且针对人类 CD45、CD56 加 NKG2D、NKG2A、CD7、CD69、CD94、NKp46、KIR、或 CD16 进行染色。显示了在 CD45⁺ 人类细胞上 CD56 对 NKG2D、NKG2A、CD7、CD69、CD94、NKp46、KIR、或 CD16 选通的染色图。这些数字表示选通区中细胞的百分比。

[0029] 图 10A-10C :来自 IL-15 和 FL 处理的 humice 的人类 NK 细胞的细胞毒性和刺激作用。(图 10A) NK 细胞是细胞溶解性的。在细胞因子基因递送之后九天,从 BM 和脾中纯化出人类 NK 细胞,在不同效应物对靶物质 (E : T) 比率下与 K562 细胞混合,并且培养 4 小时。通过测量上清液中乳酸脱氢酶活性来确定 NK 细胞的细胞溶解活性。(图 10B) 在体外聚 (I:C) 刺激之后,NK 细胞生产出 IFN- γ 。将纯化的 NK 细胞 (5×10^5) 单独地,或在聚 (I:C) ($50 \mu\text{g/ml}$) 存在下,或在聚 (I:C) 以及体外分化的人类 DC (5×10^5) 存在下进行培养 (参见材料与方法)。24 小时之后通过 ELISA 分析上清液的人类 IFN- γ 。(图 10C) 在体内聚 (I:C) 刺激之后,NK 细胞生产出 IFN- γ 。用聚 (I:C) (200pg/小鼠) 静脉注射 humice。注射之后二十四小时,收集血清并且通过 ELISA 检测人类 IFN- γ (n = 4)。P < 0.05。

[0030] 图 11 :体外人类 CD34⁺ 细胞的分化。从 humice 的 BM 中纯化出 CD34⁺ 人类细胞 (左) 并且在 GM-CSF 加 IL-4、或 M-CSF 存在下培养 7 天,或 EPO 加 IL-3 培养 20 天。然后针对 CD45 加 CD209 和 CD11c、或 CD14 和 CD33、或 CD235ab 对这些细胞进行测定。显示了针对 CD45⁺ 细胞的 CD209 对 CD11c 以及 CD14 对 CD33 染色图。通过直方图 (粗线) 显示了 CD235ab 表达。在无 EPO 和 IL-3 下培养的纯 CD34⁺ 细胞用作对照 (细线)。

[0031] 图 12A-12C :在人源化小鼠体内在破伤风类毒素疫苗免疫之后人类细胞增殖。(图 12A) 免疫的实验流程 :在第 0 天,用编码人类 GM-CSF 和 IL-4 的质粒或空 pcDNA 载体 (载体) 流体力学地注射具有类似人类白细胞重建 (50-80%) 的 12 周龄的人源化小鼠。七天之后,用破伤风类毒素 (TT) 将这些小鼠免疫三次。通过腹腔注射 21. f. 破伤风类毒素疫苗进行初次免疫,紧接着以两个三周间隔进行另外两次增强。第二次增强之后两周对这些小鼠进行分析。(图 12B) 来自 GM-CSF 和 IL-4 处理小鼠的脾显著地增大。(图 12C) 不同 humice 的脾中单核细胞 (MNC) 的数量。在免疫之后收获这些脾。对总脾 MNC 进行计数并且通过流式细胞术分析对人类 CD45⁺ 细胞的数量进行确定 (平均值 \pm SEM, 每组 n = 3)。

[0032] 图 13 :在 GM-CSF 和 IL-4 处理的、TT 免疫的 humice 体内人类 B 细胞的细胞表面表型。从脾中制备这些细胞,并且针对人类 CD45、小鼠 CD45、CD19 加 IgM、IgD、CD10、CD268、CD5、CD21、CD27、IgG、或 CD20 进行染色。显示了在 CD45⁺ 人类细胞上 CD19 对 IgM、IgD、CD10、CD268、CD5、CD21、CD27、IgG、或 CD20 选通的染色图。

[0033] 图 14 :在 GM-CSF 和 IL-4 处理的、TT 免疫的 humice 体内人类 T 细胞的细胞表面表型。从脾中制备这些细胞,并且针对人类 CD45、小鼠 CD45、CD19 加 IgM、IgD、CD10、CD268、CD5、CD21、CD27、IgG、或 CD20 进行染色。显示了在 CD45⁺ 人类细胞上 CD3 对 T 细胞活化标

志物 :HLA-DR 和 CD40L 选通染色图。

[0034] 图 15A-15C :在 TT 免疫的 humice 体内人类 IgG、IgM 和 TT 特异性人类 IgG 的血清水平。从 TT 免疫的 humice 体内收集血清并且通过 ELISA 针对人类 IgG、IgM 以及 TT 特异性人类 IgG 进行测量。(图 15A) 血清中人类总 IgG。与载体处理的小鼠相比较, GM-CSF⁺IL-4 处理的小鼠产生显著地更高的人类总 IgG 水平。(图 15B) 血清中人类总 IgM。GM-CSF⁺IL-4 处理的小鼠也具有总人类 IgM 的更高的血清水平。(图 15C) 血清中人类 TT 特异性 IgG。

[0035] 图 16A-16B :在细胞因子处理的小鼠体内 TT 特异性人类 T 细胞应答。在第三次免疫之后两周,收获脾并且通过流式细胞术确定人类 T 细胞的百分比。对于 ELISPOT 测定而言,将相同数量 (5x 10⁵) 的来自不同样品的人类 T 细胞接种到涂覆有抗人类 IFN- γ 或抗人类 IL-4 抗体的孔中并且在以下三种条件下培养 24 小时 :仅培养基 (对照)、在 PMA 存在下或在 TT 特异性肽的存在下。将 ELISPOT 显色。(图 16A) 具有来自免疫小鼠脾细胞的代表性人类 IFN- γ ELISPOT 孔。(图 16B) 具有来自免疫小鼠脾细胞的代表性人类 IL-4ELISPOT 孔。显示的数据是来自二个独立实验之一。

[0036] 图 17 :将编码人类 IL-15、FL、GM-CSF、IL-4 以及 M-CSF (各 50 μ g) 的 DNA 质粒的混合物溶于 PBS 中并且注入 12 周龄人源化小鼠体内 (n = 2)。七天之后,收集血清并且通过 ELISA 对这些人类细胞因子进行分析。

[0037] 发明详细说明

[0038] 近来,在移入人类胎儿胸腺、肝、以及自体人类 CD34⁺细胞的 NOD-scid 小鼠 (BLT 小鼠) 体内已经报道了人类树突状细胞 (DC) 和单核细胞 / 巨噬细胞的显著重建 (Wege AK, et al. (2008) Curr Top Microbiol Immunol 324 :149-165)。在 BLT 小鼠体内仍然不存在人类 NK 细胞。因为 NK 细胞和髓样细胞在先天免疫应答中起重要作用,开发具有这些细胞类型足够水平重建的人类非人类哺乳动物,例如人源化小鼠,对于了解人源化小鼠模型在传染性疾病研究和涉及血谱系细胞的其他研究 (例如,血液学疾病研究,例如贫血、免疫缺陷、癌) 中的全部潜力是关键性的。

[0039] 全血细胞谱系是从常规人造血干细胞 (HSC) 衍生的。在它们的分化和维持期间细胞因子起到重要作用。例如, NK 细胞的发育和存活需要 IL-15 (Mrozek E, et al. (1996) Blood 87 :2632-2640), 树突状细胞 (DC) 发育需要 GM-CSF 和 IL-4 (Rosenzweig M, et al. (1996) Blood 87 :535-544), 单核细胞 / 巨噬细胞发育和维持需要巨噬细胞集落刺激因子 (M-CSF) (Stec M, et al. (2007) J Leukoc Biol 82 :594-602), 并且红细胞 (EPO) 发育需要促红细胞生成素 (EPO) 和 IL-3 (Giarratana MC, et al. (2005) Nat Biotechnol 23 :69-74)。然而,由于人类和小鼠之间进化趋异,这些细胞因子是种特异性的 (即小鼠细胞因子在人类细胞中不起作用)。例如,小鼠 IL-15 对人类 NK 细胞以及前体没有作用 (Eisenman J, et al. (2002) Cytokine 20 :121-129), 这导致在 humice 体内人类 NK 细胞较差的重建 (Huntington ND, et al. (2009) J Exp Med 206 :25-34 ; Kalberer CP, et al. (2003) Blood 102 :127-135)。类似地,已经报道小鼠 GM-CSF、IL-4 (Metcalf D (1986) Blood 67 :257-267 ; Mosmann TR, et al. (1987) J Immunol 138 :1813-1816)、M-CSF (Fixe P, Praloran V (1997) Eur Cytokine Netw 8 :125-136) 以及 IL-3 (Stevenson LM, Jones DG (1994) J Comp Pathol 111 :99-106) 在人类细胞上都不起作用。

[0040] 研究了在 humice 体内 NK 细胞和髓样细胞的较差重建和功能是否是由于缺少特异

性人类细胞因子。在此所述的是用于确定重建小鼠体内人类细胞因子的表达是否刺激特定的人血谱系细胞的分化、存活、以及功能的实验。

[0041] 这种研究导致开发出一种简单并且有效的方法从而使用人源化小鼠在作为举例的人源化非人类哺乳动物体内改善特异性人血谱系细胞的重建。当递送编码人类 IL-15 和 Flt-3/Flk-2 配体 (FL) 的核酸时,在 humice 循环中检测出特异性人类细胞因子持续 2 至 3 周。其结果是,在不同器官中观察到显著提高数量的人类 NK 细胞持续一个月以上。在体外和体内细胞因子诱导的 NK 细胞是全功能的。使用同样策略,在 humice 体内还大大增强了人类树突状细胞、单核细胞 / 巨噬细胞、以及红细胞的重建水平。在此所述的研究证明在人源化小鼠的现有模型中 NK 细胞和髓样细胞的较差重建是由于缺少它们的分化和维持所需要的适当的人类细胞因子,并且证明人类细胞因子基因的递送(例如流体动力学地递送)是用于克服这些细胞谱系的较差重建的一种简单并且有效的方法。

[0042] 因此,本发明一方面针对在一种非人类哺乳动物体内重建功能性人类血谱系细胞(例如,一种单一人血谱系细胞(例如, NK 细胞);多重人血谱系细胞(例如, NK 细胞、树突状细胞、T 细胞、B 细胞等),并且在一些实施方案中,全人血谱系细胞)的一种方法。在这个实施方案中,将人类造血干细胞(HSC)和编码一种或多种人类细胞因子的核酸引入到该非人类哺乳动物体内。在其中在该非人类哺乳动物体内该核酸被表达并且用人类 HSC 来重建该非人类哺乳动物的条件下维持该非人类哺乳动物,由此在该非人类哺乳动物体内重建人类造血干细胞(HSC)。

[0043] 如在此使用的, HSC(例如人类 HSC)是自身更新的干细胞,当移入受体体内时,这些干细胞能够“再生”或“重建”移植受体(例如,非人类哺乳动物;免疫缺陷型非人类哺乳动物)的造血系统并且在受体体内维持(例如长期地)造血细胞生成。HSC 是产生(分化成)多种血细胞类型的多能性干细胞,这些细胞类型包括髓样细胞(例如,单核细胞和巨噬细胞、嗜中性细胞、嗜碱性细胞、嗜酸性细胞、红细胞、巨核细胞 / 血小板、树突状细胞)以及淋巴样谱系(例如, T- 细胞、B- 细胞、NK- 细胞)。如在此所述的方法中所示,重建的人类 HSC 可以在该非人类哺乳动物体内分化成人类 NK 细胞、人类单核细胞、人类巨噬细胞、人类树突状细胞、人类红细胞、人类 B 细胞、人类 T 细胞或它们的组合。

[0044] HSC 表达细胞标记物 CD34, 并且通常被称为“CD34+”。如本领域普通技术人员所理解的, HSC 还可以表达其他细胞标记物,例如 CD133 和 / 或 CD90(“CD133+”, “CD90+”)。在一些实例中, HSC 特征在于不被表达的标记物,例如 CD38。因此,在本发明的一个实施方案中,在此所述的方法中使用的人类 HSC 是 CD34+、CD90+、CD133+、CD34+CD38-、CD34+CD90+、CD34+CD133+CD38-、CD133+CD38-、CD133+CD90+CD38-、CD34+CD133+CD90+CD38-、或它们的任何组合。在一个具体实施方案中,这些 HSC 是 CD34(“CD34+”)和 CD133+(“CD133+”)两者,在此也称为“双阳性”或“DP”细胞或“DPC”。在另一个实施方案中,这些 HSC 是 CD34+CD133+, 并且可以进一步包括 CD38- 和 / 或 CD90+。

[0045] HSC 被发现于骨髓中,例如在供体(例如,脊椎动物,例如哺乳动物,包括人类、灵长类、猪、小鼠等)的股骨、髌骨、肋骨、胸骨、以及其他骨骼中。用于临床和科学用途的 HSC 的其他来源包括脐带血、胎盘、胎儿肝脏、动员的外周血、非动员的(或未动员的)外周血、胎儿肝脏、胎儿脾脏、胚胎干细胞、以及主动脉 - 性腺 - 中肾 (AGM)、或它们的一种组合。

[0046] 如本领域普通技术人员所应当理解的,动员的外周血是指富含 HSC(例如, CD34+

细胞)的外周血。施用多种试剂(例如化疗和/或G-CSF)将干细胞从骨髓动员到外周循环中。例如,施用粒细胞集落刺激因子(G-CSF)持续至少或大致5天将CD34+细胞动员到外周血中。观察到循环的CD34+细胞富集30倍,峰值出现在开始施用G-CSF之后第5天。在不动员外周血的情况下,循环的CD34+细胞的数量非常低,估计在全部单核血细胞的0.01%至0.05%之间。

[0047] 可以从单个或多个供体体内得到用于这些方法的人类HSC。此外,在此说明的方法中使用的HSC可以是新鲜分离的HSC、深冷保存的HSCs、或它们的一种组合。

[0048] 如本领域已知的,可以使用本领域已知的多种方法从这些来源中得到HSC。例如,可以在用细胞因子(例如,粒细胞集落刺激因子(G-CSF),该因子诱导细胞从骨髓小室中释放)预处理供体之后通过使用针和注射器从骨髓中取出(例如髌骨、股骨等中),或从血液中取出而直接地得到HSC。

[0049] 在将HSC引入该非人类哺乳动物体内之前,能够以得到的(例如,未展开)或操作的(例如展开)形式将用于本发明方法中的HSC直接引入该非人类哺乳动物体内。在一个实施方案中,在将HSC引入该非人类哺乳动物体内之前该HSC被扩展。如本领域普通技术人员所应当理解的,有多种方法可以用于扩展HSC(参见例如,Zhang, Y., et al., *Tissue Engineering*, 12(8):2161-2170(2006); Zhang CC, et al., *Blood*, 111(7):3415-3423(2008))。在一个具体实施方案中,可以通过在生长因子(例如血管生成素样5(Angpt5)生长因子、IGF结合蛋白2(IGFBP2)、干细胞因子(SCF)、成纤维细胞生长因子(FGF)、血小板生成素(TPO)、或它们的一种组合)的存在下将HSC与间充质干细胞(MSC)共同培养以产生一种细胞培养物而扩展HSC的一个群体。在其中生产HSC的一个扩展的群体的条件下(参见,例如Maroun, K., et al., *ISSCR*, 7th Annual Meeting, Abstract No. 1401(July 8-11, 2009) Attorney Docket No. 4471.1000-001, 于2010年5月28日提交的作为_____公开的PCT申请PCT/US2010/036664,其全部内容通过引用结合在此)维持该细胞培养物。

[0050] 在此所述的方法中,还将编码一种或多种人类细胞因子的一种(一种或多种)核酸(例如DNA, RNA)引入该非人类哺乳动物体内从而诱导这些人类HSC分化成功能性人类细胞。如本领域已知的,这些细胞因子是刺激或抑制免疫细胞分化、增殖或功能的蛋白。本领域还已知的是多种人类细胞因子的核酸序列(参见,例如www.ncbi.nlm.nih.gov)。用于得到编码一种或多种细胞因子的核酸的方法是本领域常规方法并且包括从多种来源中(例如血清)分离该核酸(例如克隆)、重组地生产该核酸或从商业来源得到该核酸。

[0051] 存在可以用于本发明方法中的多种人类细胞因子。这类人类细胞因子的实例包括白细胞介素-12(IL-12)、白细胞介素-15(IL-15)、Ems-相关酪氨酸激酶3配体(F1t3L)、F1t3L/F1k2配体(FL)、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、白细胞介素-4(IL-4)、白细胞介素-3(IL-3)、巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF)、促红细胞生成素(EPO)以及它们的一种组合。用于在此所述方法中的其他适当的细胞因子的实例列于表中。引入该非人类哺乳动物体内的细胞因子的类型和细胞因子的数量将取决于当在该非人类哺乳动物体内发生人类HSC分化时哪种人类血细胞谱系将被重建。例如,如实例1中所示,当将编码人类IL-15和F1t-3/F1k-2配体的核酸引入人源化小鼠体内时(例如通过流体动力学尾静脉注射),人类细胞因子的表达持续2至3周并且诱导人类NK细胞水平升高持续一个月以上。细胞

因子诱导的 NK 细胞表达活化和抑制受体两者,在体外杀死靶细胞,并且在体内对病毒性感染强烈地应答。类似地,人类 GM-CSF 和 IL-4 的表达导致人类树突状细胞的重建显著增强;巨噬细胞集落刺激因子的表达导致人类单核细胞/巨噬细胞的重建显著增强;并且促红细胞生成素以及 IL-3 的表达导致人类红细胞的重建显著增强(参见 Chen, Q., et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 106 :21783-21788 (2009), 通过引用将其结合在此)。如在实例 2 中所示, GM-CSF 和 IL-4 的表达增强了功能性人类 T 细胞和人类 B 细胞的重建。

[0052] 在一些方面,将至少(包括)一种细胞因子、至少 2 种细胞因子、至少 3 种细胞因子、至少 4 种细胞因子、至少 5 种细胞因子、至少 6 种细胞因子、至少 7 种细胞因子、至少 8 种细胞因子、至少 9 种细胞因子、至少 10 种细胞因子、至少 11 种细胞因子、至少 12 种细胞因子、至少 13 种细胞因子、至少 14 种细胞因子、至少 15 种细胞因子、至少 16 种细胞因子、至少 17 种细胞因子、至少 18 种细胞因子、至少 19 种细胞因子、或至少 20 种细胞因子引入该非人类哺乳动物体内。在其他方面,将仅(组成为,基本上组成为)一种细胞因子、2 种细胞因子、3 种细胞因子、4 种细胞因子、5 种细胞因子、6 种细胞因子、7 种细胞因子、8 种细胞因子、9 种细胞因子、10 种细胞因子、11 种细胞因子、12 种细胞因子、13 种细胞因子、14 种细胞因子、15 种细胞因子、16 种细胞因子、17 种细胞因子、18 种细胞因子、19 种细胞因子、或 20 种细胞因子引入到该非人类哺乳动物体内。可以将编码各人类细胞因子的核酸同时地或依次地引入(例如,在其中多于一种细胞因子将被表达于该非人类哺乳动物体内的情况下,可以将编码各细胞因子的各核酸在它自己的单一的质粒或载体中引入,或可以在多个质粒或载体中引入,可替代地,可以将有待引入的编码这些细胞因子的所有核酸在一个单一质粒或载体中引入)。

[0053] 在本发明的方法中,将 HSC 和编码一种或多种细胞因子的核酸引入到一种非人类哺乳动物体内。如在此使用的,术语“哺乳动物”以及“哺乳动物”指的是包括单孔类动物、有袋类动物以及胎盘类动物的任何脊椎动物,这类动物哺乳它们的幼体并且或者产下活的幼体(真哺乳亚纲或有胎盘哺乳动物)亦或产蛋(后兽亚纲的动物或无胎盘哺乳动物)。可以用于在此说明的方法中的哺乳动物物种的实例包括非人类灵长类(例如,猴类、猩猩)、啮齿类(例如,大鼠、小鼠、豚鼠)、犬类、猫类、以及反刍动物(例如,牛、猪、马)。在一个实施方案中,该非人类哺乳动物是一个小鼠。在此所述的方法中使用的非人类哺乳动物可以是成年的、新生的(例如< 48 小时龄;幼小动物)、或在子宫中。

[0054] 在具体实施方案中,该非人类哺乳动物是一种免疫缺陷型非人类哺乳动物,即在其免疫系统中具有一种或多种缺陷的一种非人类哺乳动物(例如, NSG 或 NOD scid γ (NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtml Wjl/SzJ) 小鼠),并且,结果是当将人类 HDC 引入时允许重建人类血细胞谱系。例如,这种非人类哺乳动物缺少其自身的 T 细胞、B 细胞、NK 细胞或它们的一种组合。在具体实施方案中,该非人类哺乳动物是一种免疫缺陷型小鼠,例如一种携带重度联合免疫缺陷突变的非肥胖糖尿病小鼠(NOD/scid 小鼠)、一种携带重度联合免疫缺陷突变并且缺少针对细胞因子受体 γ 链的一种基因的非肥胖糖尿病小鼠(NOD/scid IL2R γ $^{-/-}$ 小鼠);以及一种 Balb/c rag $^{-/-}$ γ c $^{-/-}$ 小鼠。

[0055] 免疫缺陷型小鼠的其他具体实例包括但不限于重度联合免疫缺陷症(scid)小鼠、非肥胖糖尿病(NOD)-scid 小鼠、IL2rg $^{-/-}$ 小鼠(例如, NOD/LySz-scid IL2rg $^{-/-}$ 小鼠、NOD/Shi-scid IL2rg $^{-/-}$ 小鼠(NOG 小鼠)、BALB/c- Rag $^{-/-}$ IL2rg $^{-/-}$ 小鼠、H2^d-Rag $^{-/-}$ IL2rg $^{-/-}$ 小

鼠)、NOD/Rag^{-/-}IL2rg^{-/-}小鼠。

[0056] 在一些实施方案中,在引入人类 HSC 和编码该一种或多种人类细胞因子的核酸(例如用于进一步增强人类 HSC 的重建)之前,对该非人类哺乳动物进行治疗或处理。例如,可以对该非人类哺乳动物进行处理以进一步增强人类 HSC 的移入和/或重建。在一个实施方案中,在引入这些 HSC 以及编码该一种或多种细胞因子的核酸之前,对该非人类哺乳动物进行照射。在另一个实施方案中,在引入这些 HSC 以及编码该一种或多种细胞因子的核酸之前,将一种或多种化疗剂施用到该非人类哺乳动物体内。

[0057] 如本领域普通技术人员还应当理解的,有多种方法来将 HSC 和编码这些细胞因子的核酸引入到一种非人类哺乳动物体内。这类方法的实例包括但不限于皮内、肌内、腹膜内、眼内、股内、心室内、颅内、鞘内、静脉内、心内、肝内、骨髓内、皮下、局部、口服以及鼻内途径的给药。其他适当的引入方法还可以包括子宫内注射、流体动力学基因送递、基因治疗、可再充电的或生物可降解的设备、颗粒加速设备(“基因枪”)以及缓释聚合物设备。

[0058] 可以使用任何一种这类给药途径或类似途径将 HSC 引入非人类动物体内。在一个具体实施方案中,将 HSC 心内地注入该非人类哺乳动物体内。

[0059] 还可以使用任何一种这类给药途径将编码该一种或多种细胞因子的核酸引入,只要该一种或多种核酸表达于该非人类哺乳动物体内即可。例如,编码该一种或多种细胞因子的核酸可以以裸核酸(裸 DNA)形式、在质粒(例如,pcDNA3.1(+))中或在病毒载体中(例如,腺病毒、腺相关病毒、慢病毒、逆转录病毒等)引入。在一个具体实施方案中,使用流体动力学注射将编码该一种或多种细胞因子的核酸引入到一种质粒中(例如进入一种非人类哺乳动物的尾静脉中)。

[0060] 可以将这些 HSC 和编码该一种或多种细胞因子的核酸同时地或依次地引入,并且如本领域普通技术人员所应当理解的,这将取决于多种因素,例如所使用的非人类哺乳动物的类型、所表达的细胞因子以及当在该非人类哺乳动物体内发生人类 HSC 分化时哪种人血谱系细胞将被表达和/或增强。在一个具体实施方案中,将这些 HSC 引入新生幼小动物体内(例如约 48 小时龄),并且在约 1 个月、约 2 个月、约 3 个月、约 4 个月、约 5 个月、约 6 个月、约 7 个月、约 8 个月、约 9 个月、约 10 个月、约 11 个月、约 12 个月之后,将编码这些细胞因子的核酸引入。

[0061] 一旦将这些 HSC 和编码该一种或多种细胞因子的核酸引入,在其中该核酸被表达并且用 HSC 重建该非人类动物的条件下维持该非人类哺乳动物。在其下维持本发明的非人类动物的这类条件包括满足如本领域普通技术人员已知的该哺乳动物的基本需要(例如,食物、水、光)。

[0062] 在此所述的方法可以进一步包括确定该核酸是否被表达,该人类 HSC 是否存在和/或该人类 HSC 是否已经分化成一种或多种人血谱系细胞。在此提供了用于确定该核酸是否被表达和/或该非人类动物是否被 HSC 重建的方法,并且这对于本领域普通技术人员而言是熟知的。例如,使用对人类 HSC 的表面细胞标志物具有特异性的抗体的流式细胞术分析可以用于检测在该非人类哺乳动物体内人类 HSC 的存在。此外,可以从该非人类哺乳动物体内收集血清并且针对人类细胞因子的存在进行测定。还可以使用多种测定法对分化的 HSC(例如,NK 细胞、树突状细胞、T 细胞、B 细胞、单核细胞/巨噬细胞、红细胞)的功能进行评估。在此还说明了这类测定法并且这是本领域普通技术人员所熟知的。例如,如在此

说明的,在一个体外测定中(乳酸脱氢酶测定)细胞因子诱导的人类NK细胞杀死靶细胞并且对体内病毒性感染强烈地应答。

[0063] 能够以多种方式使用通过递送编码一种或多种人类细胞因子基因的核酸而在非人类哺乳动物体内(例如人源化小鼠)重建一种或多种人血细胞谱系的能力。

[0064] 例如,一方面,本发明是针对在一种非人类哺乳动物体内重建功能性人类NK细胞的方法,该方法包括将人类HSC和编码一种或多种人类细胞因子的核酸引入到一种免疫缺陷型非人类哺乳动物体内,其中当在该非人类哺乳动物体内表达时这些人类细胞因子促进这些人类HSC分化成功能性人类NK细胞。在其中在该非人类哺乳动物体内该核酸被表达并且这些人类HSC分化成功能性人类NK细胞的条件下维持该非人类哺乳动物,由此在该非人类哺乳动物体内重建了功能性人类NK细胞。在一个具体实施方案中,编码该一种或多种细胞因子的核酸编码人类IL-15和人类F1t-3/F1k-2配体。

[0065] 在另一个实施方案中,该非人类哺乳动物的外周血中约3%至约25%的白细胞是人类NK细胞(例如,功能性NK细胞)。在其他实施方案中,该非人类哺乳动物的外周血中约3%、约4%、约5%、约6%、约7%、约8%、约9%、约10%、约11%、约12%、约13%、约14%、约15%、约16%、约17%、约18%、约19%、约20%、约21%、约22%、约23%、约24%、或约25%的白细胞是人类NK细胞。

[0066] 在另外的其他实施方案中,将人类NK细胞(例如功能性NK细胞)的表达维持(并且在一些情况下,增强,与例如一个适当的对照相比较)约1天至约30天,并且在具体实施方案中,将人类NK细胞的表达维持约1天、约2天、约3天、约4天、约5天、约6天、约7天、约8天、约9天、约10天、约11天、约12天、约13天、约14天、约15天、约16天、约17天、约18天、约19天、约20天、约21天、约22天、约23天、约24天、约25天、约26天、约27天、约28天、约29天、约30天、或约31天。

[0067] 在一些实施方案中,在该非人类哺乳动物体内这些人类NK细胞表达一种或多种,并且在一些情况下,表达全部的这些在人体中发现的正常的(野生型)NK细胞的细胞表面标志物。这样的表达表明这些人类NK细胞在该非人类哺乳动物体内确实是功能性的。例如在一个实施方案中,这些人类NK细胞是CD56+NK细胞。在其他实施方案中,这些人类NK细胞表达NKG2D、NKG2A、CD94、KIR、NKp46、CD7、CD69、Cd16,或它们的组合。

[0068] 在另外的其他实施方案中,在该非人类哺乳动物体内这些人类NK细胞能够杀死靶细胞并且当适当刺激时能够表达IFN- γ (例如,一种Toll-样受体3激动剂聚(I:C)、人类树突状细胞、腺病毒)。

[0069] 在另一方面,本发明是针对在一种非人类哺乳动物体内重建功能性人类树突状细胞的方法,该方法包括将人类HSC和编码一种或多种人类细胞因子的核酸引入到一种免疫缺陷型非人类哺乳动物体内,其中当在该非人类哺乳动物体内表达时这些人类细胞因子促进这些人类HSC分化成功能性人类树突状细胞。在其中在该非人类哺乳动物体内该核酸被表达并且这些人类HSC分化成功能性人类树突状细胞的条件下维持该非人类哺乳动物,由此在该非人类哺乳动物体内重建了这些人类树突状细胞。在一个具体实施方案中,编码该一种或多种细胞因子的核酸编码人类GM-CSF和人类IL-4。在另一个实施方案中,编码该一种或多种细胞因子的核酸编码人类GM-CSF、人类IL-4以及人类F1t-3/F1k-2配体。

[0070] 在其他实施方案中,在该非人类哺乳动物体内这些人类树突状细胞表达一种或

多种,并且在一些情况下,表达全部的这些在人体中发现的正常的(野生型)树突状细胞的细胞表面标志物。在一个实施方案中,在该非人类哺乳动物体内的人类树突状细胞是 CD11c+CD209 髓样树突状细胞(例如,表达于血液、脾、骨髓、肺、肝中)、ILT7+CD303+ 浆细胞样树突状细胞或它们的一种组合。

[0071] 在另一方面,本发明是针对在一种非人类哺乳动物体内重建功能性人类单核细胞/巨噬细胞的方法,该方法包括将人类 HSC 和编码一种或多种人类细胞因子的核酸引入到一种免疫缺陷型非人类哺乳动物体内,其中当在该非人类哺乳动物体内表达时这些人类细胞因子促进这些人类 HSC 分化成功能性人类单核细胞/巨噬细胞。在其中在该非人类哺乳动物体内该核酸被表达并且这些人类 HSC 分化成多种功能性人类单核细胞/巨噬细胞的条件下维持该非人类哺乳动物,由此在该非人类哺乳动物体内重建功能性人类单核细胞/巨噬细胞。在一个具体实施方案中,编码该一种或多种细胞因子的核酸编码人类巨噬细胞集落刺激因子。

[0072] 在其他实施方案中,在该非人类哺乳动物体内这些人类单核细胞/巨噬细胞表达一种或多种,并且在一些情况下,表达全部的这些在人体中发现的正常的(野生型)单核细胞/巨噬细胞的细胞表面标志物。在一个实施方案中,这些人类单核细胞/巨噬细胞表达 CD14+。

[0073] 在另一方面,本发明是针对在一种非人类哺乳动物体内重建功能性人类红细胞的方法,该方法包括将人类 HSC 和编码一种或多种人类细胞因子的核酸引入到一种免疫缺陷型非人类哺乳动物体内,其中当在该非人类哺乳动物体内表达时这些人类细胞因子促进这些人类 HSC 分化成功能性人类红细胞。在其中在该非人类哺乳动物体内该核酸被表达并且这些人类 HSC 分化成多种功能性人类红细胞的条件下维持该非人类哺乳动物,由此在该非人类哺乳动物体内重建功能性人类红细胞。在一个具体实施方案中,编码该一种或多种细胞因子的核酸编码人类促红细胞生成素以及 IL-3。

[0074] 在其他实施方案中,在该非人类哺乳动物体内这些人类红细胞表达一种或多种,并且在一些情况下,表达全部的这些在人体中发现的正常的(野生型)红细胞的细胞表面标志物。在一个实施方案中,这些人类红细胞表达 CD235ab+。

[0075] 在另外的其他实施方案中,在该非人类哺乳动物体内的人类红细胞构成该非人类哺乳动物体内全部红细胞的约 1%至约 10%,或约 3%至约 5%。在具体实施方案中,在该非人类哺乳动物体内的人类红细胞构成该非人类哺乳动物体内全部红细胞的约 1%、约 2%、约 3%、约 4%、约 5%、约 6%、约 7%、约 8%、约 9%或约 10%。

[0076] 在一个具体方面,本发明是针对在一种非人类哺乳动物体内重建功能性人类 T 细胞和人类 B 细胞的方法,该方法包括将人类 HSC 和编码一种或多种人类细胞因子的核酸引入到一种免疫缺陷型非人类哺乳动物体内,其中当在该非人类哺乳动物体内表达时这些人类细胞因子促进这些人类 HSC 分化成功能性人类 T 细胞和人类 B 细胞。在其中在该非人类哺乳动物体内该核酸被表达并且这些人类 HSC 分化成多种功能性人类 T 细胞和人类 B 细胞的条件下维持该非人类哺乳动物,由此在该非人类哺乳动物体内重建功能性人类 T 细胞和人类 B 细胞。在一个具体实施方案中,编码该一种或多种细胞因子的核酸编码 GM-CSF 和 IL-4。该方法可以进一步包括用一种免疫原免疫该非人类哺乳动物,并且在其中该非人类哺乳动物生产针对该免疫原的人类抗体的条件下维持该非人类动物。

[0077] 在又一个具体方面,本发明是针对在一种非人类哺乳动物体内产生针对一种免疫原的人类抗体的一种方法。在这种方法中,将人类造血干细胞(HSC)和编码一种或多种人类细胞因子的核酸引入到一种非人类哺乳动物体内,其中这些人类细胞因子促进人类HSC分化成功能性人类T细胞和人类B细胞。在其中在该非人类哺乳动物体内该核酸被表达并且这些HSC分化成多种功能性人类T细胞和人类B细胞的条件下维持该非人类哺乳动物。用该免疫原免疫该非人类哺乳动物并且在其中在该非人类哺乳动物体内这些人类B细胞生产出针对该免疫原的人类抗体的条件下进行维持,由此在该非人类哺乳动物体内生产出针对该免疫原的人类抗体。在一个具体实施方案中,编码该一种或多种细胞因子的核酸编码GM-CSF和IL-4。

[0078] 如本领域已知的,“免疫原”是能够诱导免疫应答并且促进抗体生产的一种物质。用于这些方法中的多种免疫原是本领域已知的。例如,该免疫原可以是下面各项的全部或一个免疫原性部分:来自人类或其他物种的一种蛋白、一种细胞表面蛋白(例如正常的或疾病细胞的,例如肿瘤细胞)、一种生物体(例如,一种生物体的免疫原性部分包括生物体的衣壳、荚膜、细胞壁、鞭毛、纤毛、以及毒素)、一种病毒蛋白、一种细菌蛋白、一种毒素、一种多糖、一种脂蛋白、一种修饰的蛋白(例如,乙酰化的、甲基化的、糖基化的)、一种核酸(例如,DNA、RNA当与一种肽、蛋白或多糖结合时)、一种化学表位,等等。

[0079] 这种方法可以进一步包括从该非人类哺乳动物体内分离生产该人类抗体的人类B细胞。从一种非人类哺乳动物体内分离B细胞的方法是本领域已知的。例如,使用流式细胞计量术的细胞分选或基于对B细胞特异性蛋白具有特异性的抗体的磁性纯化(例如,参见Current Protocols in Immunology, Copyright © 2010 by John Wiley and Sons, Inc. ed. John E. Coligan et al.)。

[0080] 如本领域已知的,“抗体”或“免疫球蛋白”是B细胞产生的免疫系统的蛋白组分,它在血液中循环识别免疫原例如细菌和病毒,并且将它们中和。在暴露于一种免疫原之后,这些抗体在血液中继续循环,针对未来暴露于该抗原提供保护。使用在此所述的方法可以得到由人类B细胞生产的任何类型的抗体。这些单克隆抗体可以是多克隆或单克隆抗体。这类抗体的实例是本领域熟知的并且包括IgG(例如,IgG1、IgG2、IgG3、IgG4)、IgM、IgD以及IgA。

[0081] 这些方法可以进一步包括将分离的人类B细胞与无限增殖的细胞接触,由此生成一种组合;并且在其中这些人类B细胞以及这些无限增殖的细胞融合从而形成一种杂交瘤的条件下维持该组合,该杂交瘤生产针对该免疫原的单克隆抗体。

[0082] 如本领域已知的,在免疫之后适当时间,例如当抗体滴度最高时,可以通过标准技术例如由Kohler and Milstein, Nature 256:495-497(1975)最初说明的杂交瘤技术、人类B细胞杂交瘤技术(Kozbor et al., Immunol. Today 4:72(1983))、EBV杂交瘤技术(Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96(1985))或三源杂交瘤技术从该受试者体内得到生产抗体的细胞并且用于制备单克隆抗体。用于生产杂交瘤的技术是熟知的(通常参见Current Protocols in Immunology, Coligan et al., (eds.) John Wiley & Sons, Inc., New York, NY(1994))。简言之,将一种无限增殖细胞系(典型地一种骨髓瘤)融合到来自用上述免疫原免疫的哺乳动物的淋巴细胞上(典型地脾细胞),并且对得到的杂交瘤细胞的培养物上清液进行筛选以鉴别生产一种单克隆抗

体的杂交瘤,该单克隆抗体结合本发明的一种多肽。

[0083] 用于融合淋巴细胞和无限增殖化细胞系的多种熟知的科学计划中任何一种可以用于产生针对一种免疫原的单克隆抗体的目的(参见,例如, *Current Protocols in Immunology*, supra; Galfre et al., *Nature*, 266 :55052(1977); R. H. Kenneth, in *Monoclonal Antibodies :A New Dimension In Biological Analyses*, Plenum Publishing Corp., New York, New York(1980); and Lerner, *Yale J. Biol. Med.* 54 :387-402(1981))。

[0084] 而且,普通技术工作者应当理解的是存在这类方法的多种变体以及可以用于得到由人类B细胞产生的抗体的其他方法。例如,可以使用已知技术对编码由这些人类B细胞表达的人类抗体的全部或一个功能性部分的序列进行克隆。典型地,该方法涉及分离抗原特异性B细胞(例如用荧光染色标记的抗原染色,通过流式细胞仪分选)并且使用简并引物和单细胞聚合酶链式反应(PCR)扩增抗体基因的VDJ部分。将抗体基因的克隆的和测序的VDJ部分与恒定区基因片段结合从而在细胞系例如一种CHO细胞系中生产出抗体(例如,参见, Hahn, S., et al., *Cell Mol. Life Sci.* (2000), 57(1) :96-105)。

[0085] 用于生产和/或分离由该非人类哺乳动物生产的人类抗体的方法的另一个实例包括病毒地无限增殖这些人类B细胞。在这种方法中,可以使用例如爱泼斯坦-巴尔病毒(EBV)或修饰的EBV来无限增殖B细胞(例如,参见 Lanzavecchia, A., *Curr. opin. Biotechnol.* (2007) 18(6) :523-528)。

[0086] 如本领域普通技术人员所应当理解的,除了细胞因子之外,其他蛋白(例如人类蛋白、人类分泌性蛋白),例如生长因子、类固醇、和/或小分子的表达可以用在用于改善血谱系细胞之外人类细胞的重建和/或功能的方法中。例如,可以将一种或多种人类细胞因子的激动剂引入该非人类哺乳动物体内以增强HSC的重建。

[0087] 如本领域普通技术人员所应当理解的,“功能性(或“生物活性”或“成熟的”)人类NK细胞”,“功能性人类树突状细胞”、“功能性人类单核细胞/巨噬细胞”、“功能性人类红细胞”、“功能性人类T细胞”以及“功能性人类B细胞”都是指以下事实,即分化的细胞(无论人类NK细胞、人类树突状细胞、人类单核细胞/巨噬细胞、人类红细胞、人类T细胞还是人类B细胞)表达一种或多种,并且在一些情况下,表达全部的这些在人体内发现的对应的正常(野生型)细胞的细胞表面标志物,并且其结果是,在该非人类哺乳动物体内与它们在人体中的情况类似地起作用。

[0088] 用于确定人血谱系细胞在非人类哺乳动物体内功能的测定法对于本领域普通技术人员而言是已知的并且在此进行说明。例如,可以使用已知NK细胞毒性测定法来确定在非人类哺乳动物体内这些NK细胞的功能。

[0089] 在本发明的某些方面中,在该非人类哺乳动物体内增强了人类血细胞谱系和/或一种特定人类细胞谱系(例如NK细胞、树突状细胞、单核细胞/巨噬细胞、血细胞、T细胞、B细胞)的重建。增强的重建是指例如与适当的对照相比较,细胞类型的增强表达(例如,该一种或多种人类血谱系细胞的数量增加;表达的细胞类型在时间方面增加(例如>30天))。这类对照是本领域普通技术人员所清楚的。适当的对照的一个实例是已经将人类HSC而没有将编码一种或多种细胞因子的核酸引入其中的一种非人类哺乳动物。

[0090] 本发明的其他方面包括多种组合物。一方面,本发明包括通过在此所述方法制造的非人类动物。

[0091] 在其他方面,本发明包括通过在此所述的方法制造的杂交瘤(分离的杂交瘤)以及通过这些杂交瘤生产的单克隆抗体(分离的单克隆抗体)。

[0092] 如在此使用的,“分离的”(例如“分离的B细胞”、“分离的淋巴瘤”、“分离的单克隆抗体”)是指相对于它天然存在于其中的复杂的(例如细胞的)环境或器官、身体、组织、血液、或培养基而言,基本上分离的。在一些实例中,该分离的物质将形成组合物(例如,包含其他物质的粗提取物)、缓冲液系统、培养系统或试剂混合物的一部分。在其他情况下,可以将该物质纯化到基本上均质性的。一个分离的B细胞群可以构成存在的全部细胞的至少约50%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、或至少约99%(以总细胞数量计)。在一个实施方案中,本发明是针对通过在此所述方法生产的分离的、或基本上分离的(或纯化的、基本上纯化的)B细胞、淋巴瘤和/或单克隆抗体。

[0093] 因此,如在此所示,在人源化小鼠体内观察到的较差的人体先天和适应性应答的主要原因是由于特定人类血谱系细胞的低水平重建,和/或特定人血细胞谱系的较差的功能性成熟,是由于在重建小鼠体内缺乏适当的人类细胞因子表达。在此所述的是一种有效的并且多用途方法用来在重建的非人类哺乳动物体内(例如小鼠)表达各种人类细胞因子并且在得到的非人类哺乳动物体内显著地提高人血谱系细胞的重建。

[0094] 为了在该非人类哺乳动物体内表达人类细胞因子,使用流体动力学注射将编码这些人类细胞因子的DNA载体引入到该哺乳动物体内(例如,在7秒钟内10%体重)。在这个实施方案中,所注射的DNA中的一些被肝细胞吸收,导致在小鼠体内表达人类细胞因子。通过以这种方式引入编码人类细胞因子的核酸,改善了特定人细胞亚群的发育,这导致人类细胞和免疫应答的数量增加。

[0095] 具体地说,将人类细胞因子克隆到一种载体中。单独地将工程化的人类白细胞介素15(IL-15)和Fms相关酪氨酸激酶3配体(F1t3L)基因克隆到pcDNA3.1(+)载体中。

[0096] 使用pcDNA3.1(+)质粒作为载体用于体内基因递送。对于体内NK细胞诱导而言,构建了pcDNA-IL2/IL15和pcDNA-F1t3L质粒。简言之,用人类IL-2信号肽序列替换人类IL-15的信号肽序列,因为IL-15的信号肽是非常长的(48aa)并且它限制了IL-15的分泌。使用早作用细胞因子f1t3配体(FL)来增加应答IL-15的NK细胞前体的频率。将这两种重组体基因序列插入pcDNA3.1(+)载体中。

[0097] 通过基于流体动力学的基因转移技术通过将大量溶液通过尾静脉快速注射将质粒施用于小鼠体内。简言之,在7秒钟内用1.8ml盐水中50 μ g每质粒静脉注射8至12周龄人源化小鼠。

[0098] 在注射之后第7天通过尾静脉对这些小鼠放血从而主要地分析血液中人类免疫细胞的重建。然后在第9天和第16天将一些小鼠处死用来分析肝、肺、脾、骨髓以及淋巴结中人类细胞重建的动力学。在不同时间点收集血清从而通过ELISA来分析循环的血液中人类细胞因子水平。

[0099] 在流体动力学注射之后,在血清中检测出显著水平的IL-15和F1t3L持续2-3周。相应地,在血液、脾、骨髓、肺以及肝中CD56⁺CD3⁻人类自然杀伤(NK)细胞的重建显著地增加到比得上在人体器官中所观察到的水平。在所有这些器官中CD45⁺人类细胞的绝对数字也增加。

[0100] 在人源化小鼠体内通过这种方法产生的NK细胞具有正常NK细胞表现并且在体内

和体外两者中在响应于聚 I:C 和 LPS 刺激而生产干扰素 γ (IFN- γ) 方面具有功能性。从人源化小鼠体内纯化的 NK 细胞在体外显示抗 K562 靶细胞的细胞毒性活性。此外,在体内 NK 细胞应答于病毒感染。使用类似方法,通过表达 GM-CSF 和 IL-4 增强了树突状细胞重建,通过表达 MCSF 增强了巨噬细胞和单核细胞重建,并且通过表达 EPO 和 IL3 增强了人类红细胞重建。

[0101] 流体动力学注射裸 DNA 导致在血清中检测出人类细胞因子持续 2-3 周。如本领域普通技术人员所清楚的,还可以通过病毒性载体(例如,腺病毒介导的基因表达、慢病毒介导的基因表达)来表达人类基因,这可以导致在小鼠体内高水平并且长时间的人类基因表达。

[0102] 由于对小鼠细胞因子环境的较差的反应性在移植有人类造血干细胞的 NOD/SCID IL2R $\gamma^{-/-}$ 小鼠体内一些种类的人类免疫细胞的重建是非常低的。对于免疫细胞发育和成熟至关重要的多种细胞因子显示出种特异性活性,例如 IL-15 对于 NK 细胞、GM-CSF/IL-4 对于 DC、M-CSF 对于巨噬细胞等。在此所述的是一种通过施用裸细胞因子表达质粒的基于流体动力学的体内转染方法,这导致显著的高水平的全身性外源性人类细胞因子表达从而促进在人源化小鼠体内人类免疫细胞的发育。

[0103] 与用来自人类 HSC 的血细胞谱系用于重建非人类哺乳动物的现有方法相比较,这些方法和组合物提供了多种优点。例如,仅需将编码细胞因子的核酸引入一次从而实现希望的结果;编码细胞因子的核酸的使用更易于大规模制备,长期存储更加稳定并且更便于基因工程化;基于流体动力学的注射可以导致 3 周时间的全身性人类细胞因子表达,并且有可能的是使用腺病毒和/或慢病毒载体来引入该细胞因子该表达可能持续更长时间;可以将多种基因构建体结合在一起(参见图 17);并且这些方法提供了一种简单并且有效的方法来在人源化小鼠体内重建 HSC(例如,髓样细胞)。

[0104] 例证

[0105] 实例 1

[0106] 在人源化小鼠(Humice)体内人类细胞因子的表达显著地提高了特异性人类血细胞谱系的重建。

[0107] 材料与方法

[0108] HSC 分离、人源化小鼠的构建、以及流体动力学基因递送。人类脐带血是从新加坡脐带血库得到的。通过聚蔗糖-泛影葡胺密度梯度分离脐带血单核细胞(MNC)。根据制造商的科学实验方案(Stem Cell Technologies)用 RosetteSep[®]系统来纯化 CD34⁺ 细胞。CD34⁺ 细胞的纯度是 > 95%。为了扩展 HSC,在确定的因子的存在下在无血清培养基中将纯化的 CD34⁺ 细胞培养 11 至 14 天(Zhang CC, Kaba M, Iizuka S, Huynh H, Lodish HF(2008) Blood 111:3415-3423)。使用未扩展的和扩展的 HSC 来产生人源化的小鼠。

[0109] NSG 小鼠购于杰克逊实验室并且在南洋理工大学和新加坡国立大学的动物实验室中在无特异性病原体的条件下维持。为了重建小鼠,用 γ 辐射源使用 100cGy 照射新生的幼小动物(小于 48 小时龄)并且心内注射 CD34⁺CD133⁺ 细胞(1×10^5 细胞/受体)。将人类细胞因子基因分别克隆到 pcDNA3.1(+) 载体(Invitrogen)中。通过 Maxi-prep 试剂盒(Qiagen)来纯化质粒 DNA。为了流体动力学基因递送,使用 27-号针在 7 秒钟内用总计 1.8ml 盐水中 50 μ g 每质粒注射 12 周龄 humice。使用人类样品和小鼠的所有研究都是在

符合新加坡国立大学和南洋理工大学的机构指导方针下进行的。

[0110] 单细胞制剂、抗体、以及流式细胞仪。单细胞悬浮液是通过标准方法从脾和骨髓 (BM) 制备的。为了从 humice 肝中分离 MNC, 将该肝挤压通过一个 200 号不锈钢筛目, 并且通过在 $50 \times g$ 下离心 5 分钟将碎片去除。收集包含 MNC 的上清液, 在 PBS 中洗涤, 并且再悬浮于 RPMI 培养基 1640 中 40% Percoll (Sigma) 中。将细胞悬浮液柔和地覆盖到 70% Percoll 上并且在 $750 \times g$ 下离心 20 分钟。从间期收集这些 MNC, 在 PBS 中洗涤两次。为了从肺中分离 MNC, 将肺切碎, 悬浮于包含 0.05% 胶原酶 (Sigma) 和 0.01% DNase I (Sigma) 的培养基中, 并且在 37°C 下孵化 20 分钟。使这些肺样品通过一个 200 号不锈钢筛目, 并且如上所述用 Percoll 离心来分离这些 MNC。

[0111] 使用下面这些抗体: CD3 (SK7)、CD34 (581)、CD19 (HIB19)、NKG2D (1D11)、NKp46 (9E2)、CD94 (DX22)、CD16 (3G8)、CD56 (B159)、HLA-DR (L243)、CD14 (M5E2)、CD11c (B-ly6)、CD209 (DCN46)、CD7 (M-T701)、CD45 (2D1)、CD69 (L78)、CD33 (WM53) (来自 Becton-Dickson); KIR2DL2/L3 (DX27)、ILT7 (17G10.2) 以及 CD235ab (HIR2) (来自 BioLegend); CD303 (AC144) (来自 Miltenyi Biotec); CD159a (NKG2A; Z199) (来自 Beckman Coulter); 以及 CD133 (EMK08) 和小鼠 mouse CD45.1 (A20) (来自 eBioscience)。在冰上用包含 0.2% BSA 和 0.05% 叠氮化钠的 $100\text{-}\mu\text{l}$ PBS 中适当抗体将细胞染色持续 30 分钟。在 LSRII 流式细胞仪上使用 FACSDiva 软件 (Becton, Dickinson and Co.) 进行流式细胞计量术。每个样品收集一万至 1,000,000 个事件并且使用 Flowjo 软件进行分析。

[0112] 体外人类 CD34+ 细胞的分化。从 12 周龄 humice 体内分离出 BM MNC。通过 MACS[®] 微珠粒 (Miltenyi Biotec) 来富集 CD34+ 细胞。在 37°C 以及 5% CO_2 下将纯化的细胞培养在 RPMI 1640, 10% FCS 中。为了 NK 细胞、DC、单核细胞 / 巨噬细胞、以及红细胞的分化, 对应地使用 50ng/ml SCF, 50ng/ml FL 和 50ng/ml IL-15; 50ng/ml SCF, 20ng/ml GM-CSF 和 50ng/ml IL-4; 50ng/ml SCF 和 30ng/ml M-CSF; 以及 100ng/ml SCF, 5ng/ml IL-3 和 3U/ml EPO。所有这些细胞因子都购于安迪生物 (R&D Systems)。

[0113] NK 细胞细胞毒性测定以及刺激。在基因递送之后九天, 使用干细胞 PE 选择试剂盒 (干细胞技术公司 (Stem Cell Technologies)) 通过阳性选择从脾和 BM 中纯化出 $\text{CD}56^+\text{NK}$ 细胞。将细胞洗涤并且再悬浮于包含 2% FCS 的 IMDM 中, 并且在一个 4 小时乳酸脱氢酶释放测定中 (CytoTox 96; Promega) 确定针对 NK 敏感性靶物质 K562 (ATCC) 的细胞毒性。

[0114] 为了体外刺激, 在 37°C 以及 5% CO_2 下在 RPMI 1640, 10% FCS, 2-mM L-谷氨酰胺、1-mM 丙酮酸钠、青霉素、以及链霉素 (具有或不具有人类 DC) 中将纯化的 NK 细胞培养 24 小时。如所说明的从脐带血 $\text{CD}34^+$ 细胞中分化出人类 DC (Rosenzweig M, Canque B, Gluckman JC (1996) Blood 87:535-544)。接着, 将 50pg/ml 聚 (I:C) (Sigma) 添加到培养物中用来体外刺激 NK 细胞。为了体内刺激, 用 200 μg 聚 (I:C) 静脉注射 humice。用 ELISA 试剂盒 (安迪生物 (R&D Systems)) 测量血清中或培养物上清液中 $\text{IFN-}\gamma$ 水平。

[0115] 腺病毒感染、ALT、以及组织学。表达绿色荧光蛋白的复制缺陷型、E1 和 E3 缺失的、类型 5 腺-X 病毒 (AdGFP) 购于 Clontech。将 AdGFP 在 HEK293 中进行繁殖并且通过 CsCl 不连续密度梯度离心进行纯化。通过流体动力学注射通过尾静脉用 4×10^9 pfu AdGFP 病毒攻击 Humice。腺病毒感染之后五天, 收集血清并且使用 cobas c 111 分析仪 (罗氏诊断有限公司 (Roche Diagnostics Ltd.)) 对 ALT 活性进行分析。

[0116] 为了组织学分析,去除肝、包埋与石蜡中并且制备 5- μ m 厚切片。用 H&E 将这些石蜡切片染色并且通过光学显微镜进行分析。为了双色免疫荧光染色,在阻断非特异性染色之后,用最佳稀释的 PE 结合的抗人类 CD56 抗体 (MEM-188 ;Biolegend) 将去石蜡的切片染色。用 MIRAX MIDI 荧光显微镜 (蔡司 (Zeiss)) 对这些切片进行分析。

[0117] 统计分析数据表示为平均值和平均值的标准差。通过 t 检验对组间差异进行分析。P- 值 < 0.05 被认为是统计显著的。所有计算都是使用 Origin 8.0 软件包完成的。

[0118] 结果

[0119] 体外通过人类细胞因子刺激 NK 细胞分化。为了构建人源化小鼠,将从人类脐带血分离的 CD34⁺HSC 过继性转移到亚致命照射的 NSG 幼小动物体内。重建之后十二周,用对于人类 CD45 和小鼠 CD45 具有特异性的抗体将来自外周血的单核细胞 (MNC) 染色 (图 6A-6B)。在血液中平均重建比率是约 50% [重建比率 = % CD45⁺ 人类细胞 / (% CD45⁺ 人类细胞 + % CD45⁺ 小鼠细胞)]。在这些 CD45⁺ 人类白细胞中,CD19⁺B 细胞的水平范围从 40% 至 85% 并且 CD3⁺T 细胞的水平范围从 10% 至 50%。虽然在血液、BM、脾、肺、以及肝中检测出 NK 细胞,它们的频率显著地低于在对应的人类组织或小鼠组织中的情况 (参见图 6A-6B)。

[0120] 为了确定 humice 体内较差的 NK 细胞重建背后的原因,我们对来自 humice BM 的人类 CD34⁺ 细胞是否可以被人类 IL-15 和 FL 刺激从而体外分化成 NK 细胞进行了测试。FL 刺激了多种造血细胞谱系的分化,包括可以应答 IL-15 的 CD34⁺NK 祖细胞 (Yu H 等人 (1998) Blood 92 :3647-3657)。预期 FL 和 IL-15 的组合有助于 CD34⁺ 前体朝向 NK 细胞分化。因此,在存在 FL 和 IL-15 下将从 humice BM 中纯化的人类 CD34⁺ 细胞 (> 80%) (图 1A) 培养 7 天,并且针对 NK 细胞标志物 CD56 和 NKp46 的表达进行分析。在细胞因子存在下,约 11% 的细胞对于 CD56 和 NKp46 两者是阳性的,而在缺少细胞因子下,非常少的细胞是阳性的 (图 1B)。这些结果表明如果提供适当的细胞因子环境,humice 的 BM 中 CD34⁺ 人类细胞能够分化成 NK 细胞。

[0121] 通过流体动力学注射质粒 DNA 在小鼠体内表达人类细胞因子。在 IL-15 和 FL 存在下人类 NK 细胞体外发育的发现表明这些人类细胞因子还可以在 humice 体内刺激 NK 细胞发育。将人类细胞因子引入小鼠体内的一种方式每日注射重组体蛋白。因为这种方式较麻烦并且耗资,我们通过流体动力学递送编码细胞因子的 DNA 质粒在小鼠体内表达人类细胞因子。人类 IL-15 具有非常长的信号肽序列 (45aa 残基),这被认为导致 IL-15 较差的分泌 (Meazza R 等人 (1997) Eur J Immunol 27 :1049-1054)。为了增加 IL-15 分泌水平,我们构建了一种表达 IL-15 的载体,其中 IL-15 信号肽被人类 IL-2 的信号肽替换 (图 7A-7B)。这种替换将 IL-15 的血清水平增加了约 100 倍 (图 7B)。通过单次流体动力学注射 50 μ g 编码 IL-15 的质粒,注射之后 1 天在血清中检测出高水平的 IL-15 并且维持一个显著的水平持续 14 天 (图 2)。类似地,单次注射编码 FL 的质粒导致血清中表达 FL 持续 21 天。因此,流体动力学递送细胞因子基因是用于将人类细胞因子引入小鼠体内的一种简单并且有效的方法。

[0122] 在 IL-15 和 FL 基因递送之后人类 NK 细胞的重建增强。为了确定 IL-15 和 FL 表达对 NK 细胞发育的作用,在基因递送之后 9 天,通过流式细胞仪针对不同器官中 NK 细胞重建对 humice 进行分析。注射空 pcDNA 载体或编码 FL 的载体不显著地影响 CD56⁺NK 细胞的频率 (图 3A)。然而,IL-15 的表达显著地增加了血液、脾、BM、肺、以及肝中 CD56⁺NK 细胞的

频率 (图 3A 以及 3B)。当 IL-15 和 FL 两者都表达于 humice 体内时, NK 细胞频率增加是甚至更显著的, 达到在正常人外周血 (5% -21% 白细胞) (Maurice RG, O' Gorman ADD (2008) Handbook of Human Immunology (CRC Press, Boca Raton)) 以及正常小鼠组织 (Zhang J, et al. (2005) Cell Mol Immunol 2 :271-280) 中观察到的水平。相应于 NK 细胞频率增加, 在脾和 BM 中 NK 细胞绝对数显著增加 (图 3B)。而且, 在基因递送之后保持血液中 CD56⁺NK 细胞的高频率持续至少 30 天 (图 3C)。此外, 细胞因子诱导的 NK 细胞表达了已知对于 NK 细胞功能重要的多种细胞表面受体 (图 9), 包括活化受体 NKG2D, 抑制受体 NKG2A、CD94、以及 KIR, 天然细胞毒性触发受体 NKp46, NK 细胞标志物 CD7, 早期活化标志物 CD69, 以及 FC 受体 CD16。这些结果表明细胞因子诱导的 NK 细胞显示正常 NK 细胞的特征性表面表型。

[0123] 除了刺激 NK 细胞发育之外, 已知 FL 和 IL-15 两者在其他造血细胞谱系上起作用 (Diener KR, Moldenhauer LM, Lyons AB, Brown MP, Hayball JD (2008) Exp Hematol 36 : 51-60 ; Dong J, McPherson CM, Stambrook PJ (2002) Cancer Biol Ther 1 :486-489 ; Blom B, Ho S, Antonenko S, Liu YJ (2000) J Exp Med 192 :1785-1796 ; Armitage RJ, Macduff BM, Eisenman J, Paxton R, Grabstein KH (1995) J Immunol 154 :483-490)。因此, 通过流式细胞仪对来自 humice 的脾、BM、肺、以及肝的细胞进行计数并且进行分析。IL-15 和 FL 的表达还在脾和 BM 中诱导 CD14⁺ 单核细胞 / 巨噬细胞、CD11c⁺CD1c⁺ 髓样树突状细胞、ILT7⁺CD303⁺ 浆细胞样树突状细胞、以及 CD19⁺B 细胞显著增加 (参见图 8A-8G)。这些结果证明在人源化小鼠体内人类 IL-15 和 FL 的表达显著地改善了 NK 细胞以及其他髓样细胞和淋巴细胞的重建。

[0124] 细胞因子诱导的 NK 细胞是功能性的。我们对细胞因子诱导的人类 NK 细胞是否具有功能性进行了研究 (即能够杀死靶细胞并且在适当刺激之后能够表达 IFN- γ)。CD56⁺NK 细胞是从 IL-15⁻ 和 FL 处理的小鼠的 BM 和脾中纯化的。当与 MHC 类型 I 缺陷型靶细胞 K562 混合时, 我们观察到随着添加的 NK 细胞的数量增加, 靶细胞溶解水平增加 (图 10A)。当用 Toll 样受体 3 激动剂聚 (I:C) (它已知活化 NK 细胞来产生促炎细胞因子 (Schmidt KN 等人 (2004) J Immunol 172 :138-143)) 来刺激纯化的细胞时, 在培养物上清液中检测出 IFN- γ (图 10B)。在人类 DC 存在下, IFN- γ 分泌水平进一步增加。当将聚 (I:C) 注入人源化小鼠体内时, 与未注射的 humice 相比较, 在注射有编码细胞因子 DNA 的 humice 的血清中检测出显著增加水平的 IFN- γ (图 10C)。

[0125] 我们还用腺病毒攻击了 humice, 这它们被认为引起 NK 细胞依赖性肝损伤 (Chen Q, Wei H, Sun R, Zhang J, Tian Z (2008) Hepatology 47 :648-658)。细胞因子基因递送之后九天, 将复制缺陷型腺病毒静脉注入 humice 体内。三天后, 收集肝并且用 H&E 来染色。在 IL-15⁻ 和 FL⁻ 处理的腺病毒感染的 humice 的肝中观察到大量白细胞渗透以及大面积的坏死。然而, 用腺病毒感染的未处理的 humice 仅显示轻度的细胞渗透以及损伤 (图 4A)。相应地, 在 IL-15⁻ 和 FL⁻ 处理的腺病毒感染的 humice 体内血清丙氨酸氨基转移酶 (ALT) 水平显著地升高 (图 4B)。这种增加与血清 IFN- γ 水平大致四倍增加 (图 4C) 以及肝中浸润的人类白细胞大致五倍增加 (图 4D) 相关联。肝切片的免疫组织化学分析证实了这些损伤中 CD56⁺NK 细胞的位置 (图 4E)。这些结果强烈表明这些细胞因子诱导的人类 NK 细胞具有功能性。

[0126] 改善其他人类血细胞谱系的重建。我们对细胞因子基因递送是否可以用作一般性

方法用来在 humice 体内改善特定人类血细胞谱系的重建进行了测试。在培育期间,通过 GM-CSF 和 IL-4 刺激从 humice 的 BM 中纯化的人类 CD34⁺ 细胞从而分化成 CD11c⁺CD209⁺DC, 通过 M-CSF 刺激从而分化成 CD14⁺ 单核细胞 / 巨噬细胞, 并且通过 EPO 和 IL-3 刺激从而分化成 CD235ab⁺ 红细胞 (图 11)。在体内, 将表达 GM-CSF、IL-4、和 FL 的 DNA 载体流体动力学递送到 humice 体内导致血液、脾、BM、肺、以及肝中 CD11c⁺CD209⁺DC 的频率显著增加 (图 5A)。类似地, M-CSF 表达导致在淋巴器官和非淋巴器官两者中 CD14⁺ 单核细胞 / 巨噬细胞的重建增加 (图 5B)。EPO 和 IL-3 的表达导致血液中出现 CD235ab⁺ 人类红细胞 (图 5C), 达到全部红细胞的 3% 至 5%。因此, 通过流体动力学注射 DNA 质粒来表达细胞因子基因是一种常用的并且有效的方法用来在 humice 体内改善特定人类血细胞谱系的重建。

[0127] 讨论

[0128] 使用 NSG 或 BALB/c-Rag2^{-/-} Il2rg^{-/-} 小鼠作为受体在人源化小鼠模型体内 NK 细胞和髓样细胞的重建通常是较差的。在 BLT 小鼠体内, 虽然 DC 和单核细胞 / 巨噬细胞显著重建, 人类 NK 细胞和 RBC 不存在。我们注意到在人类和小鼠之间对于 NK 细胞或多种髓样细胞发育和维持所要求的许多细胞因子 (包括 IL-15、GM-CSF、IL-4、M-CSF、以及 IL-3) 显示出显著的序列趋异。前面的研究已经证明这些鼠类细胞因子对适当的人类细胞类型具有极少影响。因为这些细胞因子主要是由非造血细胞生产的, 缺少这些人类细胞因子可以解释 humice 体内 NK 细胞和髓样细胞的较差重建。

[0129] 支持这种解释的是, 我们显示了可以体外刺激从 humice 的 BM 中分离的人类 CD34⁺ 前体细胞以分化成 NK 细胞、DC、单核细胞 / 巨噬细胞、以及红细胞。当通过流体动力学递送编码细胞因子的质粒 DNA 将适当的人类细胞因子引入人源化小鼠体内时, 诱导了 NK 细胞、DC、单核细胞 / 巨噬细胞、以及红细胞水平显著升高。当细胞因子的血清水平下降时, 重建水平也下降。因此, humice 体内 NK 细胞和髓样细胞较差的重建是由于缺少对于它们分化和维持所通常要求的适当的人类细胞因子。引入适当的细胞因子导致 humice 体内这些人类血细胞谱系的重建水平显著增加。

[0130] 流体动力学基因递送广泛用于在小鼠体内产生高水平瞬时肝和全身转基因表达 (Suda T, Liu D(2007)Mol Ther 15 :2063-2069)。这种方法涉及短时间内 (6-8 秒) 大量 (10% 体重) 地尾静脉注射 DNA。这种动力学压力引起肝损伤, 导致肝细胞吸收 DNA (Suda T, Liu D(2007)Mol Ther 15 :2063-2069)。在转录和翻译之后, 细胞因子分泌到循环系统中并且可以到达 BM 或其他器官中的靶细胞。因此, 通过单次注射编码细胞因子的 DNA, 在血清中检测出 IL-15 持续 2 周并且检测出 FL 持续 3 周。IL-15 和 FL 血清持续时间之间的差异可能是由于蛋白质半衰期的不同或 IL-15 通常通过 IL-15Ra 链结合到细胞表面上 (Mortier E, Woo T, Advincula R, Gozalo S, Ma A(2008)J Exp Med 205 :1213-1225)。从一个单次 DNA 注射生产的 IL-15 和 FL 的数量显然足以诱导 NK 细胞水平显著升高持续至少 30 天。当在循环系统中不再检测出细胞因子时, 这些 NK 细胞持久性表明在分化的早期阶段这些细胞因子起到关键性作用。一旦产生, 在循环系统中细胞因子变得不能检出之后 NK 细胞能够存活延长的时间。因为它们在多种血细胞谱系上的作用, FL 和 IL-15 的表达还导致脾和 BM 中单核细胞 / 巨噬细胞、DC、以及 B, 但不是 T 水平升高。此外, 通过流体动力学基因递送表达适当的细胞因子还显著地增强了特定髓样谱系细胞 (包括 DC、单核细胞 / 巨噬细胞、以及红细胞) 的重建, 证明了这种方法是广泛应用。与 NK 细胞、DC 以及单核细胞 / 巨噬细胞改善的

重建相比较（在递送人类细胞因子基因之后7天它们变得清楚），直至细胞因子基因递送之后30天，红细胞的改善的重建也没有到达峰值水平。这一方面可以通过人类WBC与小鼠WBC的比率差异来解释，并且另一方面可以通过人类RBC与小鼠RBC的比率差异来解释。因为小鼠RBC巨大数量，生产足够数量的人类RBC需要较长的时间才能达到类似百分比。以前，已经报道了两个组通过将重组体人类IL-15注入NOD-scid小鼠或BALB/c-Rag2^{-/-}IL12rg^{-/-}小鼠体内增强了NK细胞发育（Huntington ND等人（2009）*J Exp Med* 206:25-34; Kalberer CP, Siegler U, Wodnar-Filipowicz A(2003)*Blood* 102:127-135）。与每日细胞因子注射相比较（这是麻烦和耗资的），通过流体动力学基因递送来表达细胞因子基因是一种可负担的、简单的并且有效的方法，因为一个单次注射导致特定血细胞谱系重建升高持续超过30天。

[0131] 这些细胞因子诱导的NK细胞显示出正常表面表型和功能。与前面的观察相反（其中在将重组体IL-15每日注入NOD-scid小鼠体内之后产生人类NK细胞），这些细胞表达NKp46但不表达NKG2D和NKG2A（Kalberer CP, Siegler U, Wodnar-Filipowicz A(2003)*Blood* 102:127-135）。在本研究中，这些细胞因子诱导的人类NK细胞表达所有三种主要家族的NK受体，包括活化受体NKG2D、抑制受体NKG2A和KIR、以及自然细胞毒性受体NKp46。相一致地，在体外和体内两者中细胞因子诱导的NK细胞能够溶解MHC类型I缺陷型靶细胞并且经聚(I:C)刺激时能够分泌FN- γ 。此外，细胞因子诱导的NK细胞能够建立对腺病毒感染感染的强劲应答（如通过IL-15-和FL-处理的小鼠体内扩大的肝坏死以及血清ALT高水平所指示）。与小鼠体内野生型NK细胞类似（它们通过IFN- γ 分泌介导肝炎）（Chen Q, Wei H, Sun R, Zhang J, Tian Z(2008)*Hepatology* 47:648-658; Rosenberger CM, Clark AE, Treuting PM, Johnson CD, Aderem A(2008)*Proc Natl Acad Sci USA* 105:2544-2549），IL-15-和FL-处理的腺病毒感染的humice的血清IFN- γ 水平显著地升高。这些发现表明在表面表型和功能两方面细胞因子诱导的NK细胞是正常的。

[0132] 实例2

[0133] 在人源化小鼠体内人类细胞因子的表达提高了人类T细胞和B细胞的重建和功能

[0134] 在人源化小鼠体内人类T细胞和B细胞的重建是适当的，但它们未显示最佳功能。例如，虽然在病毒攻击之后已经检测出人类CD8⁺T细胞应答，这些CD4⁺T细胞的功能是异常的；在人源化小鼠体内不存在人类B细胞介导的抗体应答。如在此显示，人类T细胞和B细胞应答的异常还由于在小鼠体内小鼠细胞因子与人类细胞的较差的交叉反应性。在此显示的是将编码人类GM-CSF和IL-4的质粒注射到humice体内导致人类CD209⁺树突状细胞的重建提高，它被认为是针对T细胞的主要抗原呈递细胞。此外，IL-4还显示在人类B细胞中促进细胞增殖、存活以及免疫球蛋白类别转换成IgG和IgE，并且由幼稚CD4⁺T细胞获取Th2表型。使用类毒素(TT)疫苗来免疫GM-CSF和IL-4处理的humice从而确定这些小鼠是否可以产生TT特异性抗体应答。

[0135] 如在此说明的，用编码人类GM-CSF和IL-4的质粒或空pcDNA载体（载体）流体动力学地注射具有类似人类白细胞重建（50-80%）的12周龄的人源化小鼠。在7天之后，用破伤风类毒素(TT)免疫这些小鼠三次，其中给药之间间隔3周（图12A）。在第三次免疫之后2周收集脾和血清。图12B显示出与载体处理的小鼠相比较，来自GM-CSF和IL-4处理的小鼠的脾显著地增大。相应地，在GM-CSF和IL-4处理的小鼠的脾中存在显著扩展的

人类单核细胞 (MNC) (约 20 倍) (图 12C)。从脾中人类 B 细胞和 T 细胞的细胞表面表型分型结果中,还可以指示的是人类 B 细胞发展到生产成熟抗体阶段 ($CD19^{\text{低}}CD20^+$),这与贯穿细胞因子治疗和免疫的整个过程的正常的人类曲线一致 (图 13);同时通过上调 HLA-DR 和 CD40L 的表达来活化人类 T 细胞 (图 14)。

[0136] 来自免疫的、GM-CSF 和 IL-4 处理的小鼠的血清中人类 IgG 和 IgM 的总水平对应地达到高达 1.3mg 和 140 μ g (图 15A、15B),这类似于人体中的水平 (对应地 4mg 和 1mg)。最重要的是,首次在 humice 体内成功建立起抗原特异性人类抗体应答。在载体处理的小鼠体内不能检测出人类 TT 特异性 IgG,而在细胞因子处理的小鼠体内,它达到平均 0.16IU/ml (图 15C)。免疫之后在人体内 0.1IU/ml 抗破伤风类毒素抗体足以保护该个体免受感染。此外,在 GM-CSF⁺IL-4 处理的小鼠体内人类 T 细胞应答还显示它们对 TT 抗原的特异性 (图 16A-16B)。使用破伤风毒素肽 (830-843) 来刺激这些脾 T 细胞。与来自载体处理的小鼠的细胞相比较,在 TT 特异性刺激之后来自 GM-CSF⁺IL-4 处理的小鼠的 T 细胞可能产生显著水平的人类 IFN- γ 和 IL-4。

[0137] 使用在此所述的方法,抗原在小鼠体内建立起显著水平的人类抗原-特异性抗体应答。因此,在此所述的方法提供了一种有用的平台用于测试疫苗并且生产人类抗体以用于治疗目的。

[0138] 表:细胞因子以及细胞因子的功能

[0139]

细胞因子	功能
IL-1 α	炎症
IL-1 β	炎症
IL-2	T 细胞 / 调节性 T 细胞
IL-3	HSC
IL-4	Th2、B 细胞、树突状细胞
IL-5	嗜酸性细胞
IL-6	炎症、血细胞生成
IL-7	胸腺细胞、T 细胞
IL-8	嗜中性细胞
IL-9	T 细胞
IL-10	Th2、自身免疫炎症
IL-11	HSC、B 细胞

IL-12	Th1、NK
IL-13	巨噬细胞、B 细胞
IL-14	B 细胞增殖
IL-15	NK、B 细胞、T 细胞
IL-16	CD4 ⁺ 细胞
IL-17	Th17
IL-18	Th1
IFN-g	B 细胞、巨噬细胞、Th1
IL-19	Th2、单核细胞
IL-20	角质化细胞、HSC
IL-21	T、B、NK
IL-22	炎症
IL-23	Th23、CD8 ⁺ DC
IL-24	单核细胞、树突状细胞
IL-25	Th2
IL-26	T 细胞
IL-27	T 和 B 细胞
IL-28	抗病毒性应答
IL-29	抗病毒和微生物
IL-30	IL-27 的一个链
IL-31	Th2、单核细胞
IL-32	单核细胞、巨噬细胞
IL-33	Th2
IL-34	髓样细胞

IL-35	调节性 T 细胞
制癌蛋白 M	肝发育、血细胞生成
白血病抑制因子	髓细胞性白血病细胞
睫状节神经细胞营养因子	神经系统
心营养蛋白 1	心脏病
TNF- α	炎症
B 细胞激活因子 (BAFF)	B 细胞
Fas 配体	凋亡
淋巴毒素 (TNF- β)	CD8 ⁺ T 细胞
RANKL	树突状细胞
TRAIL	凋亡
IFN- α	NK、巨噬细胞
IFN- β	NK、巨噬细胞
干细胞因子	干细胞
GM-CSF	HSC、单核细胞
M-CSF	单核细胞、巨噬细胞
G-CSF	粒细胞、干细胞
骨桥蛋白	免疫细胞、自身免疫性疾病
趋化因子	趋化性

[0140]

[0141] 在此引用的所有专利、公开申请以及参考文献的传授的内容都通过引用以其全部内容结合在此。

[0142] 虽然通过参考其实例性的实施方案本发明已经进行了具体的展示和说明,本领域普通技术人员应当理解的是在不偏离由所附权利要求所包括的本发明的范围下其中可以在形式和细节方面进行多种改变。

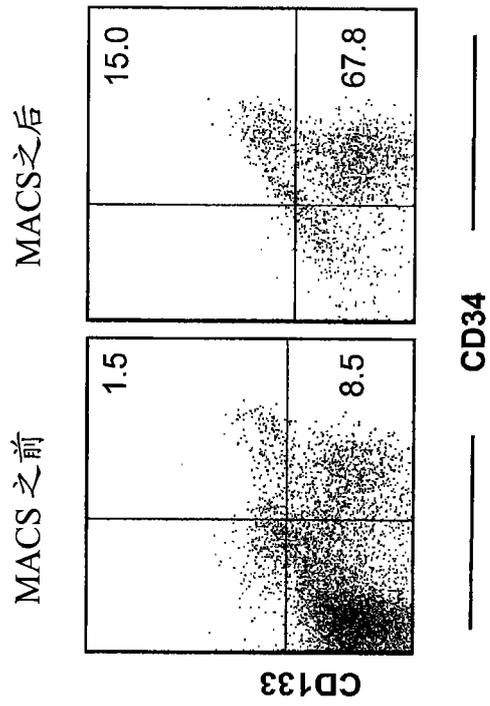


图 1A

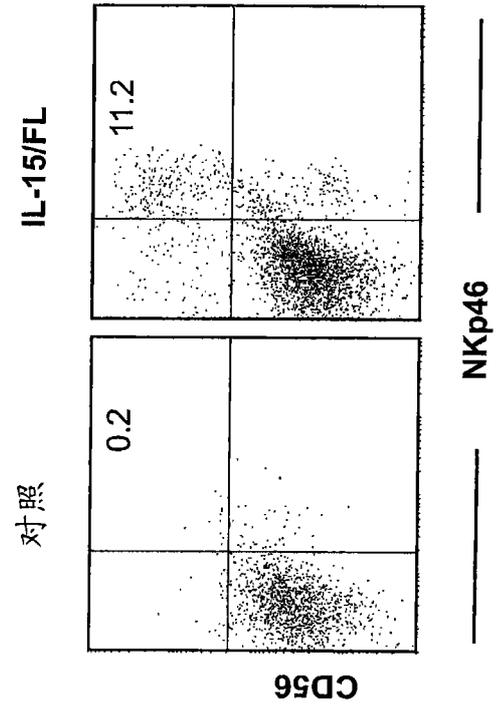


图 1B

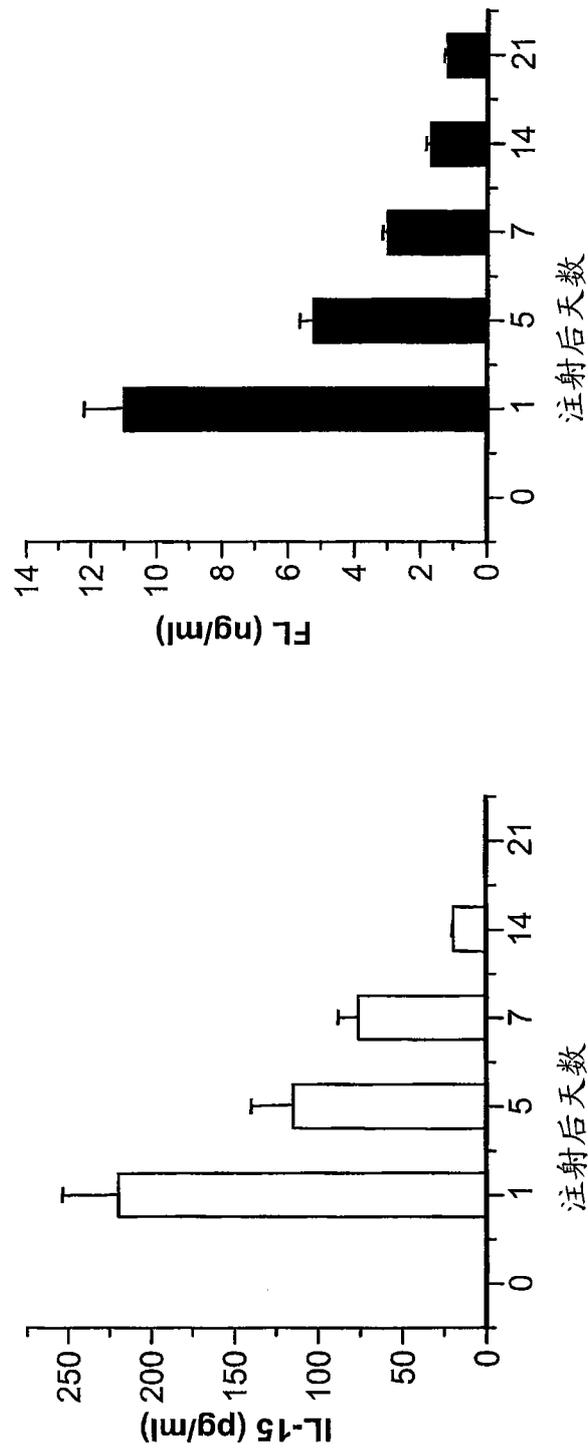


图 2

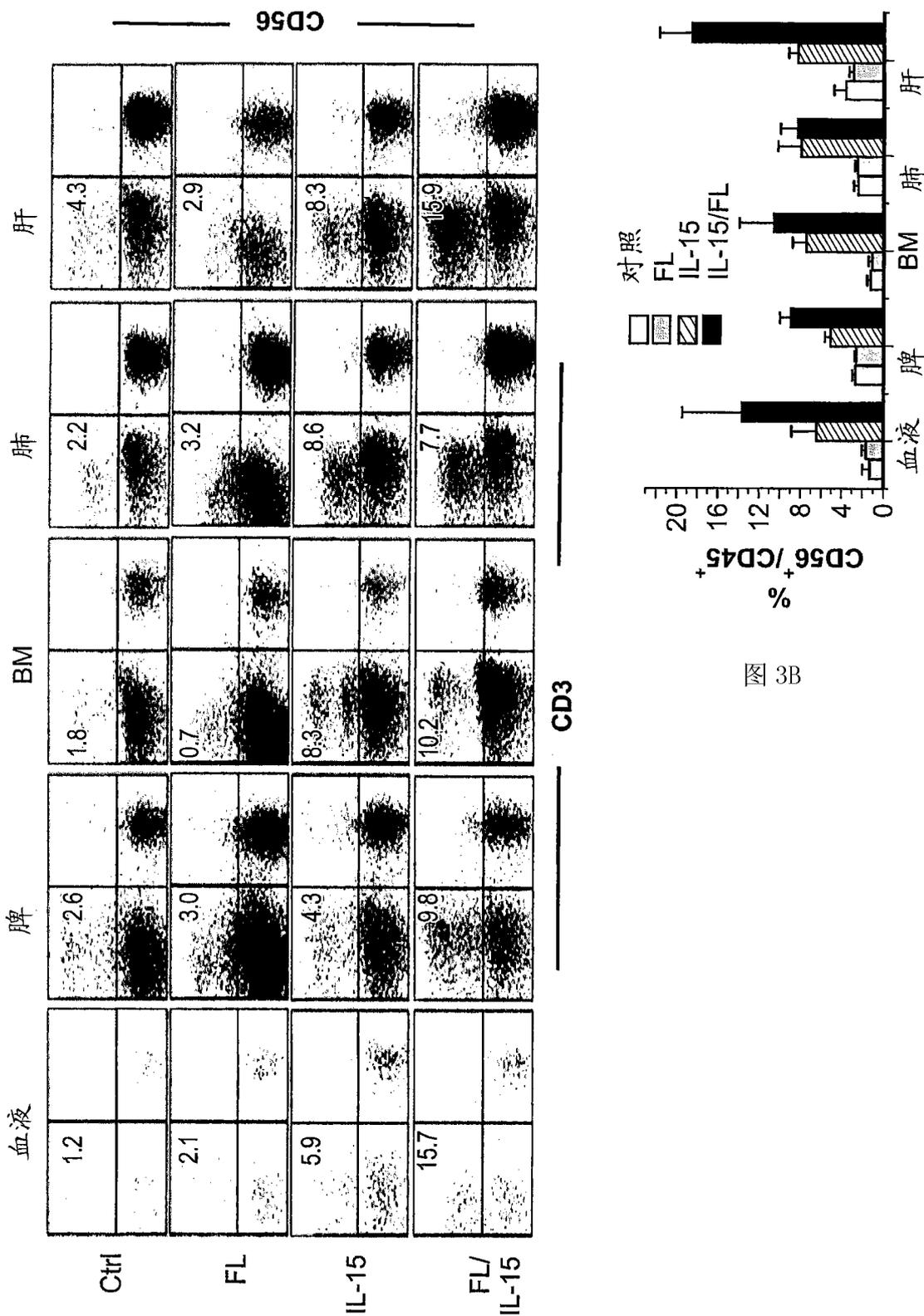


图 3A

图 3B

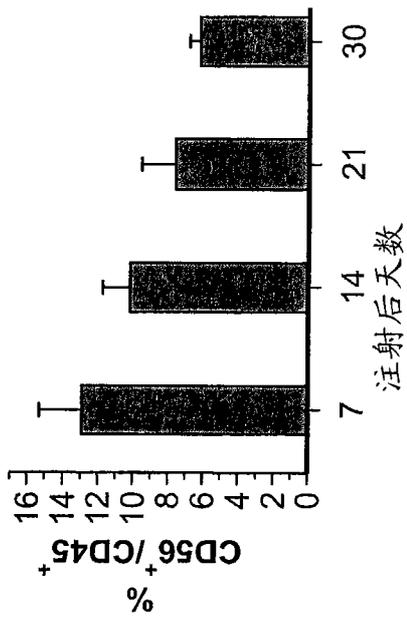


图 3C

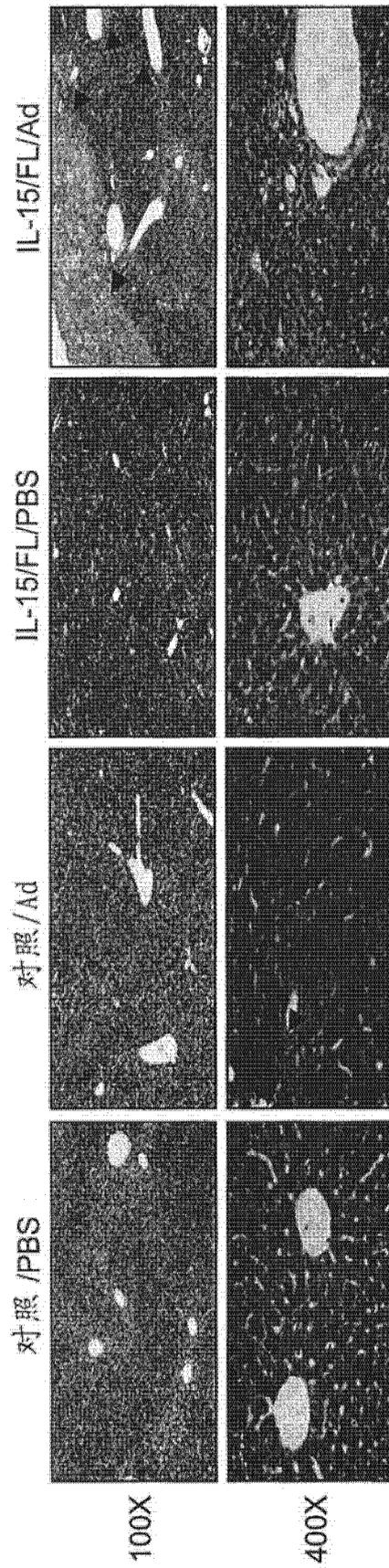


图 4A

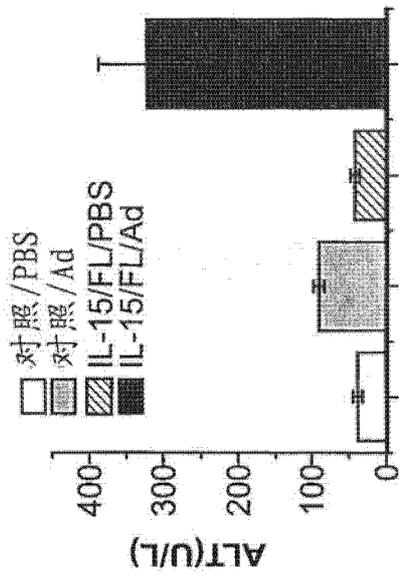


图 4B

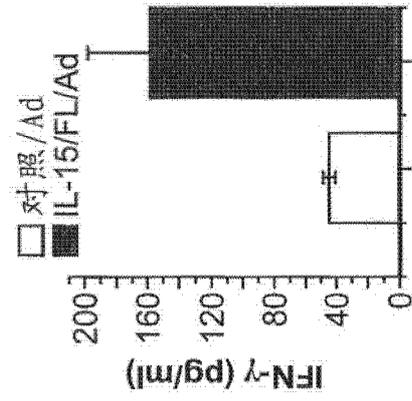


图 4C

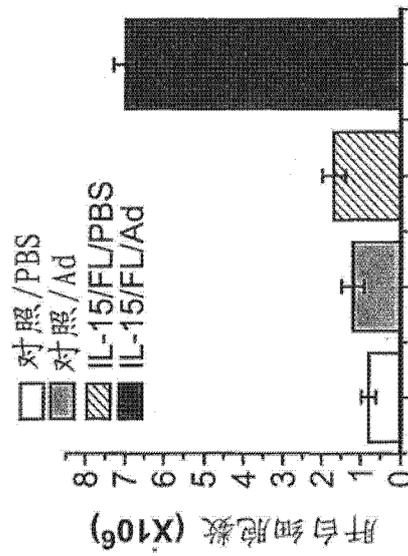


图 4D

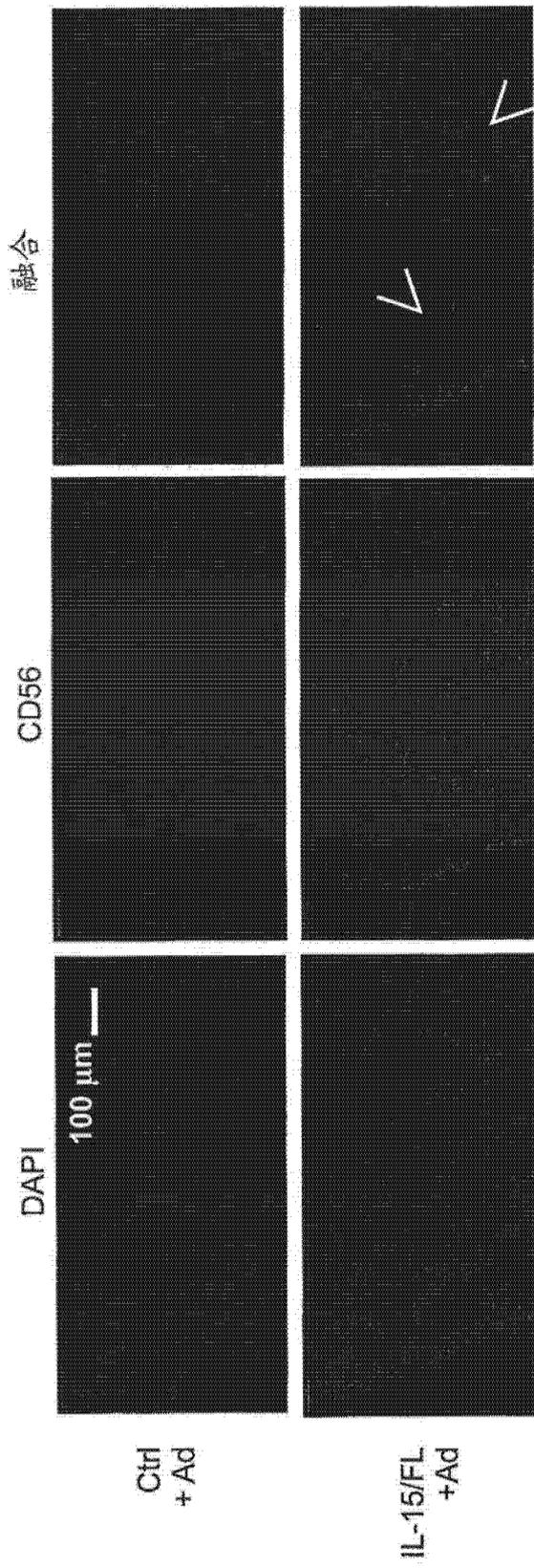


图 4E

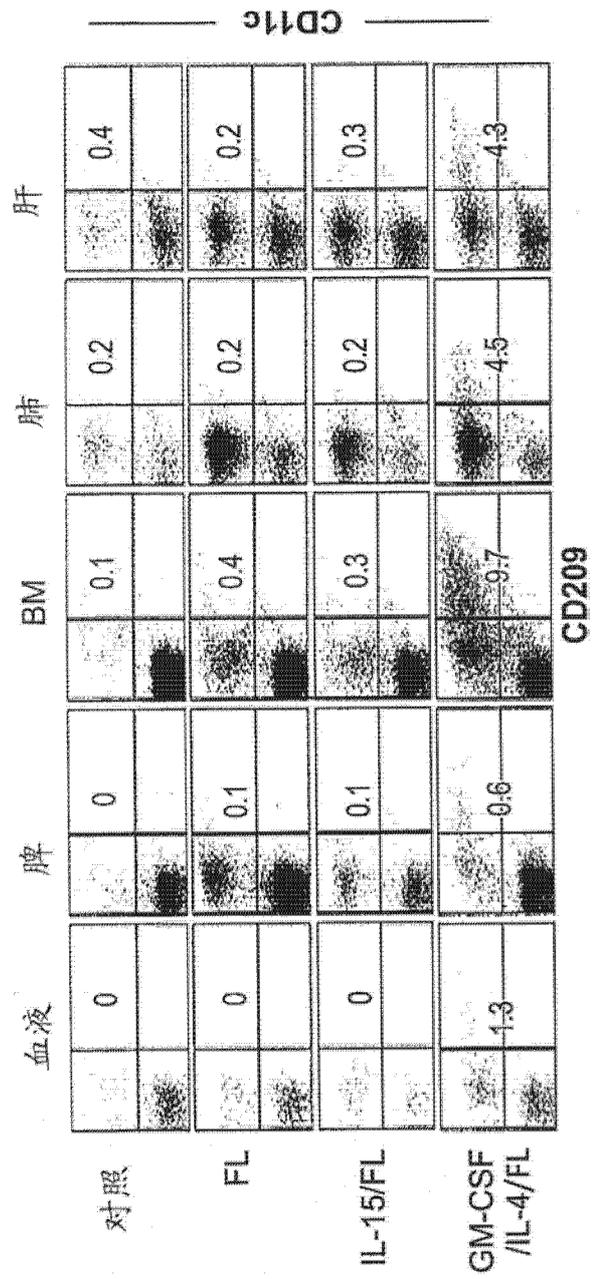


图 5A

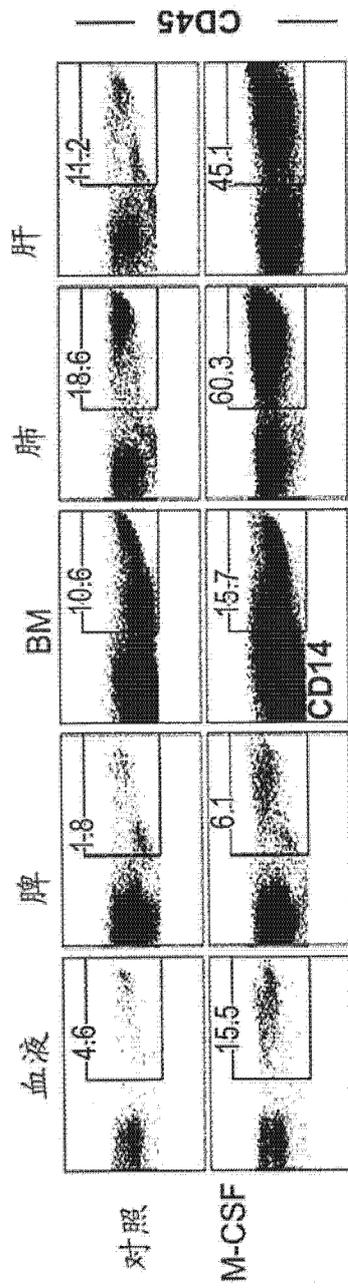


图 5B

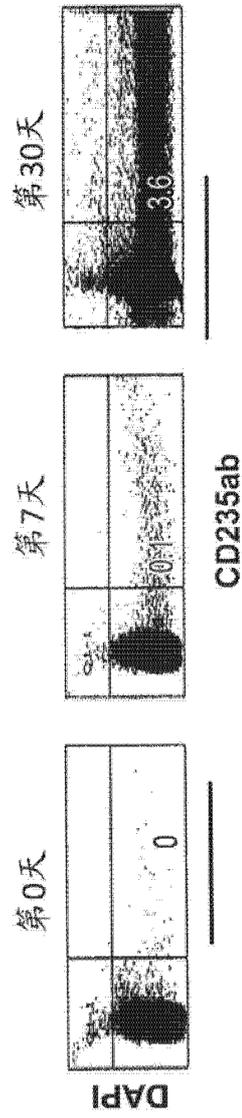


图 5C

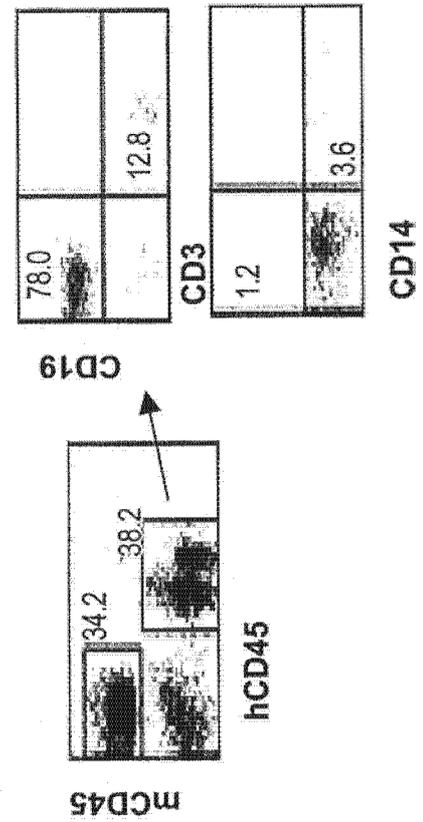


图 6A

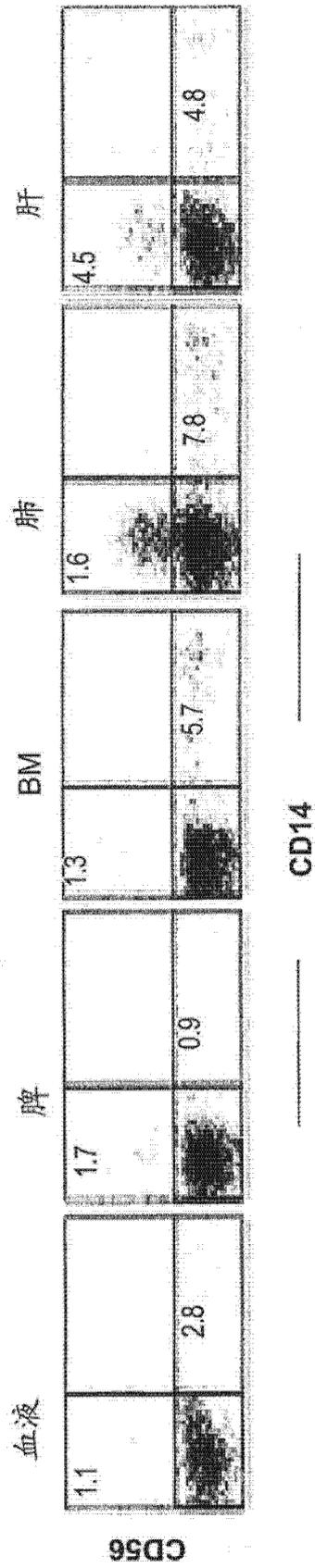


图 6B

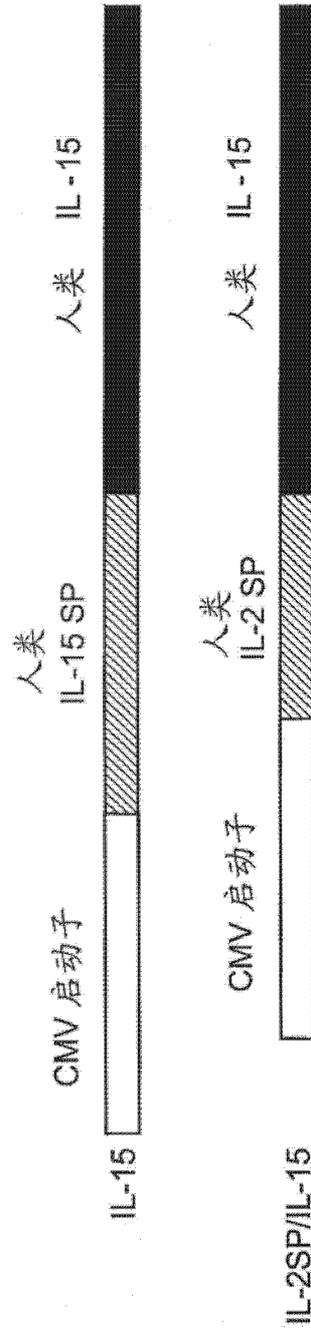


图 7A

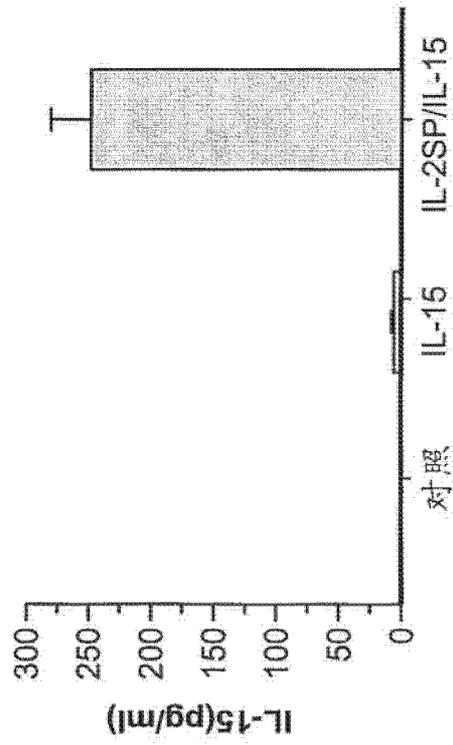


图 7B

图 8A

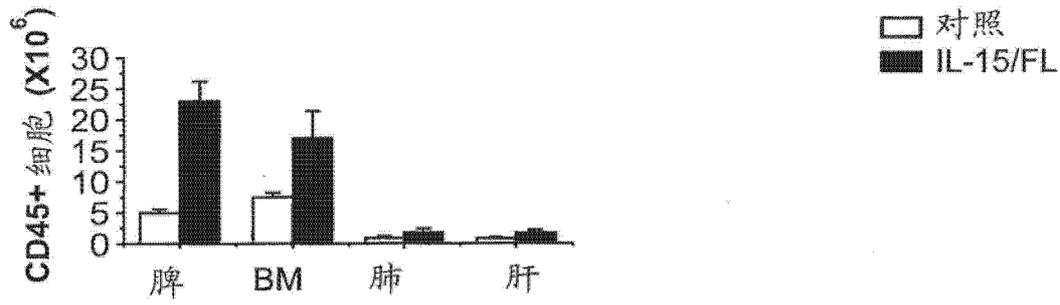


图 8B

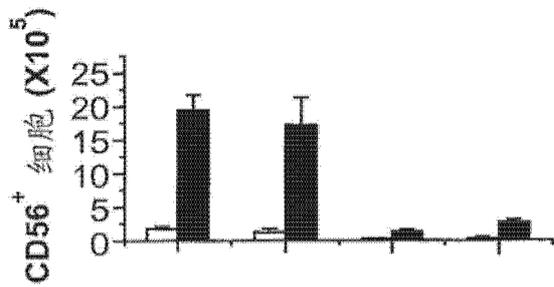


图 8C

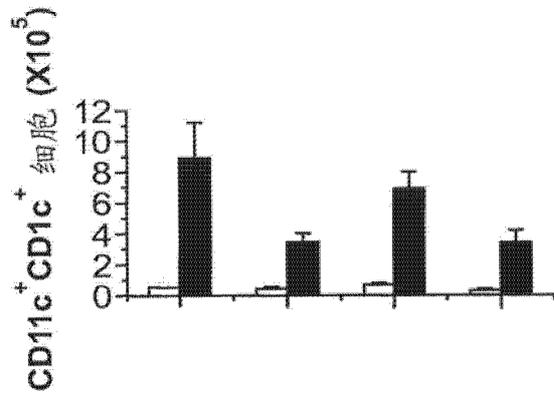


图 8D

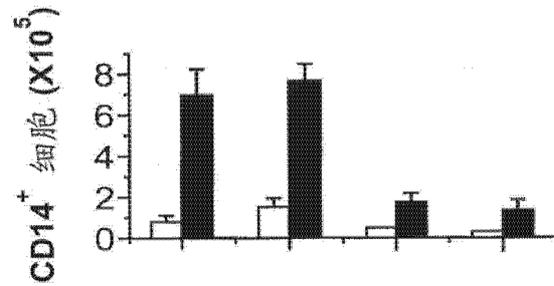


图 8E

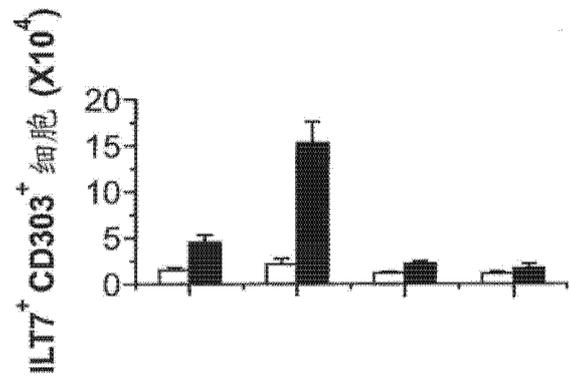


图 8F

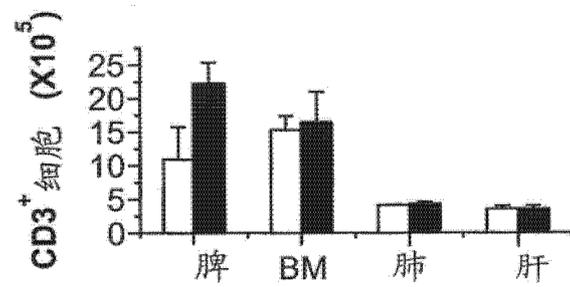
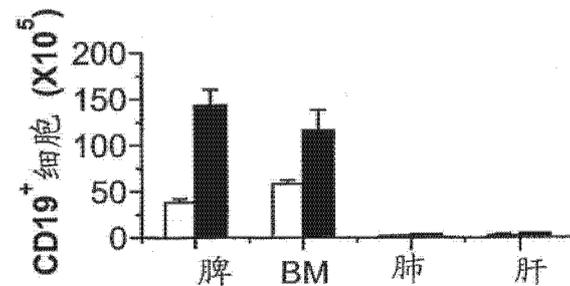


图 8G



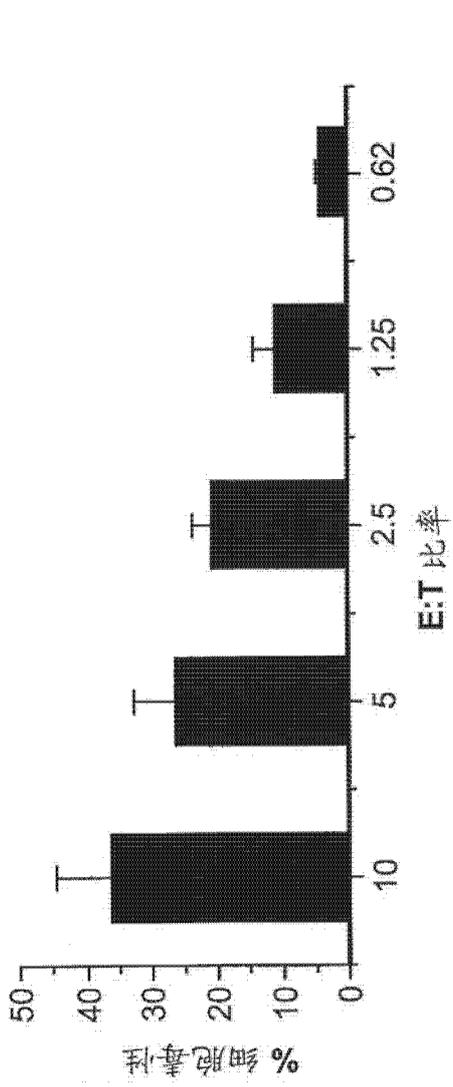


图 10A

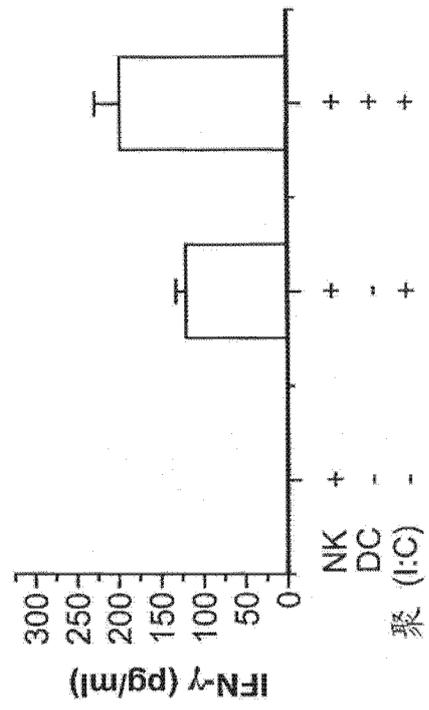


图 10B

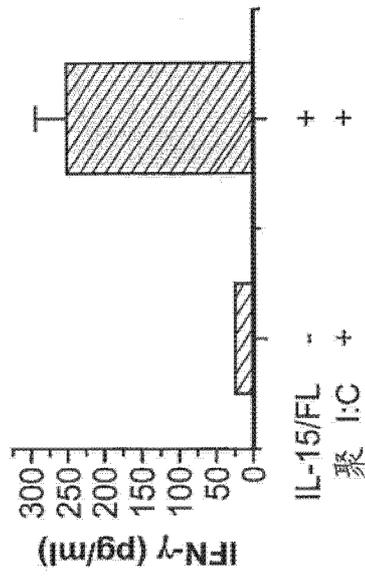


图 10C

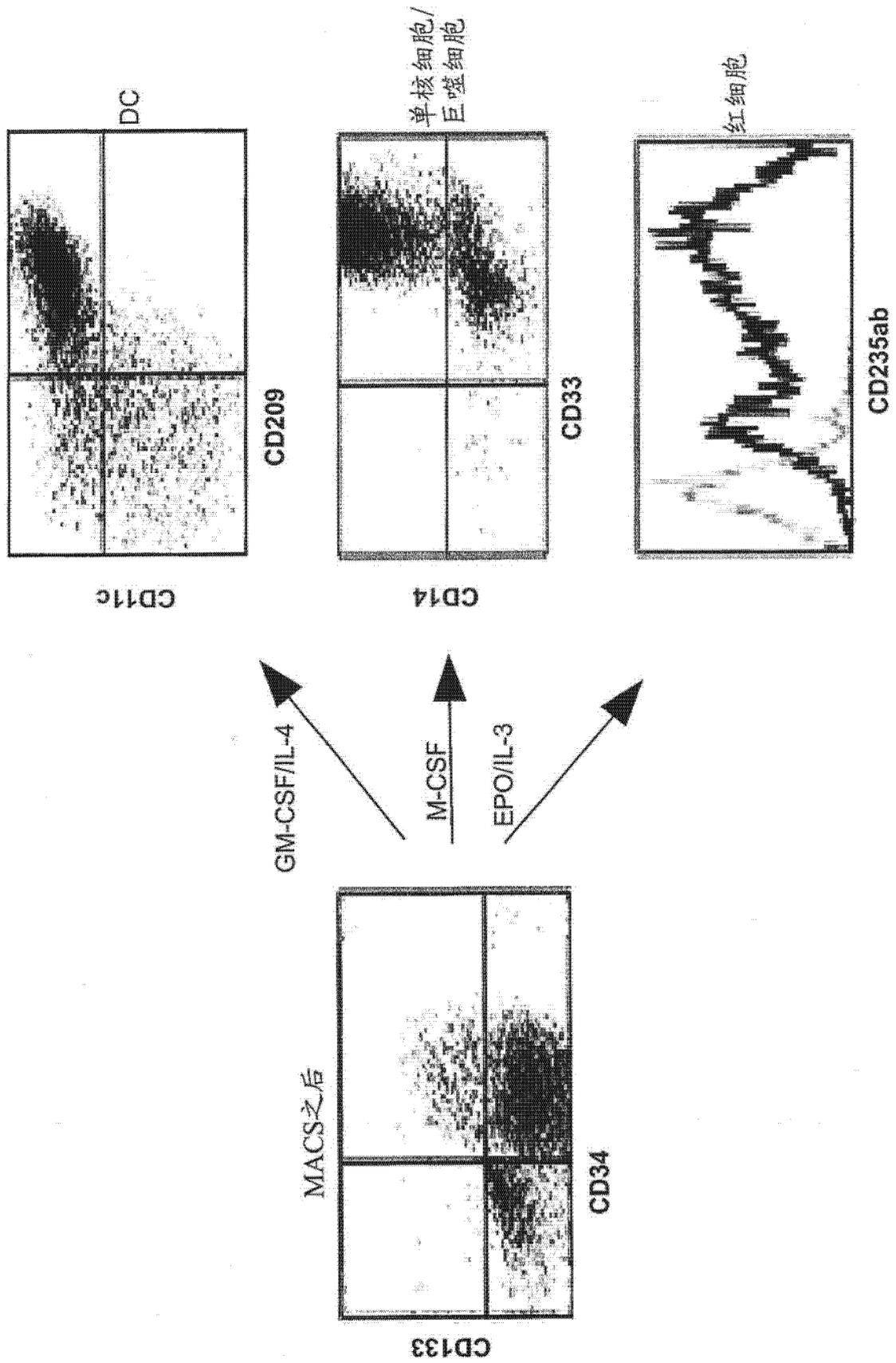


图 11

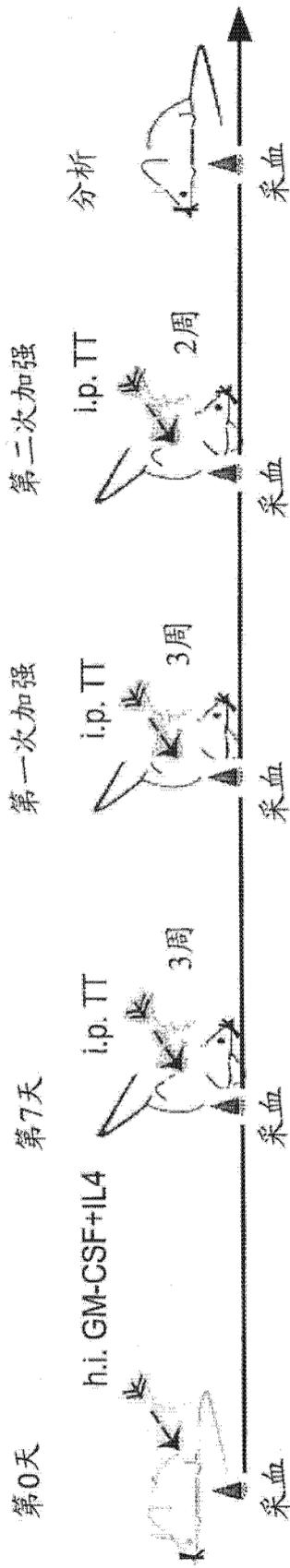


图 12A

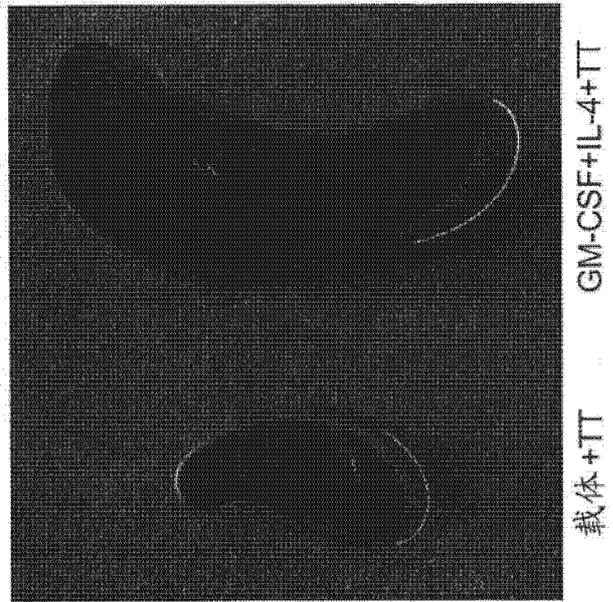


图 12B

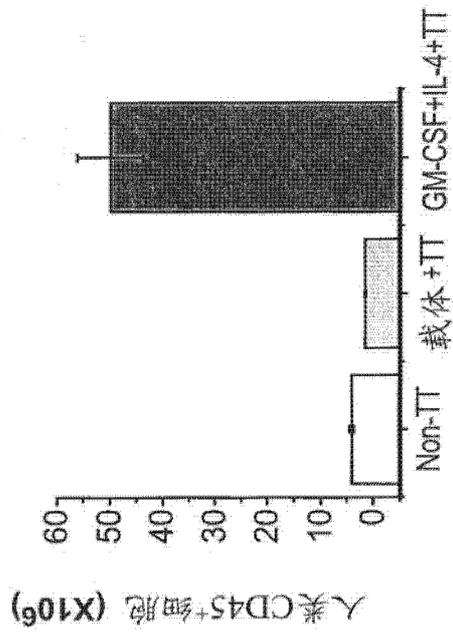


图 12C

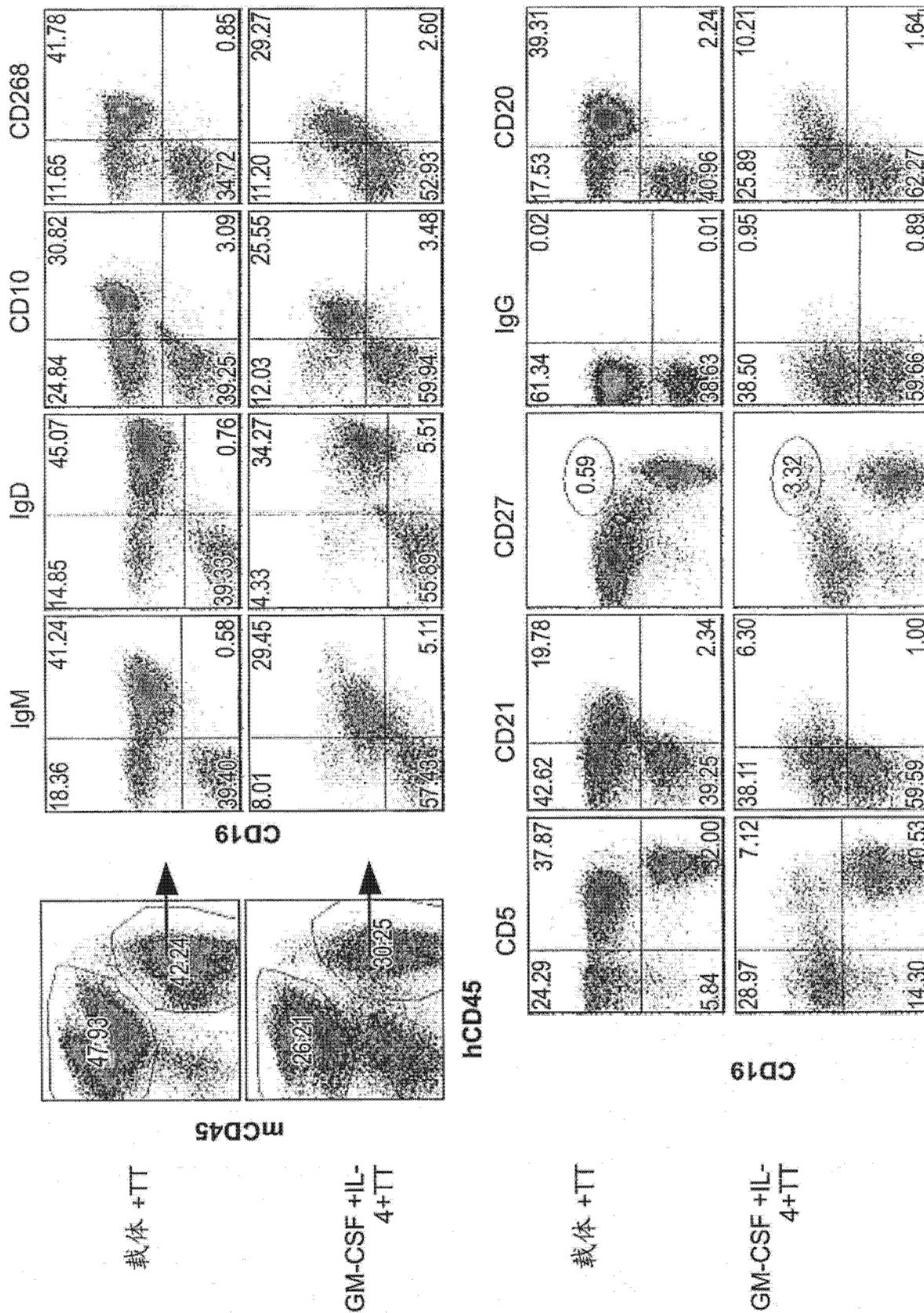


图 13

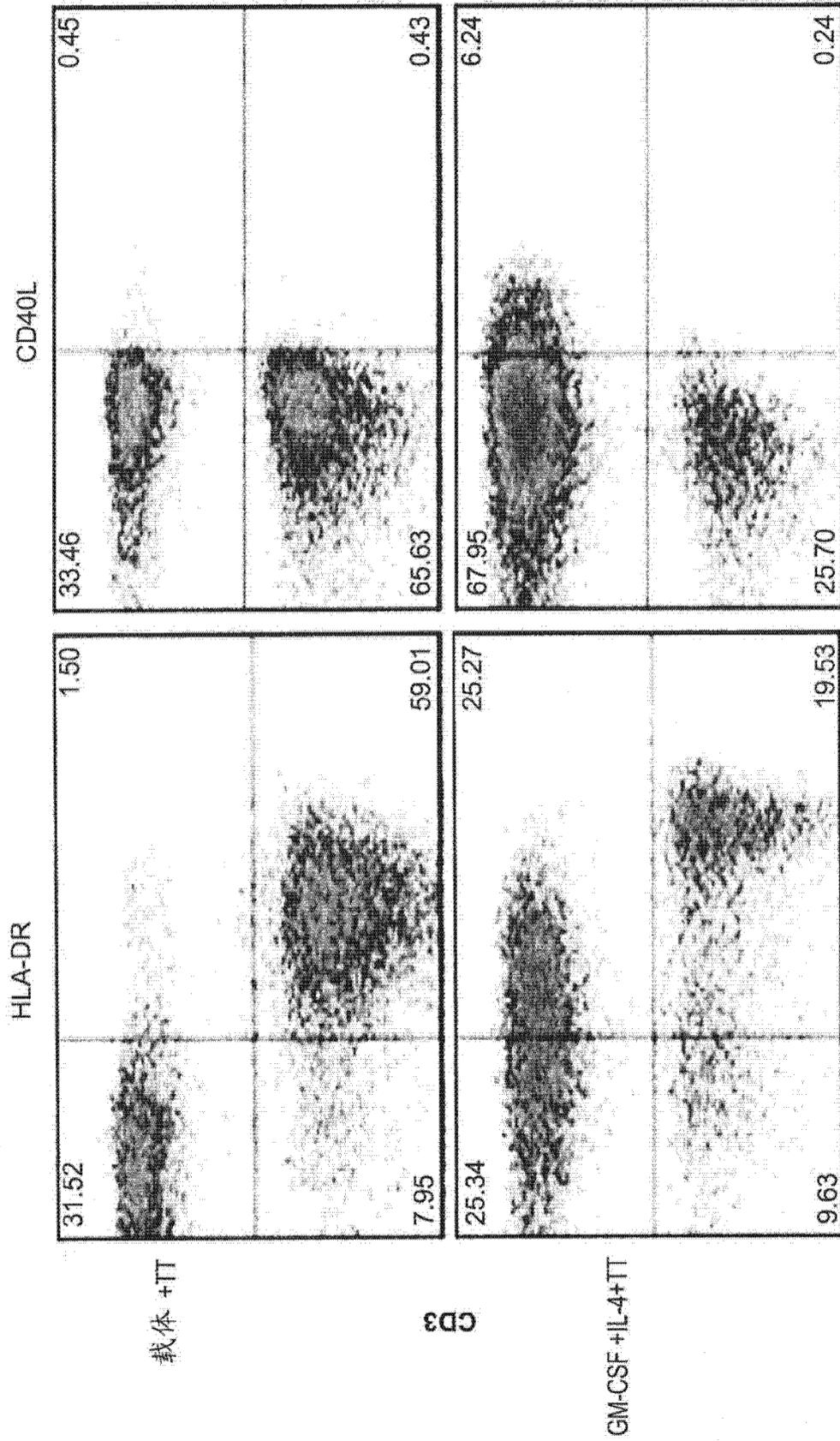


图 14

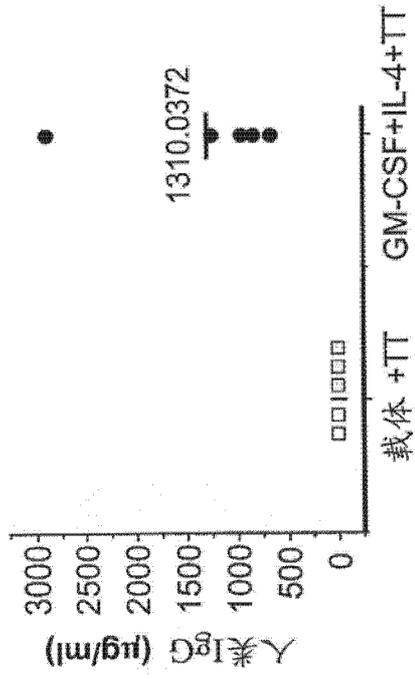


图 15A

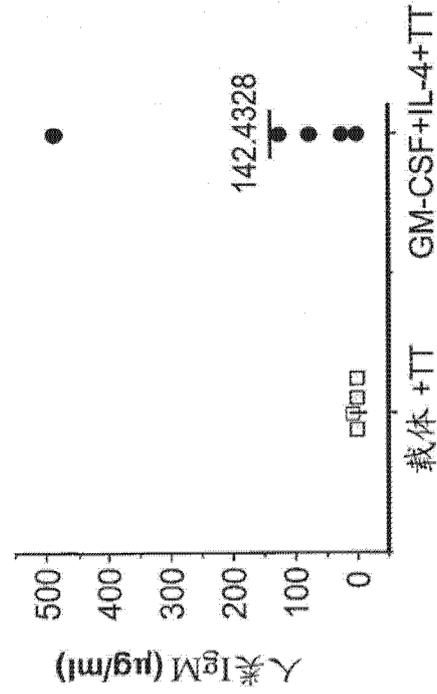


图 15B

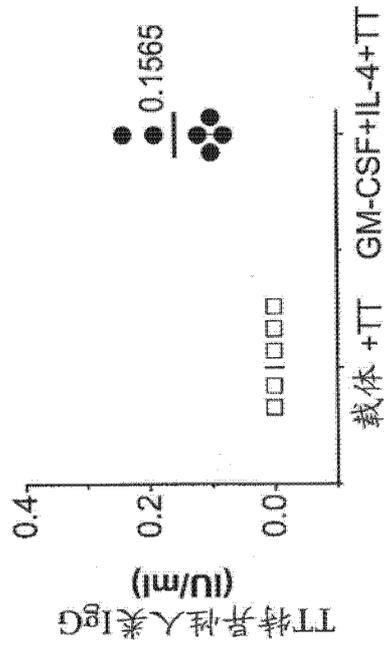


图 15C

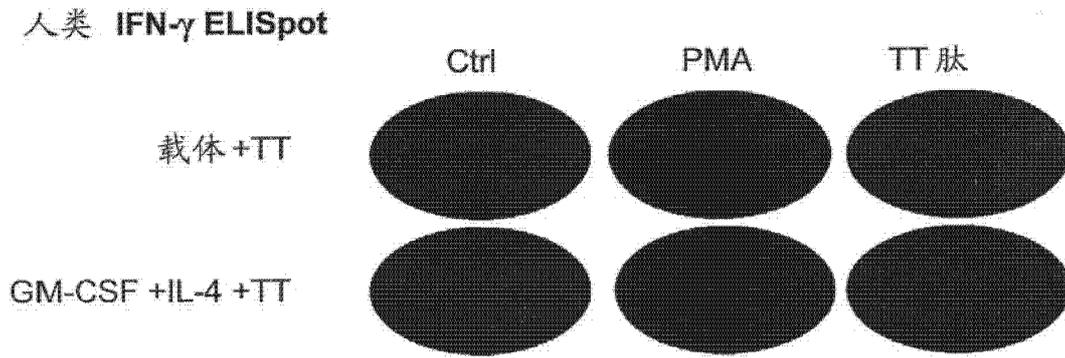


图 16A

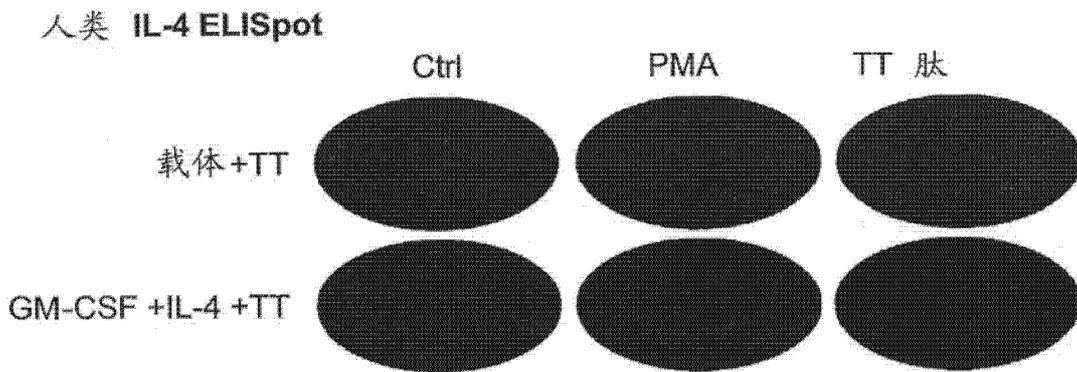


图 16B

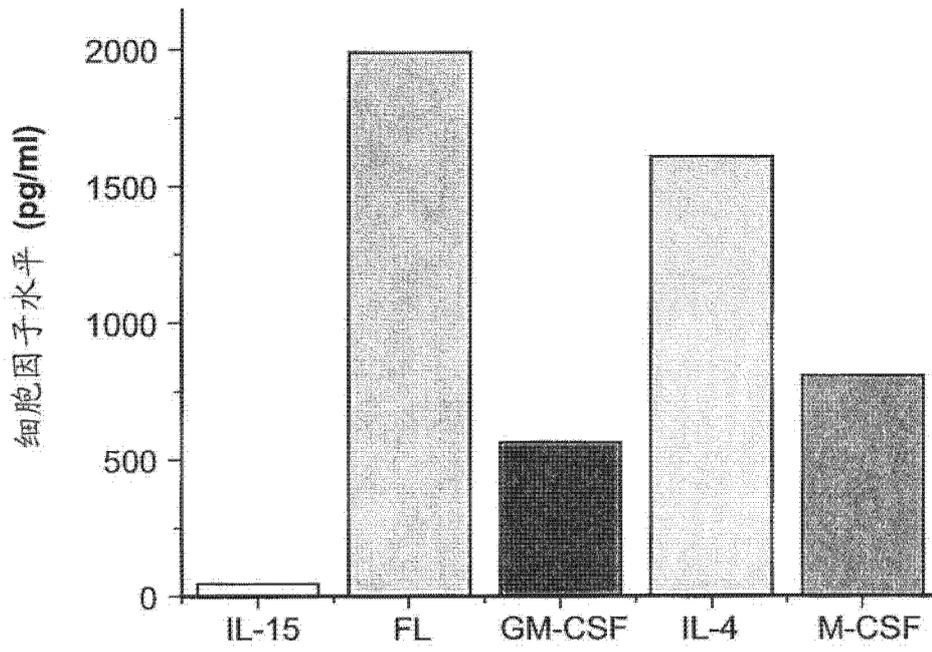


图 17