



## (12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 114766432 B

(45) 授权公告日 2024.08.02

(21) 申请号 202210388378.8

(22) 申请日 2013.11.05

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 114766432 A

(43) 申请公布日 2022.07.22

(30) 优先权数据

61/722,437 2012.11.05 US

(62) 分案原申请数据

201380056429.6 2013.11.05

(73) 专利权人 再生元制药公司

地址 美国纽约州

专利权人 耶鲁大学 生物医学研究院

(72) 发明人 R·弗拉维尔 T·施特罗维希

M·G·曼茨 C·博尔索蒂

M·多达普卡 A·J·墨菲

S·史蒂文斯 G·D·雅克波罗斯

(74) 专利代理机构 北京龙双利达知识产权代理有限公司 11329

专利代理人 毛威 肖鹏

(54) 发明名称

经遗传修饰的非人动物及其使用方法

(57) 摘要

本申请涉及经遗传修饰的非人动物及其使用方法。提供了经遗传修饰的非人动物，其可以用于对人造血细胞形成、功能或疾病建模。经遗传修饰的非人动物包含与IL-6启动子可操作连接的编码人IL-6的核酸。在一些例子中，表达人IL-6的经遗传修饰的非人动物还表达人M-CSF、人IL-3、人GM-CSF、人SIRPa或人TP0中至少一种。在一些例子中，经遗传修饰的非人动物是免疫缺陷的。在一些此类例子中，将健康或患病的人造血细胞移入经遗传修饰的非人动物。还提供了在对人造血细胞形成、功能和/或疾病建模中使用主题经遗传修饰的非人动物的方法，及在生成主题经遗传修饰的非人动物和/或实施主题方法中得到应用的试剂和试剂盒。

(51) Int.CI.

A61K 49/00 (2006.01)

A01K 67/0278 (2024.01)

A01K 67/0271 (2024.01)

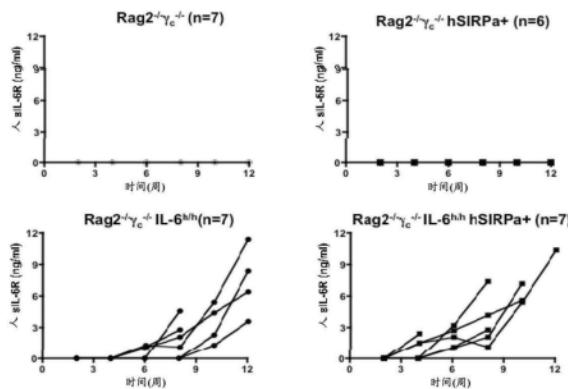
(56) 对比文件

Till Strowig等. Transgenic expression of human signal regulatory protein alpha in Rag2<sup>-/-</sup>γc<sup>-/-</sup> mice improves engraftment of human hematopoietic cells in humanized mice. PNAS. 2011, 第108卷(第32期), 摘要、第13218页第2栏最后1段-13219页第1栏.

Sachiko Suematsu等. IgG1 plasmacytosis in interleukin 6 transgenic mice. Immunology. 1989, 第86卷摘要、7547页第2栏第1段, 第7550第2栏, 第7551页第1栏.

审查员 左梦迪

权利要求书1页 说明书32页 附图15页



1. 一种生成包含人造血癌细胞的经遗传修饰的小鼠的方法,该方法包括:

将人造血癌细胞群体移植到经遗传修饰的小鼠中,所述经遗传修饰的小鼠是免疫缺陷的且包含与IL-6启动子在小鼠IL-6基因座处可操作连接的编码人IL-6的核酸,其中所述经遗传修饰的小鼠表达人IL-6而不表达小鼠IL-6。

2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述编码人IL-6的核酸在所述小鼠IL-6基因座处替换所述小鼠IL-6基因,其中所述IL-6启动子为所述小鼠IL-6启动子。

3. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述经遗传修饰的小鼠为重度联合免疫缺陷SCID小鼠。

4. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述经遗传修饰的小鼠不表达重组活化基因RAG2,并且不表达IL2受体 $\gamma$ 。

5. 根据权利要求1-4中任一项所述的方法,其特征在于,所述经遗传修饰的小鼠还包括与人SIRPa启动子可操作连接的编码人SIRPa的核酸,其中,所述核酸被随机整合到所述经遗传修饰的小鼠的基因组中。

6. 根据权利要求5所述的方法,其特征在于,所述经遗传修饰的小鼠表达至少一种选自下组的别的人核酸:

- i) 与M-CSF启动子可操作连接的编码人M-CSF的核酸;
- ii) 与IL-3启动子可操作连接的编码人IL-3的核酸;
- iii) 与GM-CSF启动子可操作连接的编码人GM-CSF的核酸;和
- iv) 与TP0启动子可操作连接的编码人TP0的核酸。

7. 根据权利要求6所述的方法,其特征在于,所述编码人M-CSF的核酸位于所述小鼠的M-CSF基因座处。

8. 根据权利要求7所述的方法,其特征在于,所述编码人IL-3的核酸位于所述小鼠的IL-3基因座处。

9. 根据权利要求8所述的方法,其特征在于,所述编码人GM-CSF的核酸位于所述小鼠的GM-CSF基因座处。

10. 根据权利要求9所述的方法,其特征在于,所述编码人TP0的核酸位于所述小鼠的TP0基因座处。

11. 根据权利要求1-4中任一项所述的方法,其特征在于,所述移植包括静脉内、肝内、腹膜内、股骨内和/或胫骨内施用。

12. 根据权利要求1-4中任一项所述的方法,其特征在于,所述经遗传修饰的小鼠在移植前被亚致死性地照射。

13. 根据权利要求1-4中任一项所述的方法,其特征在于,所述经遗传修饰的小鼠在移植前施用放射模拟药物。

14. 根据权利要求1-4中任一项所述的方法,其特征在于,所述人造血癌细胞是人多发性骨髓瘤细胞。

## 经遗传修饰的非人动物及其使用方法

[0001] 本申请是申请日为2013年11月5日、中国申请号为201380056429.6、发明名称为“经遗传修饰的非人动物及其使用方法”的发明申请的分案申请。

[0002] 关于得到联邦政府资助的研究或开发的声明

[0003] 本发明在由(美国)国家卫生研究所(NIH)授予的拨款号5R01CA156689-04下得到政府支持完成。政府具有本发明的某些权利。

[0004] 对相关申请的交叉引用

[0005] 按照35U.S.C. §119(e),本申请要求2012年11月5日提交的美国临时专利申请流水号61/722,437的申请日的优先权;其全部公开内容通过提及收入本文。

### 发明背景

[0006] 生物医学研究的目的是更好地了解人生理学以及使用此知识来预防、治疗或治愈人疾病。由于对人受试者进行实验的实际和伦理障碍,许多研究是对小型动物模型(诸如小鼠)进行的。因此,需要这些人疾病的动物模型。

[0007] 例如,在美国,20,000名左右的患者每年新诊断为患有多发性骨髓瘤(MM),即一种大多不能治愈的抗体分泌性终末分化B细胞恶性(Hideshima等,2007,Nat Rev Cancer.7:585-98;Kuehl和Bergsagel,2002,Nat Rev Cancer.2:175-87)。MM以骨髓(BM)中恶性浆细胞的浸润为特征,并且临床表现包括骨疾病、高钙血症、血细胞减少症、肾功能障碍和周围神经病(Hideshima等,2007,Nat Rev Cancer.7:585-98;Kuehl和Bergsagel,2002,Nat Rev Cancer.2:175-87)。在大多数病例中,MM之前有称作不确定意义的单克隆丙种球蛋白病(monoclonal gammopathy of undetermined significance, MGUS)的恶性前状况,其影响3%左右的年龄大于50岁的人(Landgren等,2009,Blood 113:5412-7)。复杂的异质遗传异常表征MM细胞,包括核型变化及IgH易位(Kuehl和Bergsagel,2002,Nat Rev Cancer.2:175-87;Zhan等,2006,Blood 108:2020-8)。认为MGUS中扩充的浆细胞克隆具有与骨髓瘤浆细胞相似的遗传和表型概况(Chng等,2005,Blood 106:2156-61;Fonseca等,2002,Blood 100:1417-24;Kaufmann等,2004,Leukemia.18:1879-82)。虽然已经提示细胞周期蛋白D基因中的突变驱动MM的形成,但是尚未结论性地证明其它因素的潜在贡献(Bergsagel等,2005,Blood 106:296-303)。不过,可遗传的遗传变化不是MM细胞行为的唯一决定因素。取而代之,对药物的抗性和对细胞因子的异常生物学应答受到与微环境的相互作用强烈影响,提供开发新颖治疗学的机会。

[0008] 与许多其它肿瘤一样,MM以与创建支持性环境的非恶性基质细胞强烈相互作用的异质细胞群体为特征(De Raeve和Vanderkerken,2005,Histol Histopathol.20:1227-50;Dhodapkar,2009,Am J Hematol.84:395-6)。MM细胞的BM微环境由多种多样的胞外基质(ECM)及造血和非造血起源两者的细胞成分组成。虽然BM为正常造血提供受到保护的环境,但是MM细胞与ECM蛋白和佐细胞的相互作用在MM发病机制中发挥至关重要的作用(De Raeve和Vanderkerken,2005,Histol Histopathol.20:1227-50;Dhodapkar,2009,Am J Hematol.84:395-6;Hideshima等,2007,Nat Rev Cancer.7:585-98)。基质细胞、髓样细胞、

破骨细胞和成骨细胞生成激活介导MM细胞迁移、存活和生长的信号途径的生长因子，诸如白介素6(IL-6)、B细胞活化因子(BAFF)、成纤维细胞生长因子和基质细胞衍生因子1a。特别地，由基质细胞、破骨细胞和髓样细胞生成的IL-6似乎是一种在早期阶段中及对于MM的发病机制至关重要的因子(De Raeve和Vanderkerken, 2005, *Histol Histopathol.* 20: 1227-50)。类似地，在与MM细胞相互作用时，破骨细胞和树突细胞生成BAFF和/或增殖诱导配体(APRIL)，提供也提高药物抗性的抗凋亡信号(De Raeve和Vanderkerken, 2005, *Histol Histopathol.* 20: 1227-50; Kukreja等, 2006, *J Exp Med.* 203: 1859-65)。

[0009] 癌发病机制中的主要事件(恶性细胞的不受控制的增殖、存活和扩散)取决于微环境小生境中存在的支持性细胞类型和可溶性因子的特定组合。小鼠模型在表征人的恶性转化和疾病的驱动力的关键方面发挥重要作用。然而，它们很少表现人疾病的遗传复杂性和临床病理学特征。虽然已经广泛采用将人肿瘤异种移植入免疫受损的小鼠中，但是可靠的移入通常仅在高度侵入性肿瘤或细胞系的情况下是可行的。

[0010] 目前可用于培养人肿瘤细胞的最佳模型是缺乏B细胞、T细胞和NK细胞的重度免疫缺陷小鼠。在MM的情况下，将原代骨髓瘤细胞移入这些小鼠中尚未获得成功，但是原代骨髓瘤细胞在共移植入免疫受损的小鼠中时能够移入人胎儿骨块(Yaccoby等, 1998, *Blood* 92: 2908-13)。在此模型中，MM细胞存在于人骨中，但是在小鼠骨中或在外围中检测不到，这证明了高残留异种排斥和对人BM微环境的需要(Yaccoby等, 1998, *Blood* 92: 2908-13; Yaccoby和Epstein, 1999, *Blood* 94: 3576-82)。证明其作为MM的体内模型的潜力，最近证明了NOD/Scid/ $\gamma$ c<sup>-/-</sup>小鼠容许移入数种MM细胞系(Dewan等, 2004, *Cancer Sci.* 95: 564-8; Miyakawa等, 2004, *Biochem Biophys Res Commun.* 313: 258-62)。然而，由于不跨越物种屏障但是对于支持转化细胞的生长和存活至关重要的大量因子，即使那些具有低异种排斥的小鼠模型具有受到限制的生长环境(Manz, 2007)。容许我们探查肿瘤与其环境之间的复杂致病性相互影响的体内模型对于设计新的药物和疗法会是至关重要的。

[0011] 因此，存在着开发人源化非人动物和方法以在小鼠中可靠培养和研究人造血细胞(包括原代人造血系统肿瘤细胞)的未满足的需要。本发明解决本领域这些未满足的需要。

## 发明概述

[0012] 提供了经遗传修饰的非人动物，其可以用于对人造血细胞形成、功能或疾病建模。经遗传修饰的非人动物包含与IL-6启动子可操作连接的编码人IL-6的核酸。在一些例子中，表达人IL-6的经遗传修饰的非人动物还表达人M-CSF、人IL-3、人GM-CSF、人SIRPa或人TP0中至少一种。在一些例子中，经遗传修饰的非人动物是免疫缺陷的。在一些此类例子中，将健康或患病的人造血细胞移入经遗传修饰的非人动物。还提供了在对人造血细胞形成、功能和/或疾病建模中使用主题经遗传修饰的非人动物的方法，及在生成主题经遗传修饰的非人动物和/或实施主题方法中得到应用的试剂及其试剂盒。

[0013] 在本发明的各个方面，提供了经遗传修饰的非人动物，经遗传修饰的非人动物包含如下的基因组，该基因组包含与IL-6启动子可操作连接的编码人IL-6的核酸，其中动物在IL-6启动子的调节控制下表达人IL-6多肽。在一些实施方案中，经遗传修饰的非人动物不表达动物的天然IL-6。

[0014] 在一些实施方案中，经遗传修饰的非人动物是啮齿类。在一些实施方案中，非人动

物是小鼠。在一些此类实施方案中,与编码人IL-6的核酸可操作连接的IL-6启动子是小鼠IL-6启动子,且人IL-6基因在小鼠IL-6基因座处与小鼠IL-6启动子可操作连接。

[0015] 在一些实施方案中,经遗传修饰的非人动物进一步包含一种或多种选自下述的别的核酸:在SIRPa启动子控制下的编码人SIRPa的核酸;与M-CSF启动子可操作连接的编码人M-CSF的核酸,其中动物表达人M-CSF;与IL-3启动子可操作连接的编码人IL-3的核酸,其中动物表达人IL-3;与GM-CSF启动子可操作连接的编码人GM-CSF的核酸,其中动物表达人GM-CSF;和与TPO启动子可操作连接的编码人TPO的核酸,其中动物表达人TPO。在一些实施方案中,启动子是所述基因的人启动子。在其它实施方案中,启动子是所述基因的非人动物启动子。在一些实施方案中,经遗传修饰的非人动物表达动物的相应天然蛋白。在其它实施方案中,经遗传修饰的非人动物不表达动物的相应天然蛋白。

[0016] 在一些实施方案中,经遗传修饰的非人动物是非人动物免疫系统方面免疫缺陷的。在一些此类实施方案中,免疫缺陷的经遗传修饰的非人动物不表达重组活化基因(RAG)。在一些此类实施方案中,免疫缺陷的经遗传修饰的非人动物不表达IL2受体 $\gamma$ 链(IL2rg,或“ $\gamma$  c”)。在一些此类实施方案中,免疫缺陷的经遗传修饰的非人动物不表达RAG(例如RAG1、RAG2)或IL2rg。

[0017] 在一些实施方案中,将人造血细胞移入免疫缺陷的经遗传修饰的非人动物以形成经遗传修饰且移入的非人动物。在一个实施方案中,人造血细胞选自人脐带血细胞、人胎肝细胞和人造血细胞系细胞。在一个实施方案中,人造血细胞是CD34+祖细胞。在一个实施方案中,人造血细胞是癌细胞。在某些实施方案中,癌细胞是人多发性骨髓瘤细胞。

[0018] 在一些实施方案中,经遗传修饰且移入的动物产生选自下述的人细胞:CD34+细胞、造血干细胞、造血细胞、髓样前体细胞、髓样细胞、树突细胞、单核细胞、粒细胞、嗜中性粒细胞、肥大细胞、胸腺细胞、T细胞、B细胞、浆细胞、血小板及其组合。在一个实施方案中,移入后1个月、2个月、3个月、4个月、5个月、6个月、7个月、8个月、9个月、10个月、11个月或12个月时存在人细胞。

[0019] 在一些实施方案中,经遗传修饰且移入的动物产生人血液-淋巴样系统,其包含人造血干细胞和祖细胞、人髓样祖细胞、人髓样细胞、人树突细胞、人单核细胞、人粒细胞、人嗜中性粒细胞、人肥大细胞、人胸腺细胞、人T细胞、人B细胞、人浆细胞和人血小板。在一个实施方案中,移入后4个月、5个月、6个月、7个月、8个月、9个月、10个月、11个月或12个月时存在人血液-淋巴样系统。

[0020] 在本发明的一些方面,提供了用于生成移入有人造血细胞的非人动物的方法。在一些实施方案中,提供了用于生成人免疫细胞形成和功能的动物模型的方法。在某些实施方案中,提供了用于生成人B细胞形成和功能的动物模型的方法。

[0021] 在一些实施方案中,方法包括将人造血细胞群体移植给经遗传修饰的非人动物,该经遗传修饰的非人动物是免疫缺陷的且表达与IL-6启动子可操作连接的编码人IL-6的核酸。在一些实施方案中,动物不表达天然IL-6。在一些实施方案中,IL-6启动子是非人动物IL-6启动子,而且人IL-6基因在非人动物IL-6基因座处与非人动物IL-6启动子可操作连接。在一些实施方案中,非人动物是啮齿类。在一些此类实施方案中,非人动物是小鼠。因而,在一些实施方案中,与编码人IL-6的核酸可操作连接的IL-6启动子是小鼠IL-6启动子,而且人IL-6基因在小鼠IL-6基因座处与小鼠IL-6启动子可操作连接。

[0022] 在一些实施方案中,移植的造血细胞群体包含CD34+细胞。在一些实施方案中,移植的造血细胞群体包含癌细胞。在一些实施方案中,移植的癌细胞群体包含多发性骨髓瘤细胞。在一些实施方案中,移植包括股骨内和/或胫骨内注射。

[0023] 在一些实施方案中,免疫缺陷的、经遗传修饰的动物表达至少一种选自下组的别的人核酸:与SIRPa启动子可操作连接的编码人SIRPa的核酸;与M-CSF启动子可操作连接的编码人M-CSF的核酸;与IL-3启动子可操作连接的编码人IL-3的核酸;与GM-CSF启动子可操作连接的编码人GM-CSF的核酸;和与TPO启动子可操作连接的编码人TPO的核酸。

[0024] 在本发明的一些方面,提供了表达与IL-6启动子可操作连接的编码人IL-6的核酸的移入的、经遗传修饰的非人动物,这些移入的非人动物已经依照本文中描述的方法或如本领域中已知的那样制备。在一些实施方案中,移入的、经遗传修饰的非人动物是人B细胞形成和分化的动物模型。

[0025] 在各个实施方案中,提供了涵盖使用本公开内容的移入有人造血细胞的、经遗传修饰的非人动物的方法。这些方法包括例如用于体内评估造血和免疫细胞的生长和分化的方法、用于体内评估人造血的方法、用于体内评估癌细胞的方法、用于体内评估免疫应答的方法、用于体内评估疫苗和疫苗接种方案的方法、用于测试调控癌细胞生长或存活的药剂的效果的方法、用于体内评估癌症治疗的方法、和用于体内生成和收集免疫介质(包括人抗体)及用于测试调控造血和免疫细胞功能的药剂的效果的方法。例如,在一些实施方案中,提供了用于对候选药剂筛选治疗造血系统癌的能力的方法。在一些实施方案中,方法包括使已经移入有人造血系统癌细胞的本公开内容的经遗传修饰的非人动物与候选药剂接触,并与不与候选药剂接触的类似移入的、经遗传修饰的非人动物中人造血系统癌细胞比较接触的移入的、经遗传修饰的非人动物中人造血系统癌细胞的存活力和/或增殖速率,其中接触的移入的非人动物中人造血系统癌细胞的存活力和/或增殖速率的降低指示候选药剂会治疗造血系统癌。这些和其它方法从本文中的公开内容看对于普通技术人员会是显而易见的。

## 附图简述

[0026] 在结合附图阅读时会更好地理解本发明的优选实施方案的以下详细描述。应当强调,依照惯例,附图的各个特征不是按比例的。相反,为了清楚,各个特征的尺寸是任意扩大或缩小的。为了例示本发明,在图中显示了目前优选的实施方案。然而,应当理解,本发明不限于图中显示的实施方案的精确排列和手段。附图中包括下述图。

[0027] 图1是一组图,描绘了证明人IL-6敲入小鼠中移入了INA-6细胞的实验结果。在静脉内移植 $5 \times 10^6$ 个INA-6细胞的指定基因型的小鼠中测量可溶性IL-6R水平。N指示每组移植小鼠的数目。

[0028] 图2(包括图2a到图2f)是一组图像,描绘了静脉内移入INA-6细胞后股骨的组织学分析。静脉内移入 $5 \times 10^6$ 个INA-6细胞后8周处死Rag2<sup>-/-</sup>I12rg<sup>无</sup>I16<sup>h/h</sup>hSIRPa+小鼠。将股骨在10%福尔马林中固定,并脱钙。将10 $\mu\text{m}$ 切片用甲苯胺蓝染色或使用Leica共焦显微镜直接分析GFP表达。

[0029] 图3是一组图像和一张图,描绘了静脉内移入INA-6细胞后肺的分析。在移入 $5 \times 10^6$ 个静脉内注射的INA-6细胞后8周处死Rag2<sup>-/-</sup>I12rg<sup>无</sup>I16<sup>h/h</sup>hSIRPa+小鼠。在10%福尔马林中

固定肺组织，并使用Leica共焦显微镜对10 $\mu\text{m}$ 切片直接分析GFP表达。图像(左边)描绘了切片的10倍(顶部)和63倍(底部)放大率。图像(右边)描绘了在指定组织中测量并相对于鼠hppt表达标准化的人I16基因表达。

[0030] 图4是一组图像，描绘了证明在人IL-6敲入小鼠中移入了INA-6细胞的实验结果。在股骨内移植5x10<sup>5</sup>个INA-6细胞的指定基因型的小鼠中测量可溶性IL-6R水平。每条线表示一只小鼠个体。

[0031] 图5是一组图像，描绘了股骨内移入INA-6个细胞后股骨的组织学分析。在移入5x10<sup>5</sup>个股骨内注射的INA-6细胞后4-6周处死Rag2<sup>-/-</sup>I12rg<sup>无</sup>I16<sup>h/h</sup>hSIRPa+小鼠。将股骨在10%福尔马林中固定，并脱钙。将10 $\mu\text{m}$ 切片用甲苯胺蓝染色。

[0032] 图6是一组图像和一张图，描绘了在INA-6移植后鼠股骨的 $\mu\text{CT}$ 分析的结果。在移入5x10<sup>5</sup>个股骨内注射的INA-6细胞后4周处死Rag2<sup>-/-</sup>I12rg<sup>无</sup>I16<sup>h/h</sup>hSIRPa+和对照小鼠。将股骨在70%乙醇中固定，并使用鼠 $\mu\text{CT}$ 分析。量化小梁骨和组织体积以计算骨与组织体积之间的比率。\*:根据Student t-检验为p<0.01。

[0033] 图7是一张图，描绘了在用抗骨髓瘤药物处理后鼠股骨的 $\mu\text{CT}$ 分析的结果。将5x10<sup>5</sup>个股骨内注射的INA-6细胞移入Rag2<sup>-/-</sup>I12rg<sup>无</sup>I16<sup>h/h</sup>hSIRPa+，并每两周分别用Velcade®或Zometa®处理。4周后，处死小鼠，并在70%乙醇中固定股骨以进行 $\mu\text{CT}$ 分析。量化小梁骨和组织体积以计算骨与组织体积之间的比率。

[0034] 图8是一组图，描绘了Rag2<sup>-/-</sup>I12rg<sup>无</sup>hSIRPa+ Tpo<sup>h/h</sup> Mcsf<sup>h/h</sup> I13/Gmcsf<sup>h/h</sup> I16<sup>h/h</sup>小鼠中原代细胞移入的FACS分析的结果。给小鼠移植1.5x10<sup>6</sup>个股骨内注射的、经CD3消减的骨髓细胞，并在12周后处死。自注射的股骨、并行的腿、和脾生成单细胞悬浮液。在mCD45、hCD19、hCD38、和hCD138方面染色细胞。FACS图显示了mCD45阴性细胞门控后的事件。数字表示CD38+CD138+细胞的频率。

[0035] 图9描绘了实验结果，评估通过流式细胞术测定的移入小鼠中人造血(hCD45+)细胞的百分比。水平棒表示相应的均值频率。

[0036] 图10描绘了实验结果，评估通过流式细胞术测定的移入小鼠中血液中B(CD19+)、T(CD3+)和髓样(CD33+)细胞的hCD45百分比。仅显示了具有高于2%的hCD45百分比的小鼠。

[0037] 图11(包括图11A和11B)描绘了实验结果，评估移入小鼠20周的BM、脾和胸腺中人CD45+细胞的百分比(A)和数目(B)。棒代表每组4/5只小鼠的平均值±SEM。

[0038] 图12(包括图12A和12B)描绘了评估人细胞的FACS实验的结果。(A)显示用于通过流式细胞术分开不同B细胞群体的门控策略的图。(B)20周龄小鼠中人CD45+CD19+细胞内不同B细胞子集的百分比。棒代表每组4/5只小鼠的平均值±SEM。

[0039] 图13(包括图13A和13B)描绘了评估人细胞的FACS实验的结果。(A)人胎肝(FL)和20周龄小鼠中CD5+ B细胞的代表性流式细胞术分析。象限中的数字表示细胞的百分比。所有图均是对人CD45+细胞门控的。(B)移入小鼠20周的BM和脾中人B细胞上的CD5百分比。棒代表每组4/5只小鼠的平均值±SEM。

[0040] 图14描绘了评估人细胞的FACS实验的结果。(A)人胎肝(FL)和20周龄小鼠中CD27+B细胞的代表性流式细胞术分析。象限中的数字表示细胞的百分比。所有图均是对人CD45+细胞门控的。(B)移入小鼠20周的BM和脾中人B细胞上的CD27百分比。棒代表每组4/5只小鼠的平均值±SEM。

[0041] 图15描绘了评估12(A)和20(B)周龄小鼠的血浆样品中总人IgM和IgG水平的实验结果。水平棒表示相应的几何均值。自分析排除具有低于2%的PB人移入的小鼠。

## 发明详述

[0042] 提供了经遗传修饰的非人动物,其可以用于对人造血细胞形成、功能或疾病建模。经遗传修饰的非人动物包含与IL-6启动子可操作连接的编码人IL-6的核酸。在一些实施方案中,表达人IL-6的经遗传修饰的非人动物还表达人M-CSF、人IL-3、人GM-CSF、人SIRPa或人TP0中至少一种。本发明还涉及生成本文中描述的经遗传修饰的非人动物的方法和使用本文中描述的经遗传修饰的非人动物的方法。在一些实施方案中,经遗传修饰的非人动物是小鼠。在一些实施方案中,将人造血细胞移入本文中描述的经遗传修饰的非人动物,所述人造血细胞包括正常细胞或新生物细胞,或其组合。在一些实施方案中,将人多发性骨髓瘤(MM)细胞移入本文中描述的经遗传修饰的非人动物。在各种实施方案中,移入有人造血细胞的本发明的经遗传修饰的非人动物可用于体内评估造血和免疫细胞的生长和分化,用于体内评估人造血,用于体内评估癌细胞,用于体内评估免疫应答,用于体内评估疫苗和疫苗接种方案,用于测试调控癌细胞生长或存活的药剂的效果,用于体内评估癌症的治疗,用于免疫介质(包括人抗体)的体内生成和收集,及用于测试调控造血和免疫细胞功能的药剂的效果。

[0043] 在阅读下文更加完整描述的组合物和方法的详情后,本发明的这些和其它目的、优点和特征对于本领域技术人员而言会变得显而易见。

## 0044] 定义

[0045] 除非另有定义,本文中使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员的通常理解相同的含义。在各种标准参考文献中发现此类术语的例示性定义和使用,包括J.Sambrook和D.W.Russell,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory Press,第4版,2012;F.M.Ausubel编,Short Protocols in Molecular Biology,Current Protocols,第5版,2002;B.Alberts等,Molecular Biology of the Cell,第4版,Garland,2002;D.L.Nelson和M.M.Cox,Lehninger Principles of Biochemistry,第4版,W.H.Freeman&Company,2004;及Herdewijn,P.(编),Oligonucleotide Synthesis:Methods and Applications,Methods in Molecular Biology,Human Press,2004。虽然可以在本发明的实施或测试中使用与本文中描述的方法和材料类似或等同的任何方法和材料,但是描述了优选的方法和材料。

[0046] 如本文中使用的,下述每项术语具有此部分中与其有关的意义。

[0047] 冠词“一个”和“一种”在本文中用于指一个/种或超过一个/种(即至少一个/种)该冠词的语法对象。举例而言,“一个/种元件”意指一个/种元件或超过一个/种元件。

[0048] 如本文中使用的,“约”在提及可测量的数值(诸如量、时间持续量等)时意图涵盖规定数值的±20%或±10%,更优选±5%,甚至更优选±1%,且仍更优选±0.1%的变化,因为此类变化对于实施公开的方法是合适的。

[0049] 术语“异常的”在生物体、组织、细胞或其成分的背景中使用时包括在至少一种可观察到的或可检出的特征(例如年龄、治疗、天数时间、等)上与那些展现“正常的”(预期的)相应特征的生物体、组织、细胞或其组分不同的那些生物体、组织、细胞或其组分。对于一种

细胞或组织类型而言正常或预期的特征对于一种不同细胞或组织类型而言可能是异常的。

[0050] 如本文中使用的,术语“抗体”包括能够特异性结合抗原上的特定表位的免疫球蛋白分子。抗体可以是天然来源或自重组来源衍生的完整免疫球蛋白,并且可以是完整免疫球蛋白的免疫反应性部分。本发明中的抗体可以以多种形式存在,包括例如多克隆抗体、单克隆抗体、胞内抗体(“内抗体”(intrabody))、Fv、Fab和F(ab)2,以及单链抗体(scFv)、重链抗体(诸如骆驼抗体)、和人源化抗体(Harlow等,1999,Using Antibodies:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY; Harlow等,1989, Antibodies:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor, New York; Houston等,1988, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85:5879-5883; Bird等,1988, Science 242:423-426)。

[0051] “组成性”表达包括基因产物在细胞的大多数或所有生理条件下在活细胞中生成的状态。

[0052] 基因的“编码区”包括分别与通过基因转录生成的mRNA分子的编码区同源或互补的基因的编码链的核苷酸残基和基因的非编码链的核苷酸。mRNA分子的“编码区”也包括mRNA分子中在mRNA分子的翻译期间与转运RNA分子的反密码子区匹配或编码终止密码子的核苷酸残基。如此,编码区可以包括构成不存在于由mRNA分子编码的成熟蛋白质中的氨基酸残基(例如蛋白质输出信号序列中的氨基酸残基)的密码子的核苷酸残基。

[0053] “疾病”包括动物的一种健康状态,其中动物不能维持稳态,且其中如果疾病没有改善,那么动物的健康不断恶化。

[0054] 比较而言,动物中的“病症”包括动物能够维持稳态,但是动物的健康状态不及其没有病症时有利的健康状态。保持不处理,病症不必然引起动物健康状态的进一步降低。

[0055] 如果疾病或病症的症状的严重性,患者经历此类症状的频率,或者这两者降低,那么疾病或病症是“减轻的”。

[0056] 化合物的“有效量”或“治疗有效量”包括足以对接受化合物施用的受试者提供有益效果的化合物量。投递媒介物的“有效量”包括足以有效结合或投递化合物的量。

[0057] “编码”包括多核苷酸(诸如基因、cDNA、或mRNA)中的特定序列核苷酸充当在生物学过程中合成其它聚合物和大分子的模板的固有特性,所述其它聚合物和大分子具有限定序列核苷酸(即rRNA、tRNA和mRNA)或限定序列氨基酸及源自其的生物学特性。如此,例如如果与基因对应的mRNA的转录和翻译在细胞或其它生物学系统中生成蛋白质,那么所述基因编码蛋白质。编码链(其核苷酸序列与mRNA序列相同,并且通常在序列表中提供)和非编码链(用作转录基因或cDNA的模板)两者可以称为编码蛋白质或所述基因或cDNA的其它产物。

[0058] 如本文中使用的,“内源”包括来自生物体、细胞、组织或系统内部或在生物体、细胞、组织或系统内部生成的任何材料。

[0059] 如本文中使用的,术语“外源”包括自生物体、细胞、组织或系统外部引入或在生物体、细胞、组织或系统外部生成的任何材料。

[0060] 如本文中使用的,术语“表达构建体”和“表达盒”包括含有期望的核酸人编码序列且含有一种或多种对于表达可操作连接的编码序列必需或期望的调节元件的双链重组DNA分子。

[0061] 如本文中使用的,术语“片段”在应用于核酸或多肽时包括较大的核酸或多肽的亚序列。核酸的“片段”可以是长度至少约15个核苷酸;例如,至少约50个核苷酸至约100个核

苷酸；至少约100至约500个核苷酸，至少约500至约1000个核苷酸，至少约1000个核苷酸至约1500个核苷酸；或约1500个核苷酸至约2500个核苷酸；或约2500个核苷酸(和中间的任何整数数值)。多肽的“片段”的长度可以是至少约15个氨基酸；例如至少约50个氨基酸至约100个氨基酸；至少约100至约500个氨基酸，至少约500至约1000个氨基酸，至少约1000个氨基酸至约1500个氨基酸；或约1500个氨基酸至约2500个氨基酸；或约2500个氨基酸(和中间的任何整数数值)。

[0062] 如本文中使用的，术语“基因”和“重组基因”包括包含编码多肽的可读框的核酸分子。此类天然的等位变异通常可以导致给定基因的核苷酸序列的1-5%变异。通过对许多不同个体中感兴趣的基因测序来鉴定备选等位基因。这可以通过使用杂交探针鉴定多个个体中的相同遗传基因座容易地实施。作为天然等位变异的结果且不改变功能活性的任何和所有此类核苷酸变异和所得的氨基酸多态性或变异意图在本发明的范围内。

[0063] 如本文中使用的，“同源的”包括两种聚合分子间，例如两种核酸分子(例如两种DNA分子或两种RNA分子)间或两种多肽分子间的亚基序列相似性。当两种分子两者中的亚基位置被相同的单体亚基占据时，例如如果两种DNA分子每种中的一个位置被腺嘌呤占据，那么它们在所述位置处是同源的。两种序列间的同源性是匹配或同源位置的数目的正函数，例如如果两种化合物序列中的半数(例如长度为10个亚基的聚合物中的5个位置)位置是同源的，那么两种序列是50%同源的，如果90%的位置(例如10个中的9个)是匹配或同源的，那么两种序列共享90%同源性。举例而言，DNA序列5' -ATTGCC-3' 和5' -TATGGC-3' 共享50%同源性。

[0064] 如本文中使用的，术语“人造造血干细胞和祖细胞”和“人HSPC”包括人自我更新多能造血干细胞和造血祖细胞。

[0065] “诱导型”表达包括基因产物响应细胞中的信号存在而在活细胞中生成的状态。

[0066] 如本文中使用的，“指导材料”包括可以用于传达试剂盒中本发明的化合物、组合物、载体、或投递系统用于实现本文所述各种疾病或病症的减轻的有用的出版物、记录、图、或任何其它表达介质。任选地或备选地，指导材料可以描述减轻哺乳动物细胞或组织中的疾病或病症的一种或多种方法。例如，本发明的试剂盒的指导材料可以附于装有本发明的鉴定的化合物、组合物、载体、或投递系统的容器或与装有鉴定的化合物、组合物、载体、或投递系统的容器一起运输。或者，指导材料可以与容器分开运输，以便接受者协同使用指导材料和化合物。

[0067] 术语“核酸”包括任何形式的(包括单链、双链，寡核苷酸或多核苷酸)具有超过一个核苷酸的RNA或DNA分子。术语“核苷酸序列”包括在核酸的单链形式中，寡核苷酸或多核苷酸中的核苷酸排序。

[0068] 如本文中使用的，术语“可操作连接的”包括与第二多核苷酸处于功能性关系中的多核苷酸，例如单链或双链核酸模块，其包含以如下的方式在核酸模块内排列的两种多核苷酸，使得两种多核苷酸中的至少一种能够对另一种施加其被表征的生理效应。举例而言，与基因的编码区可操作连接的启动子能够促进编码区的转录。优选地，在编码期望蛋白质的核酸进一步包含启动子/调节序列时，启动子/调节序列位于期望蛋白质编码序列的5'端，从而其驱动期望蛋白质在细胞中的表达。编码期望蛋白质的核酸和它的启动子/调节序列共同构成“转基因”。

[0069] 如本文中使用的,术语“多核苷酸”包括核苷酸的链。此外,核酸是核苷酸的聚合物。如此,如本文中使用的,核酸和多核苷酸可互换。本领域技术人员具有如下的一般知识,即核酸是多核苷酸,其可以水解成单体“核苷酸”。单体核苷酸可以水解成核苷。如本文中使用的,多核苷酸包括但不限于通过本领域中可用的任何手段获得的所有核酸序列,包括但不限于重组手段,即使用普通的克隆技术和PCR等等自重组文库或细胞基因组克隆核酸序列,及通过合成手段。

[0070] 如本文中使用的,术语“肽”、“多肽”和“蛋白质”可互换使用,并且包括由通过肽键共价连接的氨基酸残基构成的化合物。蛋白质或肽必须含有至少两个氨基酸,并且对可以构成蛋白质或肽序列的氨基酸的最大数目没有放置限定。多肽包括包含通过肽键彼此连接的两个或更多个氨基酸的任何肽或蛋白质。如本文中使用的,该术语包括短链(例如其在本领域中通常又称为肽、寡肽和寡聚物)和较长的链(其中有许多类型)两者。例如,“多肽”包括生物学活性片段、基本上同源的多肽、寡肽、同二聚体、异二聚体、多肽变体、经修饰的多肽、衍生物、类似物、融合蛋白、等等。多肽包括天然肽、重组肽、合成肽、或其组合。术语“肽”通常指短多肽。术语“蛋白质”通常指大多肽。

[0071] 如本文中使用的,术语“后代”包括子孙后代,并且包括自亲本细胞衍生的分化的或未分化的后代细胞。在一种用法中,术语后代包括与亲本遗传相同的后代细胞。在另一种使用中,术语后代包括与亲本遗传且表型相同的后代细胞。在又一种用法中,术语后代包括已经自亲本细胞分化的后代细胞。

[0072] 如本文中使用的,术语“启动子”包括与要转录的核酸序列(诸如编码期望分子的核酸序列)可操作连接的DNA序列。启动子一般位于要转录的核酸序列的上游,并且提供RNA聚合酶和其它转录因子特异性结合的位点。在特定的实施方案中,启动子一般位于转录的核酸序列的上游以生成期望的分子,并且提供RNA聚合酶和其它转录因子特异性结合的位点。

[0073] 范围:贯穿本公开内容,本发明的各个方面可以以范围形式呈现。应当理解,范围形式的描述仅仅为了方便和简短,并且不应解释为对本发明范围的硬性限制。因而,应当认为范围的描述具体公开所有可能的亚范围以及所述范围内的单个数值。例如,应当认为诸如1至6的范围的描述具体公开亚范围,诸如1至3、1至4、1至5、2至4、2至6、3至6等,以及所述范围内的单个数字,例如1、2、2.7、3、4、5、5.3、和6。不管范围的宽度如何这都适用。

[0074] “重组多肽”包括在表达重组多核苷酸后生成的多肽。

[0075] 如本文中使用的,术语“调节元件”包括控制核酸序列表达的一些方面的核苷酸序列。例示性的调节元件例示性包括增强子、内部核糖体进入位点(IRES)、内含子;复制起点、多聚腺苷酸化信号(pA)、启动子、增强子、转录终止序列、和上游调节域,其促成核酸序列的复制、转录、转录后加工。本领域普通技术人员能够仅用常规实验在表达构建体中选择和使用这些和其它调节元件。可以使用公知的方法重组或合成生成表达构建体。

[0076] 如本文中使用的,术语“特异性结合”就抗体而言包括识别特定抗原,但是基本上不识别或结合样品中的其它分子的抗体。例如,特异性结合来自一种物种的抗原的抗体也可以结合来自一种或多种物种的所述抗原。但是,此类跨物种反应性自身不改变抗体作为特异性的分类。作为另一个例子,特异性结合抗原的抗体也可以结合抗原的不同等位形式。然而,此类交叉反应性自身不改变抗体作为特异性的分类。

[0077] 在一些例子中,术语“特异性结合”可以提及抗体、蛋白质、或肽与第二化学种类的相互作用使用,指相互作用依赖于化学种类上特定结构(例如抗原决定簇或表位)的存在;例如,抗体识别并结合特定的蛋白质结构而非一般性蛋白质。若抗体对表位“A”是特异性的,则在含有经标记的“A”和抗体的反应中含有表位A的分子(或游离的、未标记的A)的存在会降低与抗体结合的经标记的A的量。

[0078] 如本文中使用的,术语“合成抗体”包括使用重组DNA技术生成的抗体,诸如通过噬菌体表达的抗体,如本文中描述的。该术语还应当解释为意指已经通过合成编码抗体的DNA分子(该DNA分子表达抗体蛋白质)生成的抗体,或规定抗体的氨基酸序列,其中已经使用本领域中可用且公知的合成DNA或氨基酸序列技术获得所述DNA或氨基酸序列。

[0079] “变体”在该术语在本文中使用时包括在序列上分别与参照核酸序列或肽序列不同,但是保留参照分子的必要生物学特性的核酸序列或肽序列。核酸变体的序列变化可以不改变由参照核酸编码的肽的氨基酸序列,或者可以导致氨基酸替代、添加、删除、融合和截短。肽变体的序列变化通常是有限的或保守的,从而参照肽和变体的序列总体上极其相似,且在许多区域中相同。变体和参照肽在氨基酸序列上可以相差任意组合的一处或多处替代、添加、删除。核酸或肽变体可以是天然存在的,诸如等位变体,或者可以是已知不天然存在的变体。可以通过诱变技术或通过直接合成来生成核酸和肽的非天然存在变体。

[0080] 术语“经遗传修饰的”包括其生殖细胞包含外源人核酸或人核酸序列的动物。作为非限制性例子,经遗传修饰的动物可以是转基因动物或敲入动物,只要动物包含人核酸序列。

[0081] 如本文中使用的,术语“转基因动物”包括包含整合入动物基因组中的外源人核酸序列的动物。

[0082] 如本文中使用的,“敲入”包括被靶向至非人动物基因组的特定染色体基因座,并且将感兴趣核酸插入该靶定基因座的遗传修饰。在一些例子中,遗传修饰用不同DNA序列替换非人动物中染色体基因座处编码的遗传信息。

#### [0083] 经遗传修饰的非人动物

[0084] 在本发明的一些方面,提供了表达人IL-6的经遗传修饰的非人动物。人IL-6(hIL6)意指184个氨基酸的蛋白质,其序列记载于例如Genbank登录号NM\_000600.3和NP\_000591.1。人IL-6是一种由例如T细胞、B细胞、单核细胞、巨噬细胞、成纤维细胞、角质形成细胞、内皮细胞和骨髓瘤细胞生成的分泌性蛋白质。IL-6经由包含结合亚基(IL-6R)和信号转导亚基(gp130)的细胞表面异二聚体受体复合物起作用。gp130是其它受体(诸如IL-11、IL-27、LIF的受体)的一种共同组分,而IL-6R主要限于肝细胞、单核细胞、活化的B细胞、静息T细胞和骨髓瘤细胞系。IL-6在造血中,在免疫应答中及在急性期反应中发挥中心作用,已经显示为是一种对于B细胞最终成熟为抗体分泌细胞(ASC),尤其对于T依赖性(TD)抗体应答中生发中心反应期间的成浆细胞扩充重要的因子。IL-6是体外T细胞增殖及体内细胞毒性T细胞(CTL)生成需要的,使它们对IL-2更具响应性。

[0085] 在本发明的一些方面,表达人IL-6的经遗传修饰的非人动物还表达至少一种选自下组的别的人蛋白质:人M-CSF、人IL-3、人GM-CSF、人TPO、和人SIRPa,或其任何组合。换言之,表达人IL-6的非人动物可以表达1、2、3、4或所有5种选自下组的人蛋白质:hM-CSF、hIL-3、hGM-CSF、hTPO、和hSIRPa。可用于设计主题非人动物或者可以生成主题非人动物的表达

hM-CSF、hIL-3、hGM-CSF、hTPO、和/或hSIRPa的经遗传修饰的非人动物是本领域中公知的，并且在例如美国申请No.US 2013/0042330和Rathinam等2011,Blood 118:3119-28(其披露了表达人M-CSF的敲入小鼠)；美国专利No.8,541,646和Willinger等2011,Proc Natl Acad Sci USA,108:2390-2395(其披露了表达人IL-3和人GM-CSF的敲入小鼠)；美国专利No.8,541,646和Rongvaux等2011,Proc Natl Acad Sci USA,108:2378-83(其披露了表达人TPO的敲入小鼠)；和PCT申请No.WO 2012/040207和Strowig等2011,Proc Natl Acad Sci USA 108 (32) :13218-13223(其披露了表达人Sirpa的转基因小鼠)(它们的全部公开内容通过提及收入本文)中极为详细讨论。

[0086] 在多个实施方案中，编码人蛋白质的核酸以如下的方式与一种或多种调节序列可操作连接，所述方式容许核酸转录成mRNA及mRNA翻译成人蛋白质。术语“调节序列”是本领域公认的，并且意图包括启动子、增强子和其它表达控制元件(例如多聚腺苷酸化信号)。此类调节序列是本领域技术人员已知的，并且记载于1990, Goeddel, Gene Expression Technology:Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, Calif. 在一个实施方案中，人核酸由人核酸的天然调节元件表达。在另一个实施方案中，人核酸由非人宿主动物的相应核酸的天然调节元件表达。

[0087] 如此，在一些实施方案中，编码人IL-6的核酸与非人动物的IL-6启动子可操作连接。在其它实施方案中，编码人IL-6的核酸与人IL-6启动子可操作连接。作为另一个例子，在一些实施方案中，编码人M-CSF的核酸与动物的M-CSF启动子可操作连接。在其它实施方案中，编码人M-CSF的核酸与人M-CSF启动子可操作连接。作为第三个例子，在一些实施方案中，编码人IL-3的核酸与动物的IL-3启动子可操作连接。在其它实施方案中，编码人IL-3的核酸与人IL-3启动子可操作连接。作为第四个例子，在一些实施方案中，编码人GM-CSF的核酸与动物的GM-CSF启动子可操作连接。在其它实施方案中，编码人GM-CSF的核酸与人GM-CSF启动子可操作连接。作为第五个例子，在一些实施方案中，编码人TPO的核酸与动物的TPO启动子可操作连接。在其它实施方案中，编码人TPO的核酸与人TPO启动子可操作连接。

[0088] 熟练技术人员会理解，本发明的经遗传修饰的动物包括自一种启动子表达至少一种人核酸的经遗传修饰的动物。可用于本发明的遍在表达启动子的非限制性例子包括但不限于DNA pol II启动子、PGK启动子、泛素启动子、清蛋白启动子、珠蛋白启动子、卵清蛋白启动子、SV40早期启动子、劳氏肉瘤病毒(RSV)启动子、逆转录病毒LTR和慢病毒LTR、 $\beta$ -肌动蛋白启动子、ROSA26启动子、热休克蛋白70(Hsp70)启动子、编码延长因子1 $\alpha$ 的EF-1 $\alpha$ 基因(EF1)启动子、真核启动因子4A(eIF-4A1)启动子、氯霉素乙酰基转移酶(CAT)启动子和CMV(巨细胞病毒)启动子。可用于本发明的启动子和增强子表达系统还包括诱导型和/或组织特异性表达系统。可用于本发明组合物和方法的表达构建体中的组织特异性启动子的非限制性例子包括造血系统中表达的基因的启动子，诸如IL-6启动子、M-CSF启动子、IL-3启动子、GM-CSF启动子、SIRPA启动子、TPO启动子、IFN- $\beta$ 启动子、威斯科特-奥尔德里奇综合征(Wiskott-Aldrich syndrome)蛋白(WASP)启动子、CD45(也称作白细胞共同抗原)启动子、Flt-1启动子、内皮糖蛋白(CD105)启动子和ICAM-2(胞内粘附分子2)启动子。可用于本发明组合物和方法中的这些和其它启动子是本领域中已知的，如Abboud等(2003, J.Histochem& Cytochem. 51:941-949), Schorpp等(1996, NAR 24:1787-1788), McBurney等(1994, Devel.Dynamics, 200:278-293)及Majumder等(1996, Blood 87:3203-3211)中例示的。在包

含启动子之外,本发明的多个实施方案中还包括一种或多种别的调节元件,诸如增强子元件或内含子序列。可用于本发明组合物和方法中的增强子的例子包括但不限于巨细胞病毒(CMV)早期增强子元件和SV40增强子元件。可用于本发明组合物和方法中的内含子序列的例子包括但不限于β珠蛋白内含子或通用内含子。可用于本发明的一些实施方案的其它别的调节元件包括但不限于转录终止序列和mRNA多聚腺苷酸化(pA)序列。

[0089] 熟练技术人员还应当领会,在天然存在的人核酸和氨基酸序列外,术语人核酸和人氨基酸还涵盖人核酸和氨基酸序列的变体。如本文中使用的,术语“变体”定义人的分离的天然存在遗传突变体或人的重组制备变异,它们与相应的野生型人相比各含有一处或多处突变。例如,此类突变可以是一处或多处氨基酸替代、添加、和/或删除。术语“变体”还包括非人直向同系物。在一些实施方案中,本发明的变体多肽与野生型人多肽具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性。

[0090] 使用本文中别处描述的技术测定两种序列间的百分比同一性。可以使用标准分子生物学技术(诸如定点诱变和PCR介导的诱变)来引入突变。本领域技术人员会认识到可以在不改变人蛋白质的功能特性的情况下引入一处或多处氨基酸突变。

[0091] 可以在人蛋白质中做出保守氨基酸替代以生成人蛋白质变体。保守氨基酸替代是公认的用一种氨基酸替代另一种具有相似特征的氨基酸。例如,每种氨基酸可以描述为具有一种或多种下述特征:电正性、电负性、脂肪族、芳香族、极性、疏水性和亲水性。保守替代是用一种具有规定的结构或功能特征的氨基酸替代另一种具有相同特征的氨基酸。酸性氨基酸包括天冬氨酸、谷氨酸;碱性氨基酸包括组氨酸、赖氨酸、精氨酸;脂肪族氨基酸包括异亮氨酸、亮氨酸和缬氨酸;芳香族氨基酸包括苯丙氨酸、甘氨酸、酪氨酸和色氨酸;极性氨基酸包括天冬氨酸、谷氨酸、组氨酸、赖氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、精氨酸、丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸;并且疏水性氨基酸包括丙氨酸、半胱氨酸、苯丙氨酸、甘氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、脯氨酸、缬氨酸和色氨酸;并且保守替代包括每组内氨基酸间的替代。氨基酸也可以就相对大小而言描述,通常认为丙氨酸、半胱氨酸、天冬氨酸、甘氨酸、天冬酰胺、脯氨酸、苏氨酸、丝氨酸、缬氨酸都是较小的。

[0092] 人变体可以包含合成的氨基酸类似物、氨基酸衍生物和/或非标准氨基酸,例示性包括但不限于 $\alpha$ -氨基丁酸、瓜氨酸、刀豆氨酸、氰丙氨酸、二氨基丁酸、二氨基庚二酸、二羟基苯丙氨酸、黎豆氨酸、高精氨酸、羟脯氨酸、正亮氨酸、正缬氨酸、3-磷酸丝氨酸、高丝氨酸、5-羟基色氨酸、1-甲基组氨酸、甲基组氨酸、和鸟氨酸。

[0093] 人变体由与编码野生型人的核酸具有高度同一性的核酸编码。编码人变体的核酸的互补物在高严格性条件下与编码野生型人的核酸特异性杂交。可以使用公知的方法分离或重组或合成生成编码人变体的核酸。

[0094] 在一些实施方案中,表达人核酸序列的经遗传修饰的非人动物还表达相应的非人动物核酸序列。例如,且如下文极为详细描述的,在某些实施方案中,将人核酸序列随机整合入非人动物的基因组中,例如使得动物在与编码相应非人动物蛋白质的非人动物基因座不同的基因座处包含外源人核酸序列。在其它实施方案中,表达人核酸序列的经遗传修饰的非人动物不表达相应的非人动物核酸序列。例如,且如下文极为详细描述的,在某些实施方案中,将编码人蛋白质的核酸引入动物中,从而替换编码相应非人动物蛋白质的基因组材料,使动物在相应的非人动物基因方面缺无且在相应的非人动物蛋白质方面缺陷。换言

之,非人动物对于人基因是“敲入”的。

[0095] 如此,在一些实施方案中,表达人IL-6的经遗传修饰的非人动物还表达非人动物IL-6。在其它实施方案中,表达人IL-6的经遗传修饰的非人动物不表达非人动物IL-6。作为第二个例子,在一些实施方案中,表达人M-CSF的经遗传修饰的非人动物还表达非人动物M-CSF。在其它实施方案中,表达人M-CSF的经遗传修饰的非人动物不表达非人动物M-CSF。作为第三个例子,在一些实施方案中,表达人IL-3的经遗传修饰的非人动物还表达非人动物IL-3。在其它实施方案中,表达人IL-3的经遗传修饰的非人动物不表达非人动物IL-3。作为第四个例子,在一些实施方案中,表达人GM-CSF的经遗传修饰的非人动物还表达非人动物GM-CSF。在其它实施方案中,表达人GM-CSF的经遗传修饰的非人动物不表达非人动物GM-CSF。作为第五个例子,在一些实施方案中,表达人TPO的经遗传修饰的非人动物还表达非人动物TPO。在其它实施方案中,表达人TPO的经遗传修饰的非人动物不表达非人动物TPO。

[0096] 在一些实施方案中,主题经遗传修饰的动物是免疫缺陷的。“免疫缺陷的”意指非人动物在其天然免疫系统的一个或多个方面是缺陷的,例如动物在一种或多种类型的发挥功能的宿主免疫细胞方面是缺陷的,例如在非人B细胞数目和/或功能、非人T细胞数目和/或功能、非人NK细胞数目和/或功能等方面是缺陷的。

[0097] 作为一个例子,免疫缺陷动物可以具有重度联合免疫缺陷(SCID)。SCID指一种以T细胞缺失和B细胞功能缺乏为特征的状况。SCID的例子包括:X连锁SCID,其以 $\gamma$ 链基因突变或IL2RG基因丧失和淋巴细胞表型T(-)B(+)NK(-)为特征;和常染色体隐性SCID,其特征在于Jak3基因突变和淋巴细胞表型T(-)B(+)NK(-)、ADA基因突变和淋巴细胞表型T(-)B(-)NK(-)、IL-7Ra-链突变和淋巴细胞表型T(-)B(+)NK(+)、CD3 $\delta$ 或 $\epsilon$ 突变和淋巴细胞表型T(-)B(+)NK(+)、RAG1/RAG2突变和淋巴细胞表型T(-)B(-)NK(+)、Artemis基因突变和淋巴细胞表型T(-)B(-)NK(+)、CD45基因突变和淋巴细胞表型T(-)B(+)NK(+)、和Prkdc<sup>scid</sup>突变(Bosma等(1989, *Immunogenetics* 29:54-56))和淋巴细胞表型T(-)B(-)、淋巴细胞减少症、和低球蛋白血症。因而,在一些实施方案中,经遗传修饰的免疫缺陷非人动物具有一种或多种选自下述的缺陷:IL2受体 $\gamma$ 链缺陷、ADA基因突变、IL7R突变、CD3突变、RAG1和/或RAG2突变、Artemis突变、CD45突变、和Prkdc突变。

[0098] 主题经遗传修饰的非人动物可以是遗传修饰为包含与IL-6启动子可操作连接的人IL-6编码序列的任何非人哺乳动物,例如实验室动物、家畜、牲畜等,例如诸如鼠、啮齿类、犬、猫、猪、马、牛、绵羊、非人灵长类等物种;例如小鼠、大鼠、家兔、仓鼠、豚鼠、牛、猪、绵羊、山羊、和其它转基因动物物种,特别是哺乳动物物种,如本领域中已知的。在某些实施方案中,主题经遗传修饰的动物是小鼠、大鼠或家兔。

[0099] 在一个实施方案中,非人动物是哺乳动物。在一些此类实施方案中,非人动物是小型哺乳动物,例如跳鼠总科(Dipodoidea)或鼠总科(Muroidea)的。在一个实施方案中,经遗传修饰的动物是啮齿类。在一个实施方案中,啮齿类选自小鼠、大鼠、和仓鼠。在一个实施方案中,啮齿类选自鼠总科。在一个实施方案中,经遗传修饰的动物来自选自下述的科:丽仓鼠科(Calomyscidae)(例如小鼠样仓鼠)、仓鼠科(Cricetidae)(例如仓鼠、新世界(New World)大鼠和小鼠、田鼠)、鼠科(Muridae)(真小鼠和大鼠、沙鼠、多刺小鼠(spiny mice)、鬃毛大鼠(crested rats))、马岛鼠科(Nesomyidae)(攀爬小鼠(climbing mice)、岩石小鼠(rock mice)、有尾大鼠(with-tailed rat)、马达加斯加(Malagasy)大鼠和小鼠)、刺山鼠

科(Platacanthomyidae)(例如多刺睡鼠(spiny dormice))、和麝鼠科(Spalacidae)(例如麝鼠(mole rats)、竹鼠(bamboo rat)、和麝鼠(zokors))。在一个具体的实施方案中,经遗传修饰的啮齿类选自真小鼠或大鼠(鼠科)、沙鼠、多刺小鼠、和鬃毛大鼠。在一个实施方案中,经遗传修饰的小鼠来自鼠科的成员。

[0100] 在一个实施方案中,主题经遗传修饰的非人动物是大鼠。在一个此类实施方案中,大鼠选自Wistar大鼠、LEA品系、Sprague Dawley品系、Fischer品系、F344、F6、和Dark Agouti。在另一个实施方案中,大鼠品系是选自下组的两种或更多种品系的混合物:Wistar、LEA、Sprague Dawley、Fischer、F344、F6、和Dark Agouti。

[0101] 在另一个实施方案中,主题经遗传修饰的动物是小鼠,例如C57BL品系的小鼠(例如C57BL/A、C57BL/An、C57BL/GrFa、C57BL/KaLwN、C57BL/6、C57BL/6J、C57BL/6ByJ、C57BL/6NJ、C57BL/10、C57BL/10ScSn、C57BL/10Cr、C57BL/01a等);129品系的小鼠(例如129P1、129P2、129P3、129X1、129S1(例如129S1/SV、129S1/SvIm)、129S2、129S4、129S5、129S9/SvEvH、129S6(129/SvEvTac)、129S7、129S8、129T1、129T2);BALB品系的小鼠(例如BALB/c);等等。参见例如Festing等(1999)Mammalian Genome 10:836,还可参见Auerbach等(2000)Establishment and Chimera Analysis of 129/SvEv-and C57BL/6-Derived Mouse Embryonic Stem Cell Lines。在一个具体的实施方案中,经遗传修饰的小鼠是前述129品系和前述C57BL/6品系的混合物。在另一个具体的实施方案中,小鼠是前述129品系的混合物,或前述BL/6品系的混合物。在一个具体的实施方案中,混合物的129品系是129S6(129/SvEvTac)品系。在又一个实施方案中,小鼠是BALB品系和另一种前述品系的混合物。

[0102] 如此,例如,在一些实施方案中,主题经遗传修饰的非人动物是免疫缺陷的小鼠,其是B细胞数目和/或功能、和/或T细胞数目和/或功能、和/或NK细胞数目和/或功能缺陷的(例如由于IL2受体 $\gamma_c$ 链缺陷(即 $\gamma_c^{-/-}$ )和/或RAG缺陷所致),并且具有如下的基因组,该基因组包含分别与其相应启动子(例如M-CSF、IL-3、GM-CSF、TP0或SIRPa启动子)可操作连接的人核酸(例如编码人IL-6、hM-CSF、hIL-3、hGM-CSF、hTP0、和/或hSIRPa的核酸),其中动物表达编码的人蛋白质。

[0103] 在某些具体的实施方案中,主题经遗传修饰的动物是免疫缺陷小鼠,其包含在小鼠IL-6基因座处与IL-6启动子可操作连接的编码人IL-6的核酸,和随机整合入非人动物基因组中的与人SIRPa启动子可操作连接的编码人SIRPa的核酸(即小鼠表达小鼠SIRPa),即免疫缺陷的hIL-6,hSirpa小鼠,例如Rag2 $^{-/-}$  IL2rg $^{-/-}$  IL-6 $^{h/+}$  hSIRPa $^+$ 小鼠或Rag2 $^{-/-}$  IL2rg $^{-/-}$  IL-6 $^{h/h}$  hSIRPa $^+$ 小鼠。在一些此类实施方案中,小鼠进一步包含与M-CSF启动子可操作连接的编码人M-CSF的核酸、与IL-3启动子可操作连接的编码人IL-3的核酸、与GM-CSF启动子可操作连接的编码人GM-CSF的核酸、和与TP0启动子可操作连接的编码人TP0的核酸,即免疫缺陷的hIL-6,hSirpa,hM-CSF,hIL-3,hGM-CSF,hTP0小鼠,例如Rag2 $^{-/-}$  IL2rg $^{-/-}$  IL-6 $^{h/+}$  M-CSF $^{h/+}$  IL-3 $^{h/+}$  GM-CSF $^{h/+}$  TP0 $^{h/+}$  hSIRPa $^+$ 小鼠,Rag2 $^{-/-}$  IL2rg $^{-/-}$  IL-6 $^{h/+}$  M-CSF $^{h/h}$  IL-3 $^{h/h}$  GM-CSF $^{h/h}$  TP0 $^{h/h}$  hSIRPa $^+$ 小鼠。

[0104] 在某些具体的实施方案中,主题经遗传修饰的动物是免疫缺陷小鼠,其包含与IL-6启动子可操作连接的编码人IL-6的核酸且在小鼠IL-6方面缺陷,随机整合入非人动物基因组中的与人SIRPa启动子可操作连接的编码人SIRPa的核酸(即小鼠仍表达小鼠SIRPa),与M-CSF启动子可操作连接的编码人M-CSF的核酸且在小鼠M-CSF方面缺陷,与IL-3启动子

可操作连接的编码人IL-3的核酸且在小鼠IL-3方面缺陷,与GM-CSF启动子可操作连接的编码人GM-CSF的核酸且在小鼠GM-CSF方面缺陷,和与TPO启动子可操作连接的编码人TPO的核酸且在小鼠TPO方面缺陷,即Rag2<sup>-/-</sup> IL2rg<sup>-/-</sup> IL-6<sup>h/h</sup> M-CSF<sup>h/h</sup> IL-3<sup>h/h</sup> GM-CSF<sup>h/h</sup> TPO<sup>h/h</sup>, hSIRPa+小鼠。

[0105] 生成经遗传修饰的非人动物的方法

[0106] 可以使用用于生成经遗传修饰的动物的任何方便方法来生成主题经遗传修饰的非人动物,例如如本领域中已知的或如本文中描述的。

[0107] 例如,可以将编码感兴趣人蛋白质(例如IL-6、hM-CSF、hIL-3、hGM-CSF、hTPO、或hSIRPa)的核酸以如下的形式掺入重组载体中,所述形式适合于插入宿主细胞基因组中并在非人宿主细胞中表达该人蛋白质。在各个实施方案中,重组载体包含以如下方式与编码人蛋白质的核酸可操作连接的一种或多种调节序列,所述方式容许将核酸转录成mRNA并将mRNA翻译成人蛋白质,如上文描述的。应当理解,载体的设计可以取决于诸如要转染的宿主细胞的选择、要表达的人蛋白质的量、和/或编码核酸会如何整合入非人宿主的基因组中等因素,例如如本领域中已知的。

[0108] 然后,可以使用多种方法之任一种来将人核酸序列导入动物细胞中以生成表达人基因的经遗传修饰的动物。此类技术是本领域中公知的,并且包括但不限于卵母细胞的原核显微注射、胚胎干细胞的转化、同源重组和敲入技术。可以使用的用于生成经遗传修饰的动物的方法包括但不限于那些记载于Sundberg和Ichiki (2006, Genetically Engineered Mice Handbook, CRC Press)、Hofker和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等 (2010, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 107:15022-15026)、及Gibson (2004, A Primer Of Genome Science第2版Sunderland, Massachusetts: Sinauer)、美国专利No. 6,586,251、Rathinam等 (2011, Blood 118:3119-28)、Willinger等 (2011, Proc Natl Acad Sci USA, 108:2390-2395)、Rongvaux等 (2011, Proc Natl Acad Sci USA, 108:2378-83) 及Valenzuela等 (2003, Nat Biot 21:652-659) 的。

[0109] 例如,可以通过将编码人蛋白质的核酸导入卵母细胞中(例如通过显微注射),并容许卵母细胞在雌性孕育动物中发育来创建主题经遗传修饰的动物。在优选的实施方案中,将包含人核酸序列的构建体注射入受精的卵母细胞中。可以在交配后那天自排卵过度的雌性收集受精的卵母细胞,并注射表达构建体。将注射后的卵母细胞培养过夜或直接转移入0.5天p.c.假孕雌性的输卵管中。用于排卵过度、收获卵母细胞、表达构建体注射和胚胎转移的方法是本领域中已知的,并且记载于Manipulating the Mouse Embryo (2002, A Laboratory Manual, 第3版, Cold Spring Harbor Laboratory Press)。可以通过DNA分析(例如PCR、Southern印迹、DNA测序、等)或者通过蛋白质分析(例如ELISA、Western印迹、等)对后代评估导入的核酸的存在。此类方法通常导致注射的核酸序列(在此情况中为包含编码感兴趣人蛋白质的核酸的构建体)随机整合入卵母细胞及因此非人动物的基因组中,即在与表达相应蛋白质的宿主动物中的基因座不同的基因座处。

[0110] 作为另一个例子,可以使用公知的方法(诸如电穿孔、磷酸钙沉淀、脂转染、等)将

包含编码人蛋白质的核酸的构建体转染入干细胞(ES细胞或iPS细胞)中。可以通过DNA分析(例如PCR、Southern印迹、DNA测序、等)或者通过蛋白质分析(例如ELISA、Western印迹、等)对细胞评估导入的核酸的存在。然后,可以将测定为已经掺入有表达构建体的细胞导入植入前胚胎中。关于可用于本发明组合物和方法的本领域中已知方法的详细描述参见Nagy等(2002, Manipulating the Mouse Embryo:A Laboratory Manual, 第3版, Cold Spring Harbor Laboratory Press)、Nagy等(1990, Development 110:815-821)、美国专利No.7,576,259、美国专利No.7,659,442、美国专利No.7,294,754、及Kraus等(2010, Genesis 48:394-399)。此类方法通常用于转染的核酸序列(在此情况中为包含编码感兴趣人蛋白质的核酸的构建体)靶向整合入干细胞及因此非人动物的基因组中。通常,此类方法导致用编码感兴趣人蛋白质的核酸替换宿主基因组材料,例如编码相应宿主蛋白质的基因组材料。

[0111] 可以使用经遗传修饰的建立者动物来培育别的携带遗传修饰的动物。可以将本公开内容的携带编码人蛋白质的核酸的经遗传修饰的动物与携带其它遗传修饰的其它经遗传修饰的动物,或与敲除动物(例如不表达一种或多种其基因的敲除动物)进一步育种。

[0112] 在一些实施方案中,经遗传修饰的免疫缺陷动物包含如下的基因组,该基因组包含与启动子可操作连接的编码人多肽的核酸,其中动物表达编码的人多肽。在各个实施方案中,经遗传修饰的免疫缺陷非人动物包含如下的基因组,该基因组包含如下的表达盒,该表达盒包含编码至少一种人多肽的核酸,其中核酸与启动子和多聚腺苷酸化信号可操作连接,并且进一步含有内含子,且其中动物表达编码的人多肽。

[0113] 如上文讨论的,在一些实施方案中,主题经遗传修饰的动物是免疫缺陷动物。同样地,可以使用用于生成经遗传修饰的动物的任何方便方法生成免疫缺陷且包含一种或多种人细胞因子(例如IL-6、M-CSF、IL-3、GM-CSF、TPO、和/或SIRPa)的经遗传修饰的非人动物,所述方法例如如本领域中已知的或如本文中描述的,例如表达构建体对植入前胚胎的DNA注射或者通过使用例如包含突变体SCID基因等位基因的干细胞(诸如胚胎干(ES)细胞或诱导的多能干(iPS)细胞,所述等位基因在纯合时会导致免疫缺陷,例如如上文和本文的实施例中极为详细描述的。然后,使用例如本文中描述和本领域中已知的方法用经修饰的卵母细胞或ES细胞生成小鼠,并交配以生成包含期望遗传修饰的免疫缺陷小鼠。作为另一个例子,可以在非免疫缺陷背景中生成经遗传修饰的非人动物,并与包含突变体SCID基因等位基因的动物杂交,并使后代交配以创建表达至少一种感兴趣人蛋白质的免疫缺陷动物,所述等位基因在纯合时会导致免疫缺陷。

[0114] 本发明的各个实施方案提供了在基本上所有其细胞中包含人核酸的经遗传修饰的动物,以及在一些但不是所有其细胞中包含人核酸的经遗传修饰的动物。在一些例子(例如靶向重组)中,1个拷贝的人核酸会整合入经遗传修饰的动物的基因组中。在其它例子(例如随机整合)中,人核酸的多个拷贝(彼此相邻或远离)可整合入经遗传修饰的动物的基因组中。

[0115] 如此,在一些实施方案中,主题经遗传修饰的非人动物可以是包含如下基因组的免疫缺陷动物,该基因组包含与相应非人动物启动子可操作连接的编码人多肽的核酸,其中动物表达编码的人多肽。换言之,主题经遗传修饰的免疫缺陷非人动物包含如下的基因组,该基因组包含如下的表达盒,该表达盒包含编码至少一种人多肽的核酸,其中核酸与相应非人启动子和多聚腺苷酸化信号可操作连接,且其中动物表达编码的人多肽。

**[0116] 效用**

[0117] 本发明的各个实施方案中提供的经遗传修饰的非人动物找到许多用途,包括例如用作造血细胞的生长和分化的模型、用于体内评估人造血、用于体内评估癌细胞、用于体内研究免疫应答、用于体内评估疫苗和疫苗接种方案、用于测试调控癌细胞生长或存活的药剂的效果、用于体内评估癌症治疗、用于免疫介质(诸如抗体)的体内生成和收集、及用于测试影响造血和免疫细胞功能的药剂的效果。

[0118] 为此,在一些例子中,将至少一种人造血细胞移入主题经遗传修饰的非人动物(“宿主”)。在一些实施方案中,提供了用于生成用于研究人造血系统的动物模型的方法,其包括将人造血细胞移入主题经遗传修饰的非人动物(“宿主”)中。在某些实施方案中,提供了用于将人造血细胞移入本文中公开的经遗传修饰的非人动物中的方法。

[0119] 在一些具体的例子中,将至少一种人多发性骨髓瘤细胞移入主题经遗传修饰的非人动物。在一些此类实施方案中,提供了用于生成用于癌症研究的动物模型的方法,其包括将人多发性骨髓瘤细胞移入主题经遗传修饰的非人动物中。在一些此类实施方案中,本发明是将人多发性骨髓瘤细胞移入主题经遗传修饰的非人动物中的方法。可用于本发明组合物和方法的移入人多发性骨髓瘤细胞包括任何人多发性骨髓瘤细胞。

[0120] 可用于移入主题经遗传修饰的非人动物的人造血细胞包括任何方便的人造血细胞。可用于本发明的人造血细胞的非限制性例子包括但不限于HSC、HSPC、白血病启动细胞(LIC)、和处于任何分化阶段的任何谱系的造血细胞,包括任何谱系的终末分化造血细胞。在一些例子中,人造血细胞是原代细胞,其中“原代细胞”、“原代细胞系”、和“原代培养物”在本文中可互换使用,包括短暂分离的细胞,或已经自受试者衍生且容许在体外生长以进行有限数目传代(即分拆)培养的细胞培养物。例如,原代培养物是可以已经传代0次、1次、2次、4次、5次、10次、或15次,但不是足以经历转换期的次数的培养物。在其它实施方案中,人造血细胞来自细胞系,也就是说,细胞来自永生化的培养物,例如它已经传代超过约15次。在一些例子中,移入的造血细胞包含健康细胞。在其它例子中,移入的造血细胞包含患病的造血细胞,例如癌性造血细胞,例如癌性效应B细胞,即多发性骨髓瘤细胞。在一些例子中,移入的造血细胞包含健康的和患病的细胞两者,例如健康B细胞和癌性效应B细胞、健康T细胞和癌性效应B细胞、等。

[0121] 可以自人供体的任何组织或位置(包括但不限于骨髓、外周血、肝、胎肝、或脐带血)衍生造血细胞(即原代细胞、自其生成的细胞系、等)。可以自任何人供体分离此类造血细胞,包括健康供体以及具有疾病(诸如癌症,包括白血病)的供体。在主题经遗传修饰的动物中移入造血细胞以移入动物中人造血细胞的存在为特征。在具体的实施方案中,在主题经遗传修饰的动物中移入造血细胞以与合适的对照动物相比在提供造血细胞的移入动物中已分化的人造血细胞的存在为特征。

[0122] 分离人造血细胞、对宿主动物施用人造血细胞和用于评估其移入的方法是本领域中公知的。可以自任何含有造血细胞的组织(诸如但不限于脐带血、骨髓、外周血、细胞因子或化学疗法动员的外周血和胎肝)获得用于对宿主动物施用的造血细胞(包括正常细胞和新生细胞,或其组合)。分离人造血细胞、对宿主动物施用人造血细胞、及评估宿主动物中的人造血细胞移入的例示性方法记载于本文及 Pearson 等 (2008, Curr. Protoc. Immunol. 81:1-15), Ito 等 (2002, Blood 100:3175-3182), Traggiai 等 (2004,

Science 304:104-107), Ishikawa等(2005, Blood 106:1565-1573), Shultz等(2005, J. Immunol. 174:6477-6489) 及Holyoake等(1999, Exp Hematol. 27:1418-27)。

[0123] 在本发明的一些实施方案中,自初始来源材料分离人造血细胞(包括正常细胞和新生物细胞,或其组合)以获得在特定造血细胞群体(例如HSC、HSPC、LIC、CD34<sup>+</sup>、CD34<sup>-</sup>、谱系特异性标志物、癌细胞标志物、等)方面富集的细胞群体。分离的造血细胞可以是或不是纯的群体。在一个实施方案中,对可用于本发明组合物和方法的造血细胞消减具有特定标志物的细胞。在另一个实施方案中,可以通过针对标志物的选择来富集可用于本发明组合物和方法的造血细胞。在一些实施方案中,可用于本发明组合物和方法的造血细胞是选择的细胞构成约1-100%细胞的细胞群体,尽管在某些实施方案中,也可以使用选择的细胞构成小于1%总细胞的细胞群体。在一个实施方案中,对可用于本发明组合物和方法的造血细胞消减具有特定标志物(诸如CD34)的细胞。在另一个实施方案中,通过针对标志物(诸如CD34)的选择来富集可用于本发明组合物和方法的造血细胞。在一些实施方案中,可用于本发明组合物和方法的造血细胞是CD34<sup>+</sup>细胞构成约1-100%细胞的细胞群体,尽管在某些实施方案中,也可以使用CD34<sup>+</sup>细胞构成小于1%总细胞的细胞群体。在某些实施方案中,可用于本发明组合物和方法的造血细胞是CD34<sup>+</sup>细胞构成约1-3%总细胞的T细胞消减细胞群体、CD34<sup>+</sup>细胞构成约50%总细胞的谱系消减细胞群体、或CD34<sup>+</sup>细胞构成约90%总细胞的CD34<sup>+</sup>正选择细胞群体。

[0124] 就在表达至少一种人基因的经遗传修饰的非人动物中产生人造血和/或免疫系统而言,认为造血细胞的施用数目不是限制性的。如此,作为非限制性例子,造血细胞的施用数目的范围可以为约 $1 \times 10^3$ 至约 $1 \times 10^7$ ,尽管在多个实施方案中,也可以使用更多或更少。作为另一个非限制性例子,HSPC的施用数目的范围在接受者是小鼠时可以为约 $3 \times 10^3$ 至约 $1 \times 10^6$ 个CD34<sup>+</sup>细胞,尽管在多个实施方案中,也可以使用更多或更少。对于其它物种的接受者,可以仅使用常规实验确定需要施用的细胞数目。

[0125] 例如,在一个实施方案中,将人造血细胞或人造血干细胞(HPSC)移入经遗传修饰且经处理的小鼠以形成经遗传修饰且移入的小鼠。在一个实施方案中,造血细胞选自人脐带血细胞和人胎肝细胞。在一个实施方案中,移入约 $1-2 \times 10^5$ 个人CD34<sup>+</sup>细胞。

[0126] 在一些例子中,施用造血细胞(例如正常的或新生物的)之前可以是条件化(conditioning),例如用高频电磁放射(一般使用 $\gamma$ 或X射线放射)对接受者动物的亚致死照射,或用放射模拟药物(诸如白消安(busulfan)或氮芥)处理。认为条件化减少宿主造血细胞的数目,创建适合于移入人造血细胞的微环境因素,和/或为人造血细胞移入创建微环境小生境。用于条件化的标准方法是本领域中已知的,诸如记载于本文及J.Hayakawa等,2009, Stem Cells, 27 (1) : 175-182的。在一个实施方案中,处理经遗传修饰的小鼠,从而消除可以存在于小鼠中的内源造血细胞。在一个实施方案中,处理包括照射经遗传修饰的小鼠。在一个具体的实施方案中,亚致死照射新生儿经遗传修饰的小鼠幼畜。在一个具体的实施方案中,以4小时时间间隔照射新生儿幼畜2次200cGy。

[0127] 可以通过经由各种路径(诸如但不限于静脉内、肝内、腹膜内、股骨内和/或胫骨内)的施用将造血细胞(例如正常的或新生物的)施用入新生儿或成年动物中。依照本发明的实施方案提供了用于在免疫缺陷动物中移入人造血细胞(包括正常细胞和新生物细胞,或其组合)的方法,其包括在施用造血细胞前照射或不照射动物的情况下对免疫缺陷动物

提供人造血细胞。依照本发明的实施方案提供了用于在免疫缺陷动物中移入人造血细胞的方法,其包括在施用造血细胞前在对动物施用或不施用放射模拟药物(诸如白消安或氮芥)的情况下对本发明的经遗传修饰的非人动物提供人造血细胞(包括正常细胞和新生物细胞,或其组合)。

[0128] 可以通过多种方法之任一种评估本发明的经遗传修饰的动物中的人造血细胞(包括正常细胞和新生物细胞,或其组合)移入,诸如但不限于在施用造血细胞后的一个或多个时间点时接受人造血细胞施用的动物中的细胞的流式细胞术分析。

[0129] 一般地,在超出施用的人造血细胞的寿命的时间点,经遗传修饰的非人动物中存在的人造血细胞(包括正常细胞和新生物细胞,或其组合)的数目(或百分比)大于对非人动物施用的人细胞的数目(或百分比)时,可以认为移入是成功的。例如,可以通过检测接受者动物中的人DNA,或者通过检测完整的人造血细胞,诸如通过检测人细胞标志物(诸如例如人CD45、人CD34、或sIL-6R)来实现对施用的造血细胞的后代的检测。将人造血细胞从第一接受者连续转移入第二接受者中及在第二接受者中移入人造血细胞是初级接受者中的移入的又一种任选测试。可以在施用人造血细胞后1-4个月时通过流式细胞术以血液、脾或骨髓中0.05%或更多的人CD45<sup>+</sup>细胞来检测移入。可以使用细胞因子(例如GM-CSF)动员干细胞,例如如记载于Watanabe (1997, Bone Marrow Transplantation 19:1175-1181) 的。

[0130] 在一个实施方案中,免疫缺陷的经遗传修饰且移入的动物产生选自下述的人细胞:CD34<sup>+</sup>细胞、造血干细胞、造血细胞、髓样祖细胞、髓样细胞、树突细胞、单核细胞、粒细胞、嗜中性粒细胞、肥大细胞、胸腺细胞、T细胞、B细胞、血小板、及其组合。在一个实施方案中,移入后4个月、5个月、6个月、7个月、8个月、9个月、10个月、11个月、或12个月时存在人细胞。

[0131] 在一个实施方案中,免疫缺陷的经遗传修饰且移入的动物产生人血液-淋巴样系统,其包含人造血干细胞和祖细胞、人髓样祖细胞、人髓样细胞、人树突细胞、人单核细胞、人粒细胞、人嗜中性粒细胞、人肥大细胞、人胸腺细胞、人T细胞、人B细胞、和人血小板。在一个实施方案中,移入后4个月、5个月、6个月、7个月、8个月、9个月、10个月、11个月、或12个月时存在人血液-淋巴样系统。

[0132] 在一个实施方案中,免疫缺陷的经遗传修饰且移入的动物产生人血液-淋巴样系统,其包含癌性人造血细胞,例如新生物浆(效应B)细胞。在一个实施方案中,移入后4周、6周、8周、12周、或超过12周时存在癌性人造血细胞。在某些实施方案中,移入后2周、4周、6周、8周、12周、或超过12周时存在癌性人造血细胞。

[0133] 一旦移入人造血细胞,主题经遗传修饰的非人动物在本领域中找到许多用途。例如,本公开内容的移入的经遗传修饰的动物可用于研究外周血中人造血细胞的功能。如实施例2中证明的,如下的经遗传修饰的小鼠支持比不表达人IL-6的免疫缺陷小鼠(即Rag2<sup>-/-</sup> IL2rg<sup>无</sup>小鼠)更好地将人造血细胞(例如CD34<sup>+</sup>祖细胞)移入外周血和脾中,所述经遗传修饰的小鼠是免疫缺陷的且包含在IL-6小鼠基因座处与IL-6启动子可操作连接的编码人IL-6的核酸(例如Rag2<sup>-/-</sup> IL2rg<sup>无</sup> IL-6<sup>h/h</sup>小鼠、Rag2<sup>-/-</sup> IL2rg<sup>无</sup> IL-6<sup>h/h</sup> hSIRPa<sup>+</sup>小鼠、和Rag2<sup>-/-</sup> IL2rg<sup>-/-</sup> IL-6<sup>h/h</sup> M-CSF<sup>h/h</sup> IL-3<sup>h/h</sup> GM-CSF<sup>h/h</sup> TP0<sup>h/h</sup>,hSIRPa<sup>+</sup>)。此外,这些经遗传修饰的小鼠比不表达人IL-6的免疫缺陷小鼠更有效地促进人造血细胞分化。例如,这些经遗传修饰的小鼠更好地促进CD5<sup>+</sup> B细胞和CD27<sup>+</sup> B细胞的分化。CD5是一种在称作B-1细胞的IgM分泌

性B细胞子集上找到的蛋白质，并且用来减弱来自B细胞受体的活化信号，从而B-1细胞仅能被非常强的刺激(诸如细菌蛋白质)而不被正常组织蛋白质活化。CD27是记忆B细胞的一种标志物。另外，这些经遗传修饰的小鼠支持比不表达人IL-6的免疫缺陷小鼠形成更好发挥功能的人造血细胞。例如，B细胞在这些经遗传修饰的小鼠中比在不表达人IL-6的免疫缺陷小鼠中更快速地分化成IgG分泌性浆细胞。因而，本公开内容的移入的经遗传修饰的动物在研究造血细胞形成和功能，且更特别地B淋巴细胞分化和功能中找到应用。

[0134] 作为另一个例子，本公开内容的移入的经遗传修饰的动物可用于研究造血系统癌症。如下文实施例1中证明的，免疫缺陷且包含在小鼠IL-6基因座处与IL-6启动子可操作连接的编码人IL-6的核酸的经遗传修饰的小鼠(例如Rag $^{2-/-}$  IL2rg<sup>无</sup> IL-6<sup>h/h</sup> 小鼠、Rag $^{2-/-}$  IL2rg<sup>无</sup> IL-6<sup>h/h</sup> hSIRPa<sup>+</sup> 小鼠、和Rag $^{2-/-}$  IL2rg<sup>无</sup> IL-6<sup>h/h</sup> M-CSF<sup>h/h</sup> IL-3<sup>h/h</sup> GM-CSF<sup>h/h</sup> TP0<sup>h/h</sup>，hSIRPa<sup>+</sup> 移入有原代人多发性骨髓瘤细胞和人多发性骨髓瘤细胞系的细胞，而不表达人IL-6的免疫缺陷小鼠(即Rag $^{2-/-}$  IL2rg<sup>无</sup> 小鼠)不然。经遗传修饰的宿主的人SIRPa表达进一步改善观察到的移入速率和程度。此外，将多发性骨髓瘤细胞直接移入本文中公开的这些免疫缺陷的经遗传修饰的小鼠的骨中再现通常与人多发性骨髓瘤有关的骨病理学，例如骨破坏和吸收，例如通过μCT扫描量化的。

[0135] 因而，本公开内容的移入的经遗传修饰的动物在筛选候选药剂以鉴定那些会治疗造血系统癌症的药剂找到应用。术语“治疗”、“处理”等在本文中使用一般包括获得期望的药理学和/或生理学效果。效果就完全或部分预防疾病或其症状而言可以是防范性的和/或就部分或完全治愈疾病和/或可归因于疾病的不利效应而言可以是治疗性的。如本文中使用的，“治疗/处理”包括对哺乳动物中的疾病的任何处理，并且包括：(a) 预防疾病在可以有疾病的素因但尚未诊断为具有它的受试者中发生；(b) 抑制疾病，即阻滞其发展；或(c) 减轻疾病，即引起疾病消退。作为造血系统癌症的治疗剂的兴趣候选药剂包括那些可以在癌症发作之前、期间或之后施用的。对进行中的疾病的治疗(其中治疗稳定或减少患者的不想要的临床症状)是特别感兴趣的。术语“个体”、“受试者”、“宿主”、和“患者”在本文中可互换使用，并且包括期望诊断、处理、或治疗的任何哺乳动物受试者，特别是人。

[0136] 作为另一个例子，本公开内容的移入的经遗传修饰的动物可用于研究人病原体，即感染人的病原体；人免疫系统对人病原体感染的应答；和药剂在针对人病原体感染提供保护和/或治疗人病原体感染中的有效性。病原体可以是病毒、真菌、细菌、等。病毒性病原体的非限制性例子包括人或猪或禽流感病毒。细菌性病原体的非限制性例子包括分枝杆菌(mycobacterium)，例如结核分枝杆菌(Mycobacterium tuberculosis, M. tuberculosis)，和肠细菌(enterobacterium)，例如伤寒沙门氏菌(Salmonella typhi, S. typhi)。用于用伤寒沙门氏菌感染小鼠及用于评估感染的方法的例子可以参见例如美国已公开申请No.2011/0200982，其公开内容通过提及收入本文。用于用结核分枝杆菌感染小鼠及用于评估感染的方法的例子可以参见例如美国已公开申请No.2011/0200982，其公开内容通过提及收入本文。不感染野生型小鼠，或者感染野生型小鼠但受感染小鼠不能模拟人响应病原体发起的免疫应答的人病原体的其它例子会是普通技术人员公知的。此类病原体感染的小鼠模型可用于研究，例如用以更好地了解人感染的进展。此类感染的小鼠模型也可用于药物发现，例如用以鉴定针对感染提供保护或治疗感染的候选药剂。

[0137] 本公开内容的移入的经遗传修饰的小鼠还提供了一种系统，可用于对候选药剂筛

选期望的体内活性,例如用以鉴定能够例如在健康或患病状态(例如作为癌性细胞),在病原体感染期间调控(即促进或抑制)造血细胞形成和/或活性(例如B细胞、T细胞、NK细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞、嗜曙红细胞、嗜碱性粒细胞等的活性)的药剂,例如用以鉴定新颖的治疗剂和/或对免疫系统的形成和功能的分子基础形成更好的了解;筛选对造血细胞(例如B细胞、T细胞、NK细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞、嗜曙红细胞、嗜碱性粒细胞等)及其祖先有毒性的药剂;及筛选防止、减轻、或逆转有毒药剂对造血细胞(例如B细胞、T细胞、NK细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞、嗜曙红细胞、嗜碱性粒细胞等)及其祖先的毒性影响的药剂;等等。作为一个例子,本公开内容的移入的经遗传修饰的动物提供了一种对于预测个体对疾病疗法的响应性有用的系统,例如通过提供用于筛选个体的免疫系统对药剂(例如治疗剂)的响应性的体内平台,用以预测个体对所述药剂的响应性。

[0138] 在生物学活性剂的筛选测定法中,使本公开内容的移入有人造血细胞的经遗传修饰的小鼠(例如移入的Rag2<sup>-/-</sup> IL2rg<sup>-/-</sup> IL-6<sup>h/h</sup> hSIRPa<sup>+</sup>小鼠、移入的Rag2<sup>-/-</sup> IL2rg<sup>-/-</sup> IL-6<sup>h/h</sup> M-CSF<sup>h/h</sup> IL-3<sup>h/h</sup> GM-CSF<sup>h/h</sup> TPO<sup>h/h</sup>,hSIRPa<sup>+</sup>小鼠等)与感兴趣的候选药剂接触,并通过监测一种或多种输出参数来评估候选药剂的效果。根据本领域中公知的方法,这些输出参数可以反映细胞的存活力,例如造血细胞的总数或特定造血细胞类型的细胞的数目,或细胞的凋亡状态,例如DNA片段化的量,细胞空泡化的量,细胞表面上磷脂酰丝氨酸的量等。或者/另外,输出参数可以反映细胞的分化能力,例如分化细胞的比例和分化细胞类型。或者/另外,输出参数可以反映细胞的功能,例如由细胞生成的细胞因子和趋化因子、由细胞生成的抗体(例如量或类型)、细胞归巢和溢出至攻击部位的能力、细胞在体外或在体内调控(即促进或抑制)其它细胞的活性的能力、等。其它输出参数可以反映由患病造血细胞诱导的损伤的程度,例如由多发性骨髓瘤细胞(multiple myeloid cells)诱导的骨破坏和吸收。根据与实施的研究的相关性,又一些参数可以反映药剂对感染的影响,例如动物中的病原体感染,例如小鼠中病原体的滴度,小鼠中肉芽肿的存在等。

[0139] 参数是细胞的可量化组分,特别是可以精确测量的组分(是高通量系统中所期望的)。参数可以是任何细胞组分或细胞产物,包括细胞表面决定簇、受体、蛋白质或其构象或翻译后修饰、脂质、碳水化合物、有机或无机分子、核酸(例如mRNA、DNA、等)或自此类细胞组分衍生的部分或其组合。虽然大多数参数会提供定量读出,在一些情况下,半定量或定量结果会是可接受的。读出可以包括单一测定数值,或者可以包括均值、中值或方差、等。特征性地,由于相同测定法的多重性会对每个参数获得一个范围的参数读出数值。预期变率,并且会使用标准统计学方法及用于提供单一数值的常用统计学方法获得测试参数集中每个的数值范围。

[0140] 用于筛选的兴趣候选药剂包括已知的和未知的化合物,其涵盖许多化学种类,主要是有机分子(其可以包括有机金属分子)、无机分子、遗传序列、疫苗、抗生素或怀疑具有抗生素特性的其它药剂、肽、多肽、抗体、已经批准用于人的药物的药剂、等。本发明的一个重要方面是评估候选药物,包括毒性测试;等等。

[0141] 候选药剂包括包含对于结构相互作用(特别是形成氢键)必需的官能团的有机分子,并且通常至少包含胺、羰基、羟基或羧基基团,通常至少两种官能性化学基团。候选药剂经常包含用一种或多种上述官能团取代的环状碳或杂环结构和/或芳香族或多芳香族结构。还在生物分子(包括肽、多核苷酸、糖、脂肪酸、类固醇、嘌呤、嘧啶、衍生物、结构类似物

或其组合)中找到候选药剂。包括的有药理学活性药物、遗传活性分子、等。感兴趣化合物包括化学治疗剂、激素或激素拮抗剂、等。适合于本发明的例示性药剂是那些记载于“*The Pharmacological Basis of Therapeutics*,”Goodman和Gilman,McGraw-Hill,New York, N.Y.,1996,第九版的。还包括毒素,和生物学和化学战剂,例如见Somani,S.M.(编),“*Chemical Warfare Agents*,”Academic Press,New York,1992。

[0142] 用于筛选的兴趣候选药剂还包括核酸,例如编码siRNA、shRNA、反义分子、或miRNA的核酸,或编码多肽的核酸。可用于将核酸转移入靶细胞中的许多载体是可得的。可以将载体以附加体维持,例如作为质粒、微环DNA、病毒衍生载体诸如巨细胞病毒、腺病毒、等,或者可以经由同源重组或随机整合将它们整合入靶细胞基因组中,例如逆转录病毒衍生载体诸如MMVL、HIV-1、ALV、等。可以直接对主题细胞提供载体。换言之,使多能细胞与包含感兴趣核酸的载体接触,使得载体被细胞摄取。

[0143] 用于使细胞(例如培养中的细胞或小鼠中的细胞)与核酸载体接触的方法(诸如电穿孔、氯化钙转染、和脂转染)是本领域中公知的。或者,可以经由病毒对细胞提供感兴趣核酸。换言之,使细胞与包含感兴趣核酸的病毒颗粒接触。逆转录病毒(例如慢病毒)特别适合于本发明的方法。常用的逆转录病毒载体是“有缺陷的”,即不能生成生产性感染需要的病毒蛋白质。相反,载体的复制需要在包装细胞系中生长。为了生成包含感兴趣核酸的病毒颗粒,通过包装细胞系将包含核酸的逆转录病毒核酸包装入病毒壳体中。不同包装细胞系提供要掺入壳体中的不同包膜蛋白,此包膜蛋白决定病毒颗粒对细胞的特异性。包膜蛋白属于至少三种类型,即同向性(ecotropic)、兼向性(amphotropic)和异向性(xenotropic)。包装有同向性包膜蛋白的逆转录病毒(例如MMVL)能够感染大多数鼠和大鼠细胞类型,并且通过使用同向性包装细胞系(诸如BOSC23)生成(Pear等(1993)P.N.A.S.90:8392-8396)。携带兼向性包膜蛋白的逆转录病毒(例如4070A(Danos等,见上文))能够感染大多数哺乳动物细胞类型,包括人、犬和小鼠,并且通过使用兼向性包装细胞系诸如PA12(Miller等(1985)Mol.Cell.Biol.5:431-437);PA317(Miller等(1986)Mol.Cell.Biol.6:2895-2902);GRIP(Danos等(1988)PNAS 85:6460-6464)生成。用异向性包膜蛋白(例如AKR env)包装的逆转录病毒能够感染大多数哺乳动物细胞类型,鼠细胞除外。可以使用合适的包装细胞系来确保感兴趣细胞(在一些例子中为移入细胞,在一些例子中为宿主(即经遗传修饰的动物)的细胞)被包装病毒颗粒靶向。

[0144] 用于对主题细胞提供感兴趣核酸的载体通常会包含适合于驱动感兴趣核酸表达(也就是转录活化)的启动子。这可以包括遍在起作用的启动子,例如CMV-β-肌动蛋白启动子,或诱导型启动子,诸如在特定细胞群体中有活性或者响应药物诸如四环素存在的启动子。转录活化意指转录会在靶细胞中在基础水平上升高至少约10倍,至少约100倍,更通常至少约1000倍。另外,用于对主题细胞提供再编程因子的载体可以包含后来必须去除的基因(例如使用重组酶系统诸如Cre/Lox),或破坏表达它们的细胞的基因(例如通过纳入容许选择性毒性的基因,诸如疱疹病毒TK,bcl-xs、等)。

[0145] 用于筛选的兴趣候选药剂还包括多肽。任选地,可以将此类多肽与提高产物溶解度的多肽域融合。可以经由限定的蛋白酶切割位点(例如TEV序列,其受到TEV蛋白酶切割)将该域与多肽连接。接头还可以包含一个或多个柔性序列,例如1至10个甘氨酸残基。在一些实施方案中,在维持产物溶解度的缓冲液中,例如在0.5至2M尿素存在下、在提高溶解

度的多肽和/或多核苷酸存在下、等等情况下实施对融合蛋白的切割。感兴趣的域包括内体裂解域(endosomolytic domain),例如流感HA域;和帮助生成的其它多肽,例如IF2域、GST域、GRPE域、等。另外/或者,可以配制此类多肽以实现改善的稳定性。例如,可以将肽PEG化,其中聚乙烯氧基基团提供血流中延长的寿命。可以将多肽与另一种多肽融合以提供添加的功能性,例如提高体内稳定性。一般地,此类融合配偶体是一种稳定的血浆蛋白质,其在作为融合物存在时可以例如延长多肽的体内血浆半衰期,特别是此类稳定的血浆蛋白质是免疫球蛋白恒定域的情况。在大多数情况中(其中稳定的血浆蛋白质通常以多聚体形式找到,例如免疫球蛋白或脂蛋白,其中相同或不同多肽链通常是二硫化物和/或非共价连接的,以形成装配的多链多肽),也会以与稳定的血浆蛋白质前体具有基本上相同结构的多聚体生成和采用含有多肽的本文融合物。这些多聚体就它们包含的多肽药剂而言会是同质的,或者它们可以含有超过一种多肽药剂。

[0146] 候选多肽药剂可以自真核细胞生成,或者可以由原核细胞生成。可以通过解折叠(例如热变性、DTT还原、等)将其进一步加工,并且可以使用本领域中已知的方法进一步重折叠。不改变一级序列的兴趣修饰包括多肽的化学衍生化,例如酰化、乙酰化、羧化、酰胺化、等。还包括糖基化修饰,例如那些通过在其合成和加工期间或在进一步的加工步骤中修饰多肽的糖基化样式进行的;例如通过将多肽暴露于影响糖基化的酶,诸如哺乳动物糖基化或者去糖基化酶。还包括具有磷酸化氨基酸残基(例如磷酸酪氨酸、磷酸丝氨酸、或磷酸苏氨酸)的序列。可以使用普通的分子生物学技术和合成化学修饰多肽,从而改善其对蛋白水解降解的抗性或优化溶解度特性或使它们更适合作为治疗剂。此类多肽的类似物包括那些含有与天然存在L-氨基酸不同的残基(例如D-氨基酸或非天然存在合成氨基酸)的。可以用D-氨基酸替代一些或所有氨基酸残基。

[0147] 可以使用本领域中已知的常规方法通过体外合成制备候选多肽药剂。多种商业合成装置是可得的,例如Applied Biosystems, Inc.、Beckman、等的自动化合合成仪。通过使用合成仪,可以用非天然的氨基酸替代天然存在的氨基酸。特定的序列和制备方式会由便利、经济效果、需要的纯度、等决定。或者,可以依照重组合成的常规方法分离和纯化候选多肽药剂。可以制备表达宿主的裂解物,并使用HPLC、排阻层析、凝胶电泳、亲和层析、或其它纯化技术纯化裂解物。在很大程度上,关于与产品制备及其纯化的方法相关的污染物,使用的组合物会包含按重量计至少20%的期望产物,更通常按重量计至少约75%,优选地按重量计至少约95%,且对于治疗目的,通常按重量计至少约99.5%。通常,百分比会基于总蛋白质。

[0148] 在一些情况中,要筛选的候选多肽药剂是抗体。术语“抗体”或“抗体模块”意图包括具有适合并识别表位的特定形状的任何含有多肽链的分子结构,其中一种或多种非共价结合相互作用稳定分子结构和表位之间的复合物。给定结构与其特定表位的特异性或选择性适合有时称为“锁匙”适合。原型抗体分子是免疫球蛋白,并且认为来自所有来源(例如人、啮齿类、家兔、牛、绵羊、猪、犬、其它哺乳动物、鸡、其它鸟类、等)的所有类型的免疫球蛋白(IgG、IgM、IgA、IgE、IgD等)是“抗体”。本发明中利用的抗体可以是多克隆抗体或单克隆抗体。通常在培养细胞的培养基中提供抗体。在下文极为详细讨论抗体生成和筛选。

[0149] 可以从极其多种来源(包括合成或天然化合物的文库)获得候选药剂。例如,许多手段可用于随机和定向合成极其多种有机化合物,包括生物分子,包括表达随机化的寡核

昔酸和寡肽。或者，细菌、真菌、植物和动物提取物形式的天然化合物的文库是可得的或容易生成的。另外，经由常规化学、物理和生物化学手段容易修饰天然或合成生成的文库和化合物，并且可以用于生成重组文库。可以将已知的药理学药剂进行定向或随机化学修饰，诸如酰化、烷基化、酯化、酰胺化(amidification)、等以生成结构类似物。

[0150] 如下对候选药剂筛选生物学活性，即对至少一份和通常多份样品施用药剂，有时与缺乏药剂的样品一起。测量响应药剂的参数变化，并且通过与用其它药剂等获得的参照培养物(例如在药剂存在和缺乏下)比较来评估结果。在实施筛选以鉴定会预防、减轻或逆转毒性药剂的作用的候选药剂的情况下，通常在毒性药剂存在下实施筛选，其中在最适合于要测定的结果的时间时添加毒性药剂。例如，在测试候选药剂的保护/预防能力的情况下，可以在毒性药剂之前，与毒性药剂同时，或者在用毒性药剂处理后添加候选药剂。作为另一个例子，在测试候选药剂逆转毒性药剂作用的能力的情况下，可以在用毒性药剂处理后添加候选药剂。如上文提及的，在一些情况中，“样品”是已经移入有细胞的经遗传修饰的非人动物，例如对已经移入有人造血细胞的免疫缺陷动物(例如小鼠)提供候选药剂，所述免疫缺陷动物包含与IL-6启动子可操作连接的编码人IL-6的核酸。在一些例子中，样品是要移入的人造血细胞，即在移入免疫缺陷的经遗传修饰的动物前对细胞提供候选药剂。

[0151] 若要直接对移入的经遗传修饰的动物施用候选药剂，则可以通过用于对小鼠施用肽、小分子和核酸的本领域中的许多公知方法之任一种施用药剂。例如，可以口服、粘膜、表面、皮内、或者通过注射，例如腹膜内、皮下、肌肉内、静脉内、或颅内注射等施用药剂。可以在缓冲液中施用药剂，或者可以将它掺入多种制剂之任一种中，例如通过与合适的药学可接受媒介物组合进行。“药学可接受媒介物”可以是得到联邦或州政府的管理机构批准或美国药典或其它公认的用于哺乳动物(诸如人)的药典中列出的媒介物。术语“媒介物”指为了对哺乳动物施用而配制本发明化合物的稀释剂、佐剂、赋形剂、或载体。此类药用媒介物可以是脂质，例如脂质体，例如脂质体树状聚合物，液体，诸如水和油，包括石油、动物、植物或合成起源的，诸如花生油、大豆油、矿物油、芝麻油等，盐水；阿拉伯树胶、明胶、淀粉糊、滑石、角蛋白、胶体硅土、尿素、等。另外，可以使用辅助、稳定、增稠、润滑和着色剂。可以将药物组合物配制成固体、半固体、液体或气体形式的制剂，诸如片剂、胶囊剂、粉剂、颗粒剂、软膏剂、溶液剂、栓剂、注射液、吸入剂、凝胶剂、微球剂、和气雾剂。药剂在施用后可以是系统性的或者可以通过使用区域性施用、壁内施用、或使用作用为在植入部位处保留活性剂量的植入物局部化。可以配制活性剂以实现立即活性或者可以将其配制以实现持续释放。对于一些状况，特别是中枢神经系统状况，可能有必要配制药剂以穿越血脑屏障(BBB)。一种用于穿过血脑屏障(BBB)的药物投递的策略需要破坏BBB，通过渗透手段诸如甘露醇或白三烯，或以生物化学方式通过使用血管活性物质诸如缓激肽进行。在通过血管内注射施用组合物时，可以与药剂共施用BBB破坏剂。穿过BBB的其它策略可需要使用内源转运系统，包括蛋白-1介导的转胞吞、载体介导的转运蛋白诸如葡萄糖和氨基酸载体、受体介导的胰岛素或转铁蛋白转胞吞、和主动流出转运蛋白诸如p-糖蛋白。还可以将主动转运模块与本发明中使用的治疗性化合物缀合以促进转运穿过血管的内皮壁。或者，在BBB后药剂的药物投递可以通过局部投递，例如通过鞘内投递，例如经由Ommaya储器(参见例如美国专利No. 5,222,982和5,385,582，通过提及将它们收入本文)；通过推注，例如通过注射器，例如玻璃体内或颅内；通过连续输注，例如通过套管插入术，例如用对流(参见例如美国申请

No. 20070254842, 通过提及将其收入本文); 或者通过植入其上已经可逆性附加药剂的装置(参见例如美国申请No. 20080081064和20090196903, 通过提及将其收入本文)。

[0152] 若在移入前对细胞提供药剂, 则将药剂在溶液, 或容易可溶形式中方便地添加至培养中的细胞的培养基。可以在流过系统中作为流(间断或连续), 或者添加化合物推注(单次或递增) 将药剂添加至其它情况下静态的溶液。在流过系统中, 使用两种流体, 其中一种是生理学中性溶液, 而另一种是与添加的测试化合物相同的溶液。将第一种流体通过细胞, 接着是第二种。在一种单一溶液方法中, 将测试化合物的推注添加至细胞周围的培养基体积。培养基的组分的总体浓度不应随推注的添加或者在流过方法中的两种溶液间显著变化。

[0153] 可以用不同药剂浓度平行运行多个测定法以获得对各种浓度的差异响应。如本领域中已知的, 测定药剂的有效浓度通常使用源自1:10, 或其它对数比例稀释的浓度范围。在必要时, 可以用第二个稀释系列进一步细化浓度。通常, 这些浓度中的一种充当阴性对照, 即处于0浓度或低于药剂的检测水平或者处于或低于没有给出表型的可检测变化的药剂浓度。

[0154] 可以在用药剂处理后的任何时间时实施移入的经遗传修饰的动物中的细胞对候选药剂的响应的分析。例如, 可以在与候选药剂接触后1、2、或3天, 有时4、5、或6天, 有时8、9、或10天, 有时14天, 有时21天, 有时28天, 有时1个月或更多, 例如2个月、4个月、6个月或更多分析细胞。在一些实施方案中, 分析包括在多个时间点时的分析。为分析选择时间点会基于要实施的分析类型, 如普通技术人员会容易理解的。

[0155] 分析可以包括测量本文中描述的或本领域中已知的任何参数以测量细胞存活力、细胞增殖、细胞身份、细胞形态学、和细胞功能, 特别是在它们可以属于免疫细胞的细胞时。例如, 可以使用流式细胞术来测定造血细胞的总数目或特定造血细胞类型的细胞数目。可以实施组织化学或免疫组织化学以测定细胞的凋亡状态, 例如末端脱氧核苷酸转移酶dUTP切口末端标记(TUNEL) 以测量DNA片段化, 或免疫组织化学以检测膜联蛋白V对细胞表面上磷脂酰丝氨酸的结合。也可以采用流式细胞术来评估分化细胞类型和分化细胞的比例, 例如用以测定造血细胞在药剂存在下分化的能力。可以实施ELISA、Western、和Northern印迹以测定移入的经遗传修饰的小鼠中表达的细胞因子、趋化因子、免疫球蛋白等的水平, 例如用以评估移入细胞的功能、评估癌性浆细胞的存活、等。可以实施 $\mu$ CT扫描以测定由患病造血细胞诱导的损伤程度, 例如由多发性骨髓瘤细胞诱导的骨破坏和吸收。也可以实施测试免疫细胞功能的体内测定法, 以及与感兴趣的特定疾病或病症(诸如糖尿病、自身免疫性疾病、移植植物抗宿主病、AMD、等) 相关的测定法。参见例如Current Protocols in Immunology (Richard Coico编, John Wiley&Sons, Inc. 2012) 及Immunology Methods Manual (I.Lefkovits编, Academic Press 1997), 其公开内容通过提及收入本文。

[0156] 因此, 例如提供了用于测定药剂对多发性骨髓瘤的影响的方法, 其包括对已经移入有人多发性骨髓瘤细胞的人源化IL-6小鼠(例如Rag $^{2-/-}$  IL2rg $^{-/-}$  IL-6 $^{h/h}$ 小鼠)施用药剂; 在药剂存在下随时间测量多发性骨髓瘤细胞的存活力和/或增殖能力的参数; 并比较所述测量与自没有暴露于所述药剂的移入人源化IL-6小鼠的测量。若在单次施用或在选定时间里两次或更多次施用药剂后药剂将小鼠的血液或组织中的多发性骨髓瘤细胞的增殖或数目降低至少20%、30%、40%或更多, 在一些情况下50%、60%、70%或更多, 例如80%、

90%或100%，即至检测不到的量，则它测定为抗癌性的。在一个具体的实施方案中，在移入多发性骨髓瘤细胞后至少1周、10天、2周、3周、或4周施用药物或药物组合。

[0157] 在本文中别处提供了主题小鼠用途的其它例子。本公开内容中描述的经遗传修饰且移入的小鼠的别的应用在阅读本公开内容后对于本领域技术人员会是显而易见的。

[0158] 人抗体生成

[0159] 还提供了可用于自本文中别处描述的移入的免疫缺陷的动物生成人单克隆抗体的组合物和方法。在多个实施方案中，该方法包括使免疫缺陷的动物与人造血细胞接触以生成移植有免疫系统的非人动物(移入动物)，随后使移入动物与抗原接触，自移入动物收集生成针对抗原的人抗体的人细胞，并自抗体生成细胞分离抗体。

[0160] 在多个实施方案中，本发明包括一种方法，其包括通过转化方法(例如EBV)或细胞融合方法(例如杂交瘤)建立抗体生成细胞(例如人B细胞)。优选地，抗体生成细胞能够在合适的细胞培养条件下维持至少约50代。

[0161] 在多个实施方案中，移入动物是非人哺乳动物。在一些实施方案中，移入动物是小鼠、大鼠或家兔。

[0162] 在本发明的多个实施方案中，人造血细胞是自人胎肝、骨髓、脐带血、外周血、或脾样品获得的CD34+细胞。

[0163] 在多个实施方案中，抗原是下述至少一种：肽、多肽、MHC/肽复合物、DNA、活病毒、死病毒或其部分、活细菌、死细菌或其部分、或癌细胞或其部分。

[0164] 在一些实施方案中，在使移入动物与人造血细胞接触后1-5个月使动物与抗原接触。在一些实施方案中，使移入动物仅与抗原接触一次，而在其它实施方案中，使移入动物与抗原接触2、3、4、5、6、7、8或更多次。

[0165] 在一个实施方案中，自移入动物收集的人抗体生成细胞是B细胞。在多个实施方案中，自动物收集的人抗体生成细胞在其表面上表达下述至少一项：CD19、CD20、CD22、和CD27。可以通过自动物取出免疫系统的任何合适的细胞组分来回收本发明的人抗体生成细胞。在多个实施方案中，可以通过取出脾、淋巴结、外周血、骨髓或其部分中至少一种自移入动物取出抗体生成细胞。

[0166] 在多个实施方案中，本发明的方法使用合适融合配偶采用常规杂交瘤技术。在多个实施方案中，融合配偶是至少一种选自下组的细胞：MOPC21、P3X63AG8、SP2/0、NS-1、P3.X63AG8.653、F0、S194/5.XX0.BU-1、FOX-NY、SP2/0-Ag14、MEG-01、HEL、UT-7、M07e、MEG-A2、和DAMI，和自这些细胞衍生的细胞系。

[0167] 自本发明的移入动物分离抗体的方法是本领域中公知的。可以依照本领域中已知的方法(诸如举例而言层析和透析)实施自抗体生成细胞、抗体生成细胞在其中培养的培养基、和/或移入动物的腹水分离抗体。在其它多个实施方案中，可以使用下述一项或多项来分离抗体：免疫亲和纯化、硫酸铵沉淀、蛋白A/G纯化、离子交换层析和凝胶过滤。此类方法记载于Nau(1989, Optimization of monoclonal antibody purification,于: Techniques in Protein Chemistry, Hugli, T. (编), Academic Press, New York) 和Coligan等(2005, Current Protocols in Immunology, John Wiley&Sons, Inc.)。

[0168] 可以通过本领域中已知的任何合适的手段对移入动物施用抗原。在多个实施方案中，可以通过下述至少一项对移入动物施用抗原：脾内、静脉内、腹膜内、皮内、肌肉内、和皮

下。在一些实施方案中，单独施用抗原，而在其它实施方案中，与合适的免疫调控剂或佐剂组合施用抗原。可用于本发明方法的佐剂的例子包括但不限于完全弗氏佐剂(CFA)、不完全弗氏佐剂(IFA)、和明矾( $\text{Al}_3(\text{OH})_4$ )。

[0169] 试剂和试剂盒

[0170] 还提供了用于实施一种或多种上文描述的方法的试剂及其试剂盒。主题试剂及其试剂盒可以很大地变化。在一些实施方案中，试剂或试剂盒会包含用于生成和/或维持主题经遗传修饰的非人动物的一种或多种药剂。例如，试剂盒可以包括包含与IL-6启动子可操作连接的编码人IL-6的核酸和与SIRPa启动子可操作连接的编码人SIRPa的核酸的免疫缺陷小鼠；或包含与IL-6启动子可操作连接的编码人IL-6的核酸且进一步包含与M-CSF启动子可操作连接的编码人M-CSF的核酸；与IL-3启动子可操作连接的编码人IL-3的核酸；与GM-CSF启动子可操作连接的编码人GM-CSF的核酸；与TP0启动子可操作连接的编码人TP0的核酸；和/或与SIRPa启动子可操作连接的编码人SIRPa的核酸的小鼠。试剂盒可以包含用于育种此类小鼠的试剂，例如用于对人IL-6基因、人M-CSF基因、人IL-3基因、人GM-CSF基因、人SIRPa基因、和/或人TP0基因测定基因型的引物、PCR缓冲液、 $\text{MgCl}_2$ 溶液、等。

[0171] 在一些实施方案中，试剂或试剂盒会包含用于移入主题经遗传修饰的非人动物的一种或多种试剂，例如用于移植入主题经遗传修饰的非人动物中的人造血细胞、富集的人造血祖细胞群体、造血细胞系、新生物性造血细胞系等，或用于制备用于移植入主题经遗传修饰的非人动物中的造血细胞群体、来自人的富集造血祖细胞群体、造血细胞系、新生物性造血细胞系等的试剂。

[0172] 在一些实施方案中，试剂或试剂盒会包含用于测定造血细胞的存活力和/或功能(例如在候选药剂存在/缺乏下)的试剂，例如对由不同类型的造血细胞表达的标志物特异性的一种或多种抗体，或用于检测特定细胞因子、趋化因子等的试剂。其它试剂可以包含培养基、培养补充物、基质组合物、等。

[0173] 在上述组分外，主题试剂盒会进一步包含用于实施主题方法的用法说明书。这些用法说明书可以以多种形式(其中一种或多种可以存在于试剂盒中)存在于主题试剂盒中。这些用法说明书可以存在的一种形式是作为合适介质或基片(例如印刷信息的一张或多张纸片)上，在试剂盒的包装中，在包装插页中等的印刷信息。又一种手段会是计算机可读介质，例如磁盘、CD、等，其上记录信息。可以存在的又一种手段是网站网址，其可以经由因特网使用以访问远端地点的信息。任何方便的手段可以存在于试剂盒中。

## 实施例

[0174] 通过参考下述实施例进一步详细描述本发明。提供这些实施例仅仅是为了例示的目的，并非意图限制，除非另有规定。如此，本发明绝不应当解释为限于下述实施例，而是应当解释为涵盖任何和所有变型，其由于本文中提供的教导而变得显而易见。

[0175] 在没有进一步描述的情况下，认为本领域普通技术人员能使用前述描述和下述例示性实施例生成并利用本发明的化合物，并且实施要求保护的方法。因此，下述实施例明确指出本发明的优选实施方案，并且不应解释为以任何方式限制公开内容的剩余部分。

[0176] 实施例1：细胞因子基因的遗传人源化使得能够将人多发性骨髓瘤细胞移入小鼠。

[0177] 本文中描述的数据证明了本文中描述的经遗传修饰的非人动物代表多发性骨髓

瘤的一种新颖的体内动物模型。

[0178] 材料和方法

[0179] 小鼠。通过用含有外显子1到5且包含人IL-6基因的3'非翻译区的4.8kb人IL-6基因序列替换6.8kb鼠IL-6基因基因座,生成人源化IL-6敲入小鼠。

[0180] 简言之,使用VELOCIGENE®遗传工程技术构建用于在单一靶向步骤中用人IL-6基因替换小鼠的靶向构建体(参见Valenzuela等(2003)High-throughput engineering of the mouse genome coupled with high-resolution expression analysis,Nature Biotech,21 (6) :652-659)。分别自细菌人工染色体(BAC)RPCI-23克隆368C3和BAC CTD克隆2369M23获得小鼠和人IL-6DNA。简言之,将通过缺口修复克隆生成的NotI线性化靶向构建体电穿孔入Rag<sup>2+/-</sup> IL2rg<sup>Y/-</sup> ES细胞中,所述靶向构建体含有侧翼为小鼠IL-6上游和下游同源臂的4.8kb人IL-6序列(从外显子1中的ATG延伸至外显子5,及3'下游序列的16个核苷酸(基因组坐标:NCBIh37.1:ch7:22,766,882至22,771,637))和侧翼为lox的(floxed)neo选择盒。做出RAG2基因和IL2rg基因敲除的亲本ES细胞系是商品化V17 ES细胞(BALB/cx129杂合子)。可以用瞬时Cre表达载体电穿孔正确靶向的ES细胞以去除药物选择盒。

[0181] 通过天然等位基因丧失(LONA)测定法(Valenzuela等2003)鉴定正确靶向的ES细胞克隆,其中通过对小鼠IL6基因中靶向删除的序列特异性的两个TaqMan™定量聚合酶链式反应(qPCR)测定天然的、未修饰的IL6基因的拷贝数。qPCR测定法包含以下引物-探针组(以5'至3'书写):上游正向引物,TTGCCGGTTT TCCCTTTCT C (SEQ ID NO:1);上游反向引物,AGGGAAGGCC GTGGTTGTC (SEQ ID NO:2);上游探针,FAM-CCAGCATCAG TCCCAAGAAG GCAACT-BHQ (SEQ ID NO:3);下游正向引物,TCAGAGTGTG GGCGAACAAA G (SEQ ID NO:4);下游反向引物,GTGGCAAAAG CAGCCTTAGC (SEQ ID NO:5);下游探针,FAM-TCATTCCAGG CCCTTCTTAT TGCATCTG-BHQ (SEQ ID NO:6);其中FAM指5'-羧基荧光素荧光探针,而BHQ指黑洞淬灭剂型的荧光淬灭剂(Bioscience Technologies)。依照制造商的建议在384孔PCR板(MicroAmp™光学384孔反应板,Life Technologies)中将自己已经摄取靶向载体并且在其基因组中掺入的ES细胞克隆纯化的DNA与TaqMan™基因表达主混合物(Life Technologies)组合,并且在Applied Biosystems Prism 7900HT中循环,其收集PCR过程期间的荧光数据,并且测定阈循环(Ct),即积累的荧光达到预先设置的阈值的分数PCR循环。对每份DNA样品运行上游和下游IL6特异性qPCR和两个针对非靶向性参照基因的qPCR。计算每个IL6特异性qPCR和每个参照基因qPCR之间的Ct值差异( $\Delta Ct$ ),然后计算所有测定样品的每个 $\Delta Ct$ 和中值 $\Delta Ct$ 之间的差异以对每份样品获得 $\Delta \Delta Ct$ 值。自下述公式计算每份样品中IL-6基因的拷贝数:拷贝数=2 $\cdot$ 2 $^{-\Delta \Delta Ct}$ 。已经丧失其天然拷贝之一的正确靶向的克隆会具有等于1的IL-6基因拷贝数。通过包含以下引物-探针组(以5'至3'书写)的TaqMan™ qPCR测定法实施人源化等位基因中人IL-6基因序列替换删除的小鼠IL-6基因序列的确认:人正向引物,CCCCACTCCACTGGAATTG (SEQ ID NO:7);人反向引物,GTTCAACCACAGCCAGGAAAG (SEQ ID NO:8);和人探针,FAM-AGCTACAACCTCATTGGCATCCTGGCAA-BHQ (SEQ ID NO:9)。

[0182] 鼠基因座和含有hIL-6基因的序列的上游接合设计为在5' - AATTAGAGAG TTGACTCCTA ATAAATATGA GACTGGGGAT GTCTGTAGCT CATTCTGCTC TGGAGCCCAC CAAGAACGAT AGTCAATTCC AGAAACCGCT ATGAACTCCT TCTCCACAAG TAAGTGCAGG AAATCCTTAG CCCTGGAAC

GCCAGCGGCG GTCGAGCCCT GTGTGAGGGA GGGGTGTGTG GCCCAGG (SEQ ID NO:10) 内, 其中人基因的第一个核苷酸前的最后一个小鼠核苷酸是CCGCT中的“T”, 并且人序列的第一个核苷酸是ATGAA中的第一个“A”。含有hIL-6基因的序列和鼠基因座的下游接合设计为在5' - TTTTAAAGAA ATATTATAT TGTATTATA TAATGTATAA ATGGTTTTA TACCAATAAA TGGCATTTA AAAAATTCAG CAACTTGAG TGTGTCACGC TCCCGGGCTC GATAACTATA ACGGTCTAA GGTAGCGACT CGAGATAACT T-3' (SEQ ID NO:11) 内, 其中人序列的最后一个核苷酸是TCACG中的最后一个“G”, 且小鼠序列的第一个核苷酸是CTCCC中的第一个“C”; 下游接合区还含有3' 端的loxP位点(显示了其开始), 其用于去除侧翼为lox的泛素启动子驱动的neo盒。neo盒与小鼠IL-6基因座的接合设计为在5' - TATACGAAGT TATCCTAGGT TGGAGCTCCT AAGTTACATC CAAACATCCT CCCCAAATC AATAATTAAG CACTTTTAT GACATGTAAA GTTAAATAAG AAGTGAAAGC TGCAAGATGGT GAGTGAGA (SEQ ID NO:12) 内, 其中AGCTC的最后一个“C”是neo盒的最后一个核苷酸; 该盒后的小鼠基因组的第一个核苷酸是CTAAG的最初“C”。

[0183] 为了生成包含hIL-6且缺乏Rag2和I12rg的小鼠, 鉴定正确靶向的ES细胞, 并且使用本领域中已知的技术将其导入植入前胚胎中。

[0184] 然后, 将人源化IL-6KI小鼠回交以生成缺乏Rag2和I12rg且表达hIL-6的小鼠, 并与表达人SIRPa转基因的小鼠 (Strowig等, 2011, Proc Natl Acad Sci USA, 108 (32) : 13218-13223) 杂交以生成在Rag2和I12rg方面有缺陷以及表达hIL-6和hSIRPa两者的小鼠 ( $Rag2^{-/-} I12rg^{\text{无}} I16^{h/h} hSIRPa^+$ )。另外, 将 $Rag2^{-/-}$ ,  $I12rg^{Y/-}$ , hIL-6KI小鼠与表达人TPO (Rongvaux等, 2011, Proc Natl Acad Sci USA, 108 (6) : 2378-2383), 人IL-3和人GM-CSF (Willinger等, 2011, Proc Natl Acad Sci USA, 108 (6) : 2390-2395), 和人M-CSF (Rathinam等, 2011, Blood, 118 (11) : 3119-3128) 以及hSIRPa (Strowig等, 2011, Proc Natl Acad Sci USA, 108 (32) : 13218-13223) 的小鼠杂交以生成表达这些人蛋白质的组合的小鼠 ( $Rag2^{-/-} I12rg^{\text{无}} hSIRPa^+ Tpo^{h/h} Mcsf^{h/h} I13/Gmcsf^{h/h} I16^{h/h}$ )。

[0185] 细胞系和原代细胞。在标准培养箱中于37°C和5% CO<sub>2</sub>在补充有20% FCS、青霉素/链霉素、L-谷氨酰胺、和2.5ng/ml hIL-6的RPMI1640培养基中维持多发性骨髓瘤细胞系 INA-6 (Burger等, 2001, Hematol J, 2 (1) : 42-53)。

[0186] 在自患者获得知情同意后自骨髓抽吸物分离来自多发性骨髓瘤患者的原代细胞。通过Ficoll密度梯度离心纯化单个核细胞, 随后通过磁活化细胞分选(MACS®)分离不同细胞子集。为了获得T细胞消减的群体, 通过在AutoMACS系统上使用抗CD3微珠 (Miltenyi Biotec) 进行负选择, 消减CD3+细胞。为了获得CD138+细胞, 通过在AutoMACS®系统上使用抗CD138微珠 (Miltenyi Biotec) 进行正选择, 分离CD138+细胞。通过流式细胞术分析MACS®选择后的细胞纯度。

[0187] 细胞移植。对于股骨内移植INA6细胞, 用来自X-射线源的200拉德照射 $Rag2^{-/-} I12rg^{\text{无}} I16^{h/h} hSIRPa^+$ 小鼠两次。然后, 将指定量的细胞移植入接受者小鼠的股骨中。简言之, 使用氯胺酮/甲苯噻嗪麻醉小鼠, 并使用26号针将孔钻入股骨的髌面中。然后, 使用27号针在20μl体积中缓慢注射细胞。对于移植原代患者衍生细胞, 用来自X-射线源的150拉德将 $Rag2^{-/-} I12rg^{\text{无}} hSIRPa^+ Tpo^{h/h} Mcsf^{h/h} I13/Gmcsf^{h/h} I16^{h/h}$ 小鼠照射两次, 并且实施移植, 如上文描述的。

[0188] ELISA。使用商品化ELISA试剂盒来测量人可溶性IL-6R (R&D Systems)、人Igκ和Ig

$\lambda$  (Bethyl Laboratories) 的浓度。依照制造商的用法说明书实施这些蛋白质的检测。

[0189]  $\mu$ CT。使用锥形束微聚焦x-射线计算机断层摄影术 ( $\mu$ CT40; ScancoMedicalAG) 量化股骨形态计量学。获得连续的断层摄影图像，并且重建3D图像，并用于测定参数。通过测量骨体积分数、小梁厚度、小梁数目、和小梁分离来表征小梁形态计量学。皮层测量包括平均皮层厚度、骨皮质的横切面面积、骨膜下横切面面积、和髓面积。

[0190] 组织学。依照标准规程对股骨剥离软组织，在10%缓冲福尔马林中固定，脱水，并在甲基丙烯酸甲酯中包埋，之后切成切片，并用甲苯胺蓝染色。

### [0191] 结果

[0192] 在具有人源化IL-6基因的小鼠中移入多发性骨髓瘤细胞系。利用人IL-6依赖性MM细胞系 (INA6-gfp) 来评估表达人SIRPa和IL-6的小鼠是否是多发性骨髓瘤 (MM) 细胞系的合适宿主。INA6-gfp细胞系在scid-hu小鼠的异种移植植物系统中移植时显示对人微环境 (即人胎骨芯片) 的高度依赖性 (Epstein等, 2005, Methods Mol Med, 113:183-190)。具体而言，INA-6细胞仅能够在scid-hu小鼠中移入人骨移植物，提示与原代MM细胞类似的对人骨髓微环境的依赖性 (Tassone等, 2005, Blood, 106 (2):713-716)。

[0193] 因此，为了直接测试IL-6人源化在使得骨髓瘤细胞能够生长中的潜力，将INA-6细胞静脉内移植入i)  $Rag2^{-/-} I12rg^{\text{无}}$ , ii)  $Rag2^{-/-} I12rg^{\text{无}} hSIRPa^+$ , iii)  $Rag2^{-/-} I12rg^{\text{无}} I16^{\text{h/h}}$ , 和 iv)  $Rag2^{-/-} I12rg^{\text{无}} I16^{\text{h/h}} hSIRPa^+$  小鼠中。通过测量血液中由INA-6细胞分泌的sIL-6R蛋白来分析移入。仅在表达人IL-6的小鼠中检测出移入 (图1)，证明INA-6细胞的确能够移入表达人IL-6的小鼠。接着，通过荧光显微术调查INA-6细胞 (修饰为表达GFP) 在移入小鼠中的定位。在骨髓中检测出很少的GFP+细胞 (图2)，但是在移入小鼠的肺中检测出增加数目的GFP+细胞 (图3)。

[0194] 对人I16基因表达的分析揭示了在肺中找到最高水平的人I16基因表达 (图3)，因此与肺中INA-6细胞的存在关联起来。总之，本文中公开的数据证明静脉内注射 (i.v.) 入遗传修饰为表达人IL6或人IL6和SIRPa的小鼠中后INA-6细胞的成功移入，提示遗传人源化能够克服小鼠中人MM细胞的生长限制。

[0195] 图3中的数据提示INA-6细胞没有有效归巢至骨髓，并且取而代之可以在非生理部位处生长。因此，接着检查在其天然微环境中移植肿瘤细胞系是否能够再现通常与人MM有关的病理学。为此，测试INA6细胞的骨内注射。令人惊讶地，这导致骨破坏和吸收，它们是在MM患者中看到的病理学的方面 (图4-6)。具体而言，通过组织学观察到小梁骨质量的损失，其通过 $\mu$ CT量化。此外，仅观察到对外周部位 (诸如肺) 的有限转移，这得到如下的结论，即可以进一步探索该模型以调查干扰此病理学的新颖药物。为了检验此结论，用Zometa或Velcade (两种通常用于治疗多发性骨髓瘤患者的药物) 处理移入有INA-6的小鼠。令人惊讶地，与未处理的小鼠相比，注射有INA-6细胞的小鼠的Zometa处理能够降低骨吸收，如通过 $\mu$ CT量化的 (图7)。

[0196] 本文中公开的数据证明I16基因人源化使得通常需要人微环境的多发性骨髓瘤细胞系能够移入。移入重演在患者中观察到的数种病理学症状，包括骨损失。此外，可以使用批准药物来处理这些症状，突显此模型测试新药物的效用。

[0197] 细胞因子基因的遗传人源化使得能够移入原代患者衍生多发性骨髓瘤细胞。接着，进行实验以检查将原代MM细胞移植入经遗传人源化的小鼠中。先前已经证明了多种细

胞因子(包括血小板生成素、IL-3、GM-CSF、和M-CSF)以及巨噬细胞抑制性受体SIRPa的人源化导致免疫缺陷小鼠中改善的人造血细胞移入(Strowig等,2011,Proc Natl Acad Sci USA,108(32):13218-13223;Rathinam等,2011,Blood,118(11):3119-3128;Rongvaux等,2011,Proc Natl Acad Sci USA,108(6):2378-2383;Willinger等,2011,Proc Natl Acad Sci USA,108(6):2390-2395)。具体而言,IL-3和GM-CSF以及M-CSF的人源化改善已经证明为对于MM病理学的特定方面重要的髓样细胞的移入。hSIRPa的转基因表达改善人细胞移入,但是SIRPa-CD47轴最近还已经与肿瘤发生联系起来。将先前生成的人源化小鼠与人IL-6敲入小鼠组合以生成Rag $^{2/-}$  I12rg<sup>无</sup> hSIRPa<sup>+</sup> Tpo<sup>h/h</sup> Mcsf<sup>h/h</sup> I13/Gmcsf<sup>h/h</sup> I16<sup>h/h</sup>小鼠。为了评估此品系支持人细胞移入的能力,将CD3消减的来自MM患者的骨髓细胞注射入小鼠的骨髓中。在注射骨中检测出高频率的骨髓瘤细胞(其鉴定为CD138+CD38+CD19-细胞),而在并行骨中仅检测出很少的细胞(图8)。

[0198] 这些结果提示本文中描述的经遗传人源化的小鼠支持在体内移入原代人MM细胞。目前的数据证明编码IL-6、TPO、IL-3、GM-CSF、和/或M-CSF的细胞因子基因的人源化使得来自患者的原代多发性骨髓瘤细胞(通常需要人微环境来实现成功移植)能够移入。

[0199] 实施例2: IL-6基因的遗传人源化使得能够将人造血细胞移入小鼠。

[0200] 材料和方法

[0201] 小鼠。如上文描述的那样生成人源化IL-6KI小鼠。首先,将嵌合小鼠与BALB/c小鼠育种,然后回交以获得具有纯合性的hIL-6的后代。使用具有相同混合BALB/c x 129背景的小鼠作为对照。

[0202] 通过X-射线照射以4小时间隔以2次150cGy亚致死照射新生幼崽(在生命的第一天内)。照射后4小时,通过使用30号针(Hamilton Company, NV, USA)给小鼠对肝注射20μl PBS中的1-2x10<sup>5</sup>个CD34<sup>+</sup>胎肝(FL)细胞。在3周龄时使小鼠断奶。在无特定病原体条件下维持小鼠,并且依照耶鲁科研动物护理和使用委员会方案实施所有实验。

[0203] 人和小鼠血液学细胞群体的分析。在移植后不同时间时在异氟烷麻醉下自框后从对小鼠采血。收集血浆样品,并于-20℃贮存供进一步Ig测量用。通过使用氯化铵(ACK)裂解缓冲液将红细胞裂解两次,并在FACS缓冲液(补充有5%FBS和5mM EDTA的PBS)中重悬浮剩余的PBMC。

[0204] 在杀死小鼠时,自骨髓(BM)、胸腺和脾获得细胞的单细胞悬浮液。然后,依照制造商的用法说明书用经荧光染料标记的针对小鼠和人细胞表面抗原的单抗染色样品。使用下述抗人单抗:CD45(HI30)、CD19(HIB19)、CD3(UCHT1)、CD4(RPA-T4)、CD8(HIT8a)、CD20(2H7)、CD5(UCHT2)、CD27(O323)、CD24(ML5)、CD10(HI10a),均来自Biolegend, CA, USA;来自BD Biosciences的CD33(WM53)、CD38(HIT2)、IgM(G20-127)、CD138(MI15)和来自Miltenyi Biotec的CD34(AC136)。用抗鼠CD45抗体(30-F11, Biolegend)染色小鼠细胞。在LSRII(BD Biosciences)血细胞计数仪上获得样品,并在FlowJo(Treestar, OR, USA)软件上分析。

[0205] 人免疫球蛋白的测量。通过ELISA在自小鼠收集的血浆中测量总免疫球蛋白(Ig)。于4℃用20μg/ml纯化的山羊抗人IgM和IgG(Southern Biotechnology, AL, USA)将96孔板(Nunc, NY, USA)包被过夜。在清洗和用PBS 1%牛血清清蛋白(BSA, Sigma-Aldrich)封闭后,于室温(RT)添加样品的适当稀释液达2小时。清洗板,并于RT与同种型特异性生物素化二抗(Southern Biotechnology),接着是链霉亲合素-HRP(Pierce Protein Research

Products, IL, USA) 一起温育1小时。在最终清洗后, 使用TMB底物溶液, 接着是停止溶液(两者均来自Pierce Protein Research Products) 测定酶活性。于450nm测量吸光度。使用来自Bethyl (TX, USA) 的人血清样品作为参照。

[0206] 统计学分析。除了以几何均值绘图的抗体水平外, 所有数据表示为平均值±均值标准差(SEM)。使用非参数Mann-Whitney U检验来测定两组间的统计学显著性。在p值低于0.05时, 认为差异是显著的。

[0207] 结果

[0208] 移植有人CD34<sup>+</sup>细胞的RAG2<sup>-/-</sup>γ<sub>c</sub><sup>-/-</sup>小鼠中的外周血移入。IL6h/h小鼠贯穿分析时间显示与IL6m/m小鼠相比更高的外周血(PB)移入, 并且其移入随时间增加(图9)。在测试的任何时间点时在2组小鼠间在人细胞组成上没有主要的差异(图10)。在这两组中, B和T细胞百分比在第8周和第16-20周时是相似的, 而在第11-15周时B细胞(IL6m/m中69.23±3.97和IL6h/h中55.91±4.86)比T细胞(IL6m/m中16.86±3.14和IL6h/h中30.26±6.23)有更高的百分比。髓样CD33<sup>+</sup>细胞代表人细胞的一种次要组分, 并且其百分比随时间降低。

[0209] 人CD34<sup>+</sup>细胞重建RAG2<sup>-/-</sup>γ<sub>c</sub><sup>-/-</sup>小鼠的器官细胞移入和组成。在血液-淋巴样器官(诸如BM、脾和胸腺)中找到人起源的细胞(图11A)。令人感兴趣地, IL6h/h小鼠的脾展现比IL6m/m小鼠更大的人移入(61.75%±10.87对23.56%±5.2)。这些数据得到人细胞的绝对数目的倍增( $14.21 \times 10^6 \pm 1.38$ 对 $7.26 \times 10^6 \pm 0.66$ )的确认(图11B)。

[0210] 移入有人CD34<sup>+</sup>的RAG2<sup>-/-</sup>γ<sub>c</sub><sup>-/-</sup>小鼠中的B细胞成熟。基于CD24、CD38和表面IgM抗体的组合的使用, 使用图12A中显示的门控策略在移入小鼠的BM和脾中研究人B细胞的成熟阶段。此策略特别可用于剖析移行B细胞子集的存在。在BM中, 主要的区室是由原-/前-B细胞构成的(图12B), IL6m/m和IL6h/h小鼠之间没有差异(分别为76.04%±9.09和79.07%±3.43)。这两组的脾均含有一些成熟B细胞(约20%), 但是仍有高百分比的未成熟/移行细胞(27.13%±8.99和36.45%±5.12)。

[0211] 脾中显著百分比的B细胞是CD5<sup>+</sup>(图13B), 即一种通常不在人BM和外周B细胞上表达, 但是在FL B细胞上以低百分比找到的标志物(图13A)。

[0212] IL6h/h小鼠显示脾中CD27<sup>+</sup> B细胞的百分比与IL6m/m小鼠相比急剧升高(24.73%±8.94对9.46%±2.32), 但是在BM中找到很少的CD27<sup>+</sup>细胞(图14A和14B)。

[0213] 移入有人CD34<sup>+</sup>的RAG2<sup>-/-</sup>γ<sub>c</sub><sup>-/-</sup>小鼠中的抗体生成。由于在移入小鼠中找到B细胞, 然后测量人细胞移植后12和20周时收集的血浆中人IgM和IgG的浓度。IL6m/m和IL6h/h小鼠两者都分泌人IgM和IgG(图15)。

[0214] 一般而言, 分泌抗体的IL6h/h小鼠与IL6m/m小鼠相比有更高的百分比, 前一种小鼠显示更小水平的IgM水平(第12周时14.69μg/ml对33.66μg/ml, 第20周时18.25μg/ml对190.2μg/ml), 但是升高水平的IgG(第12周时243μg/ml对49.6μg/ml, 第20周时553.6μg/ml对297.2μg/ml)(图15A)。IgM和IgG二者平均水平均在IL6m/m小鼠中随时间上升(图15B)。相反, 血清Ig在IL6h/h小鼠中保持稳定。

[0215] 在此通过提及将本文中引用的每一篇专利、专利申请和出版物的公开内容完整收入本文。虽然本发明已经参考具体的实施方案公开, 但是显而易见的是, 本领域技术人员可以在不偏离本发明的真正精神和范围的情况下想到本发明的其它实施方案和变型。所附权利要求书意图解释为包含所有此类实施方案和等同变型。

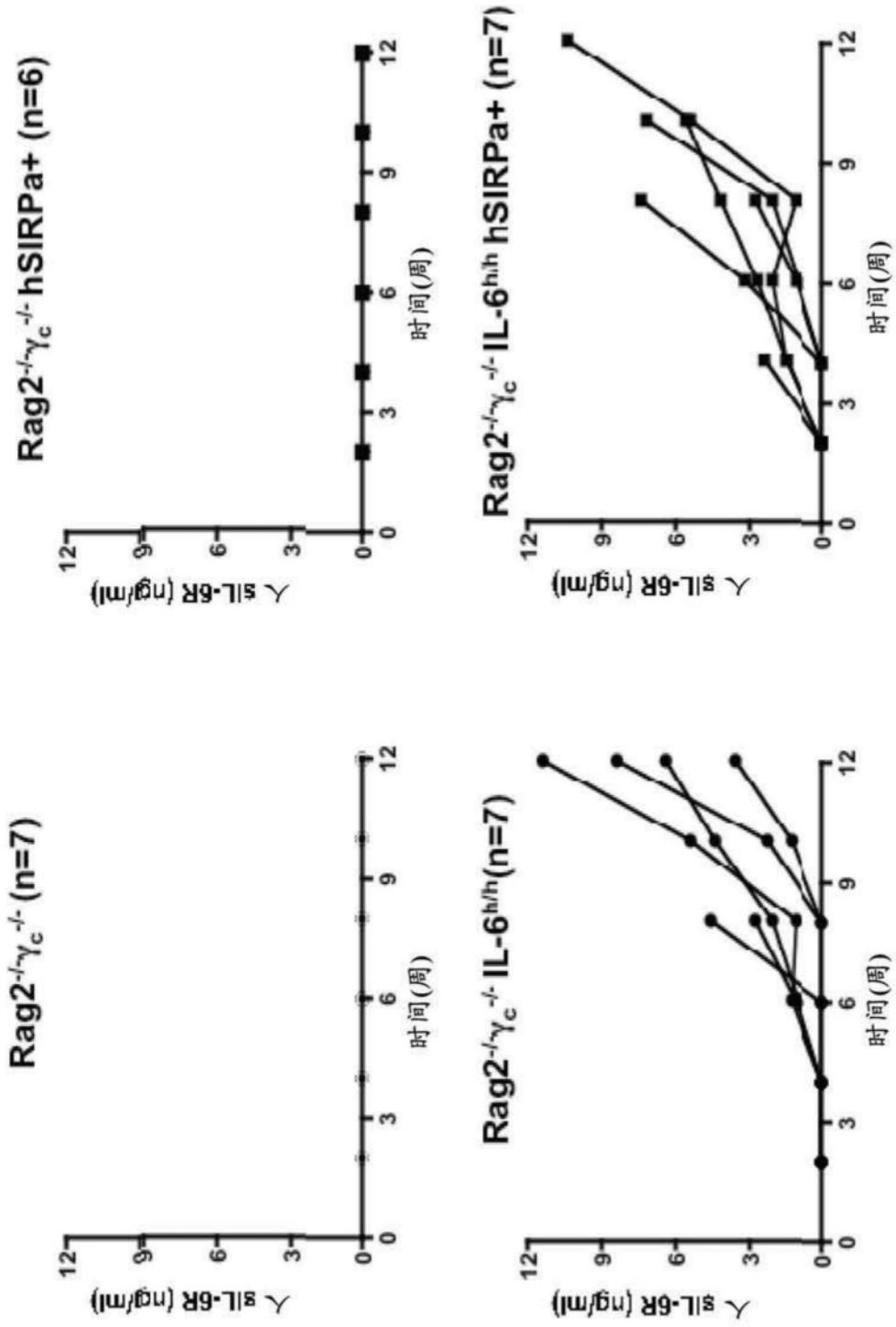


图1

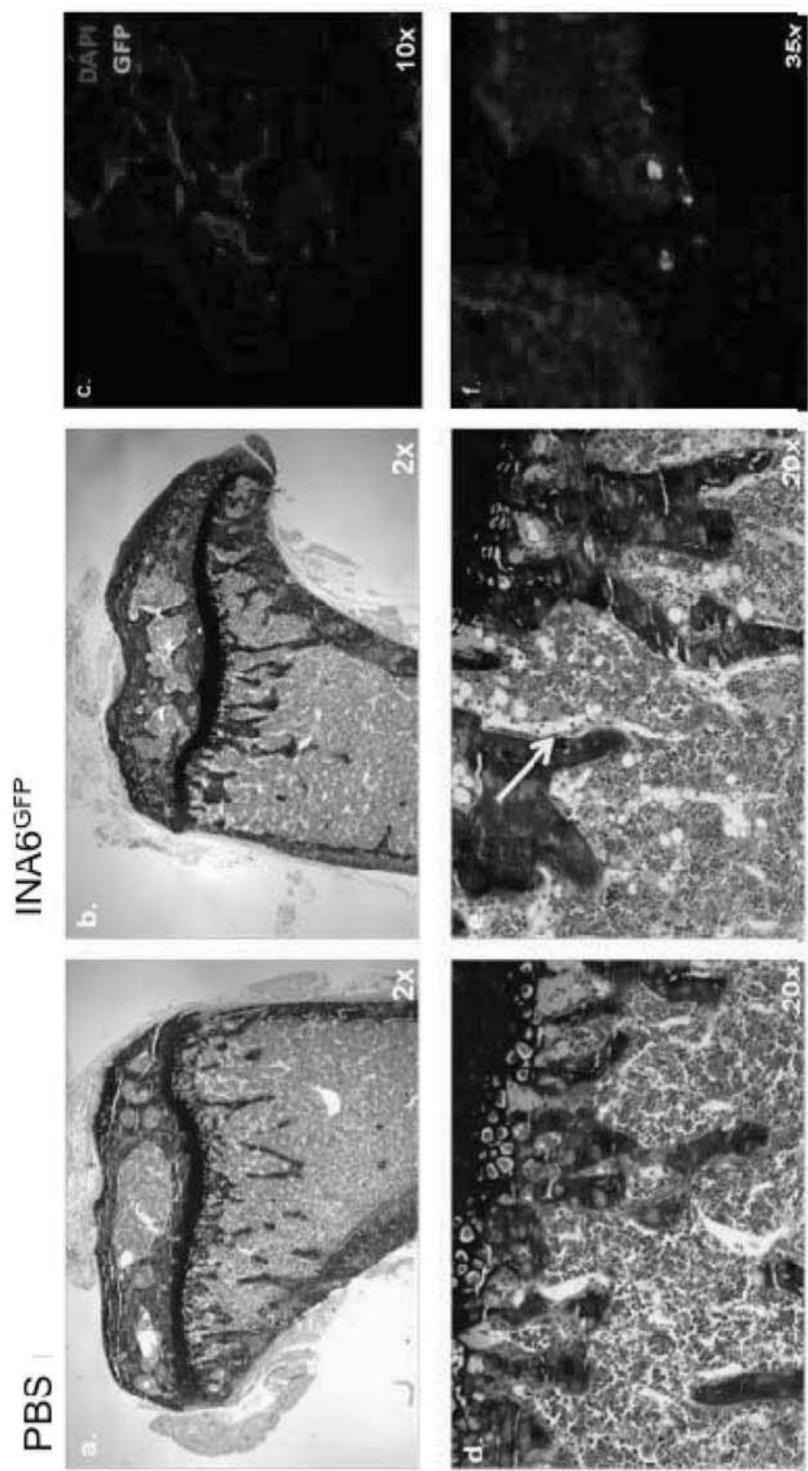
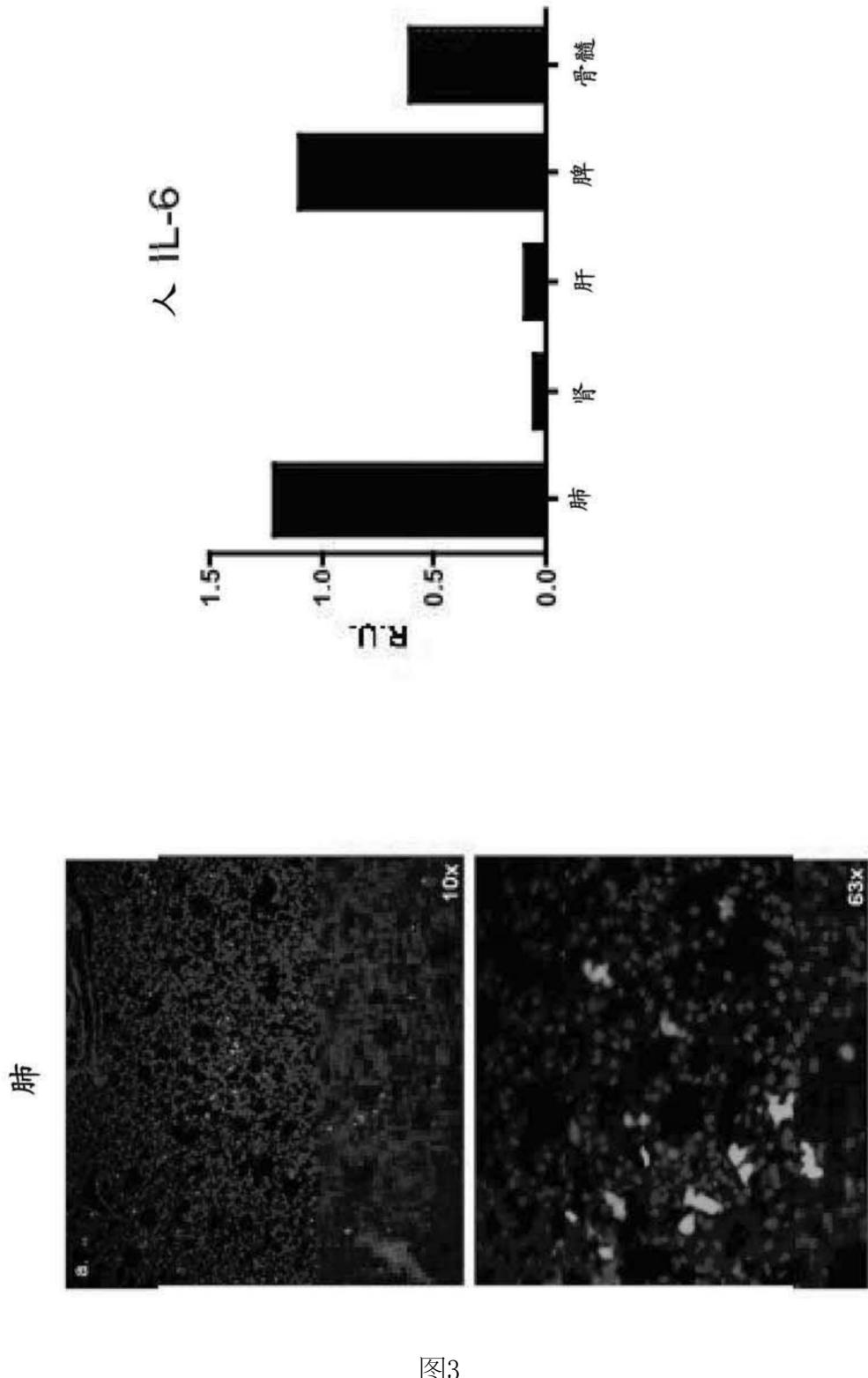


图2



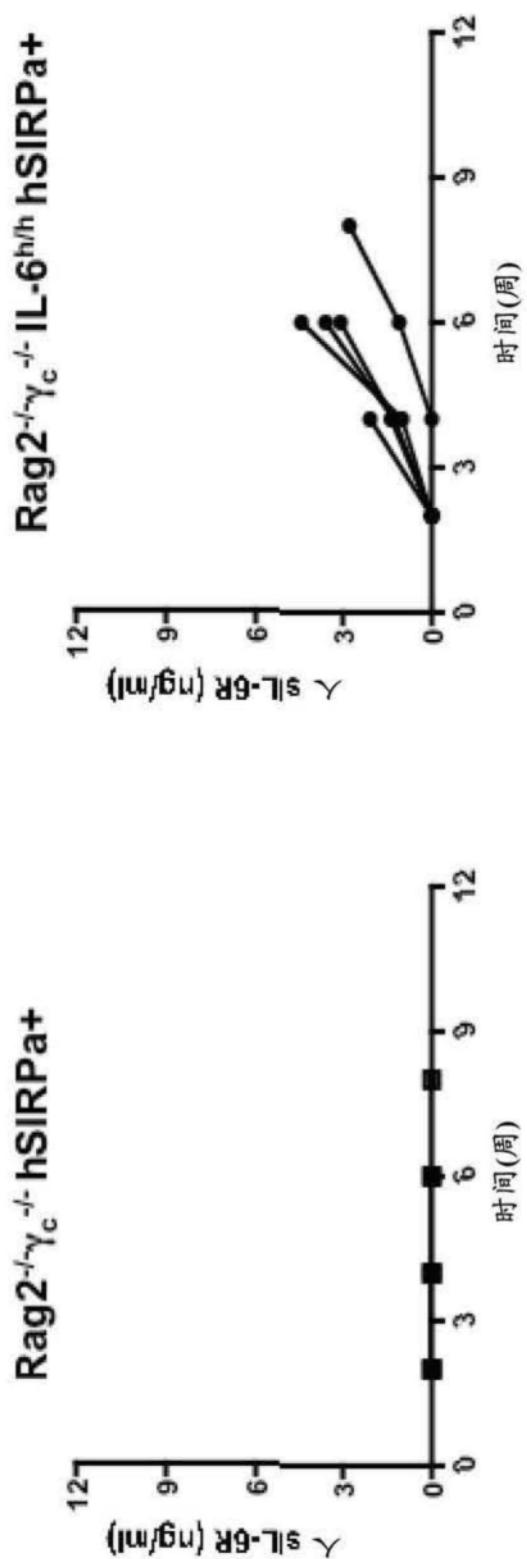


图4

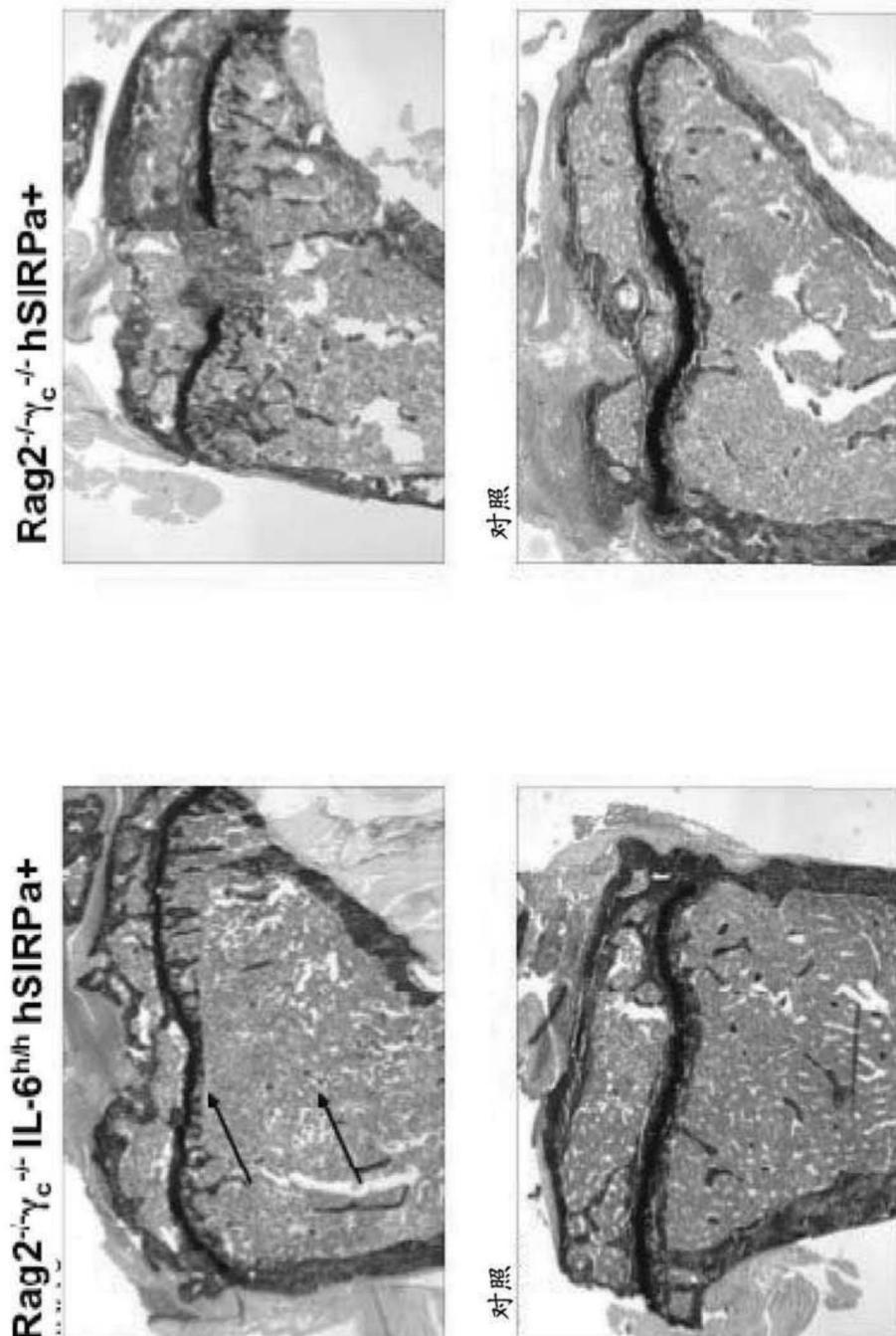


图5

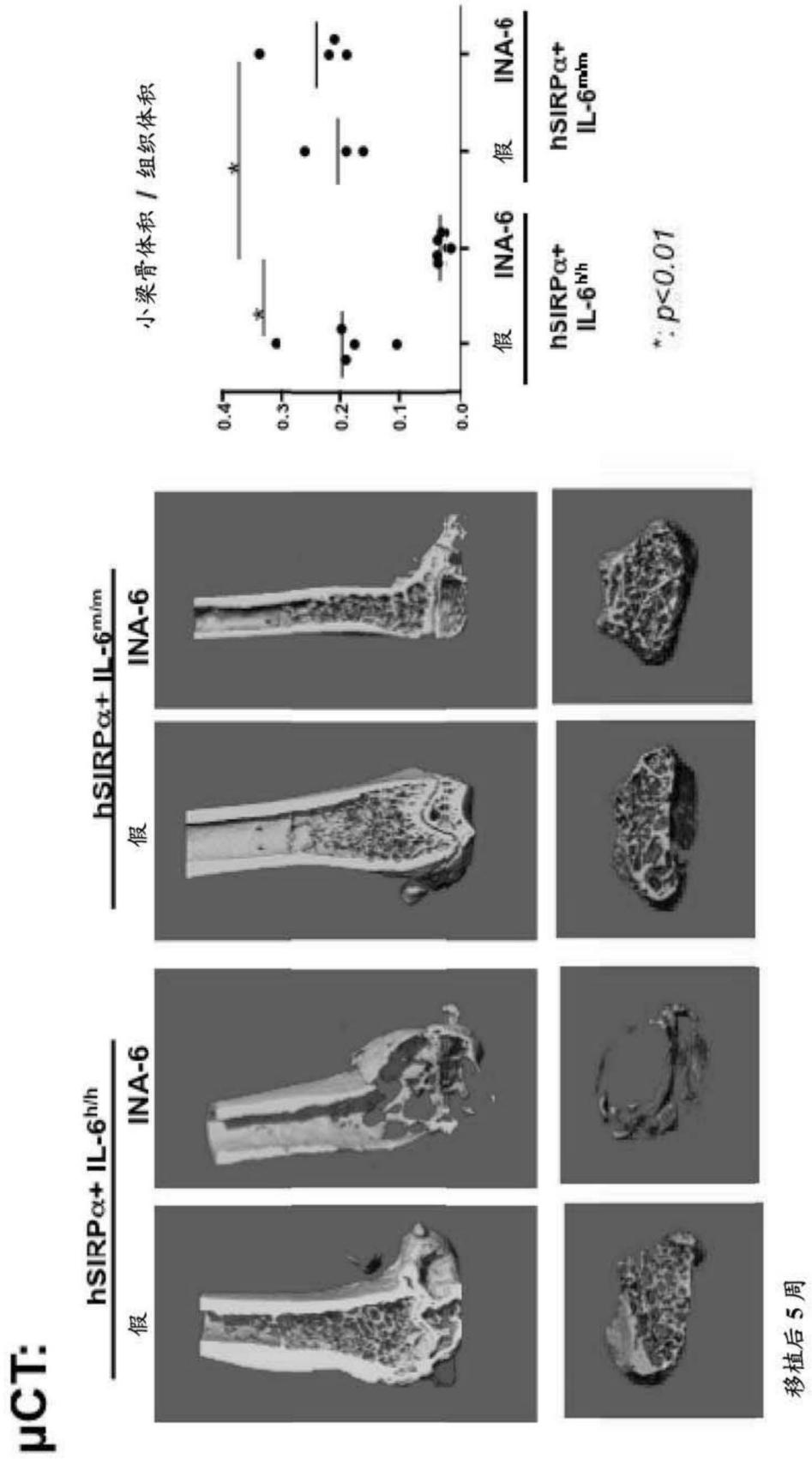


图6

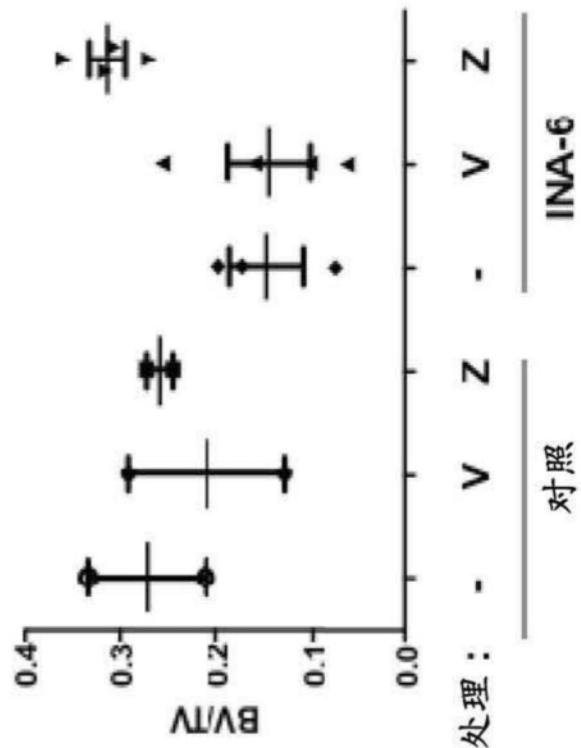


图7

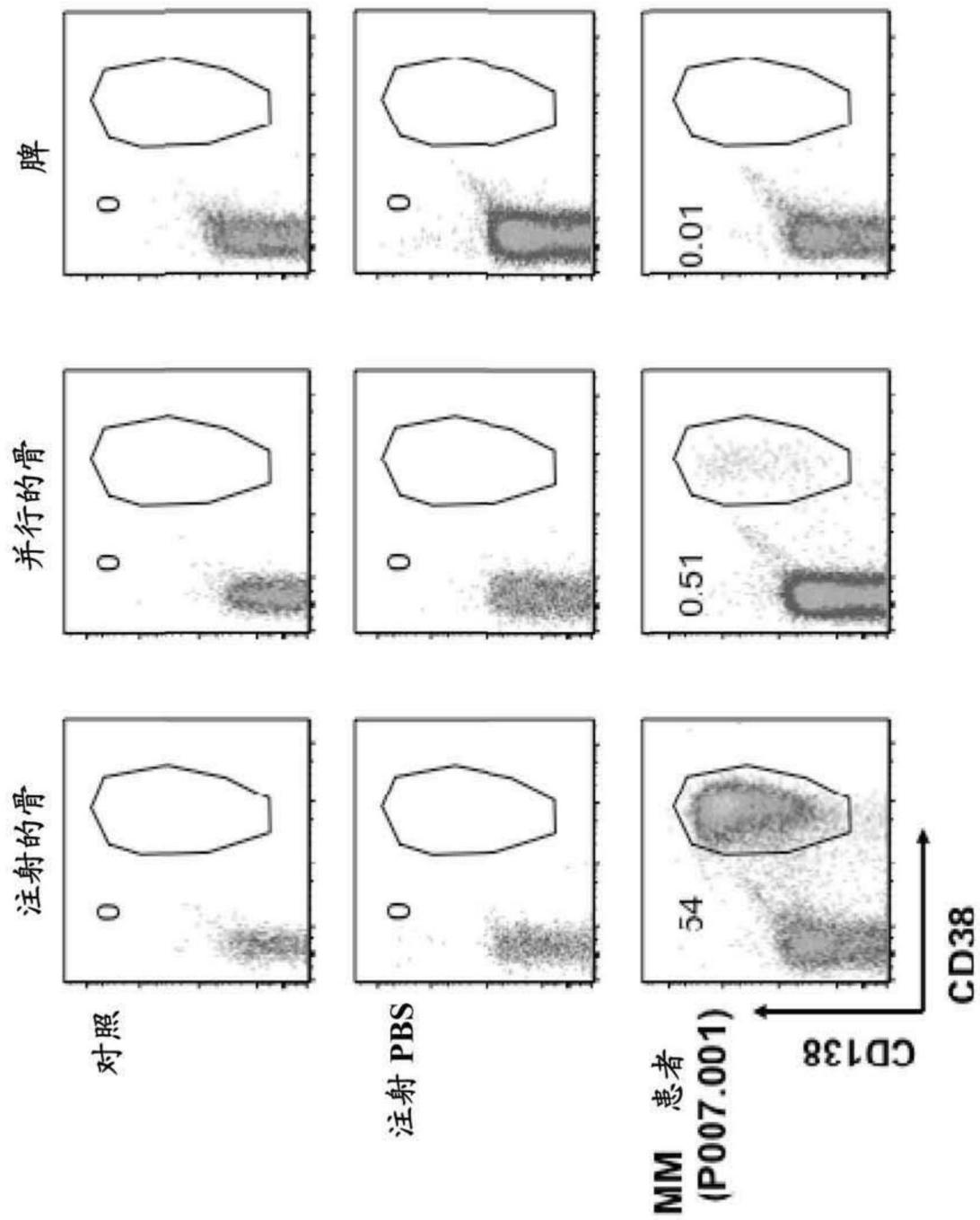


图8

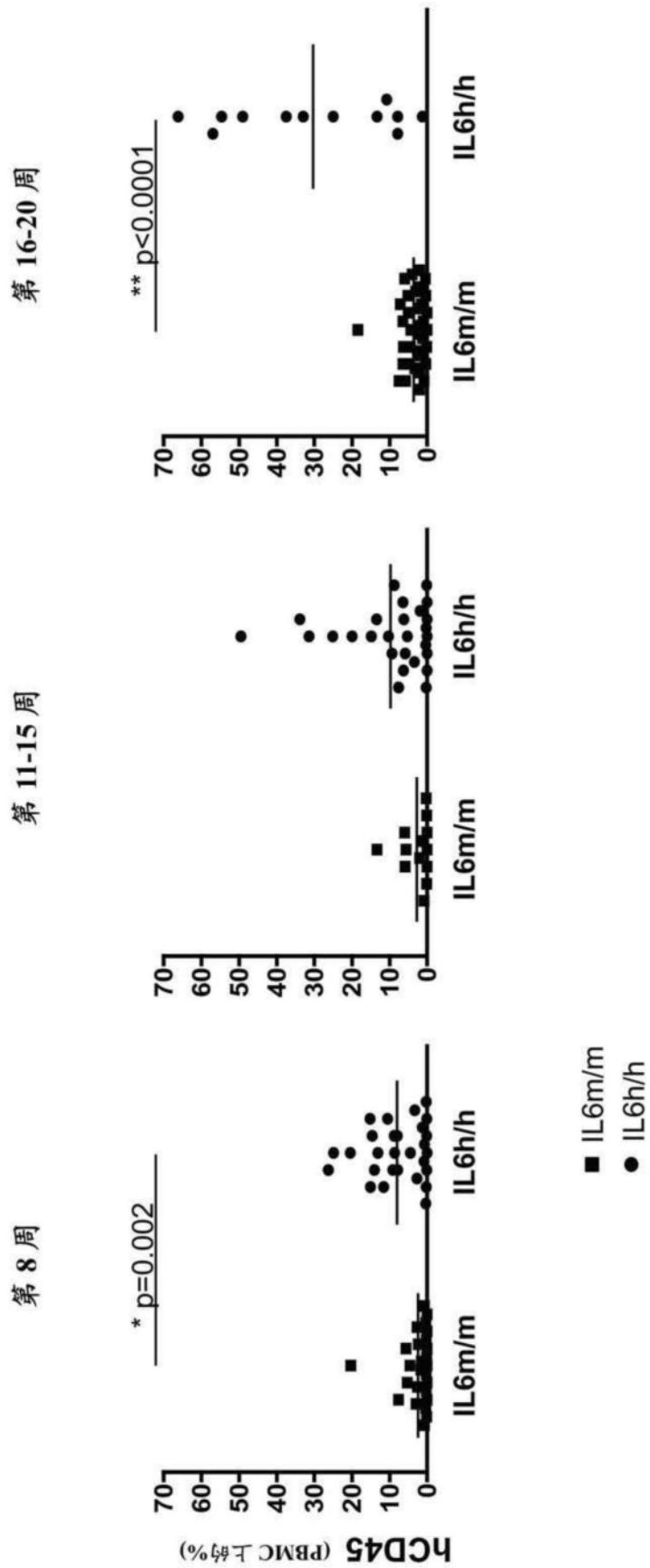


图 9

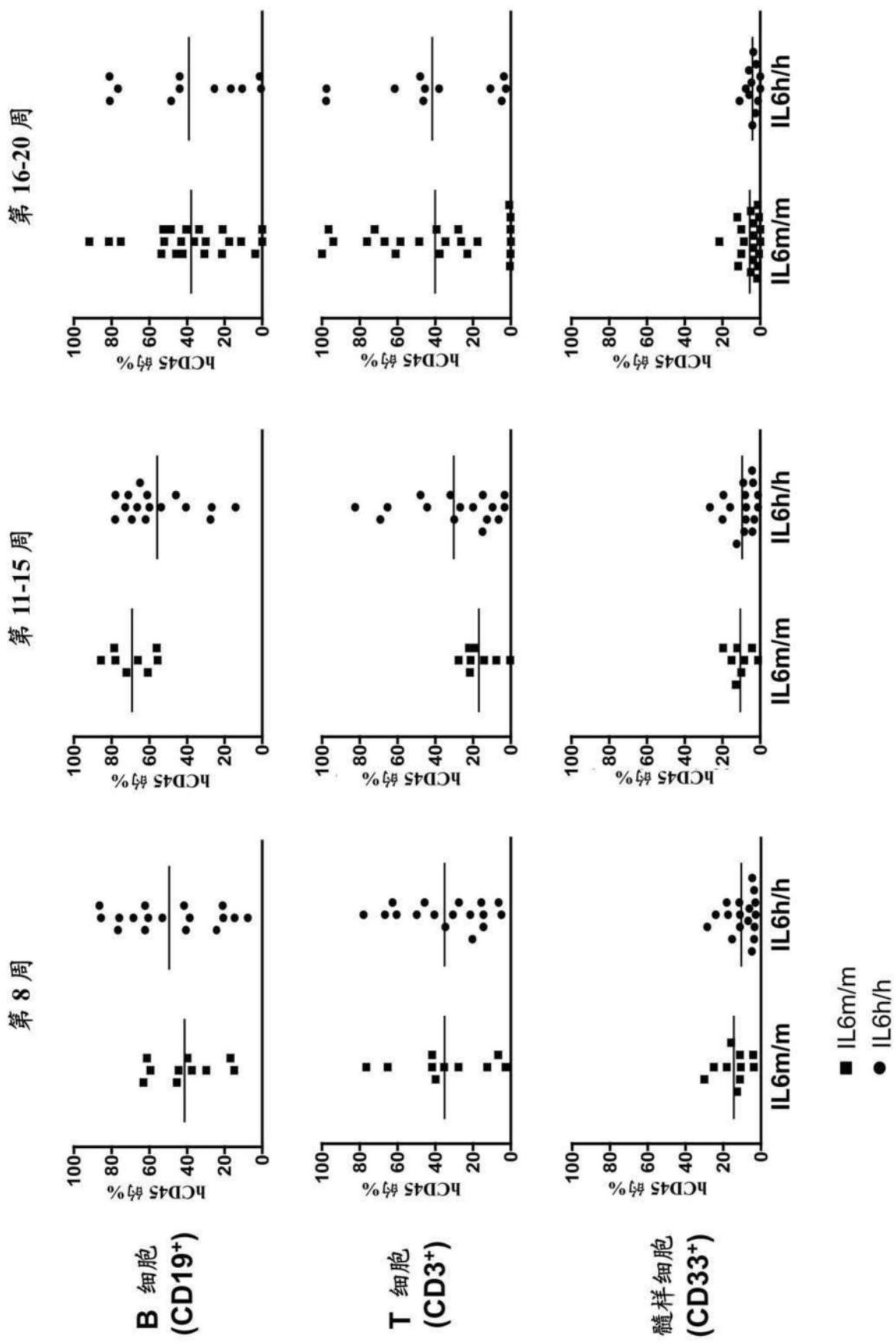


图10

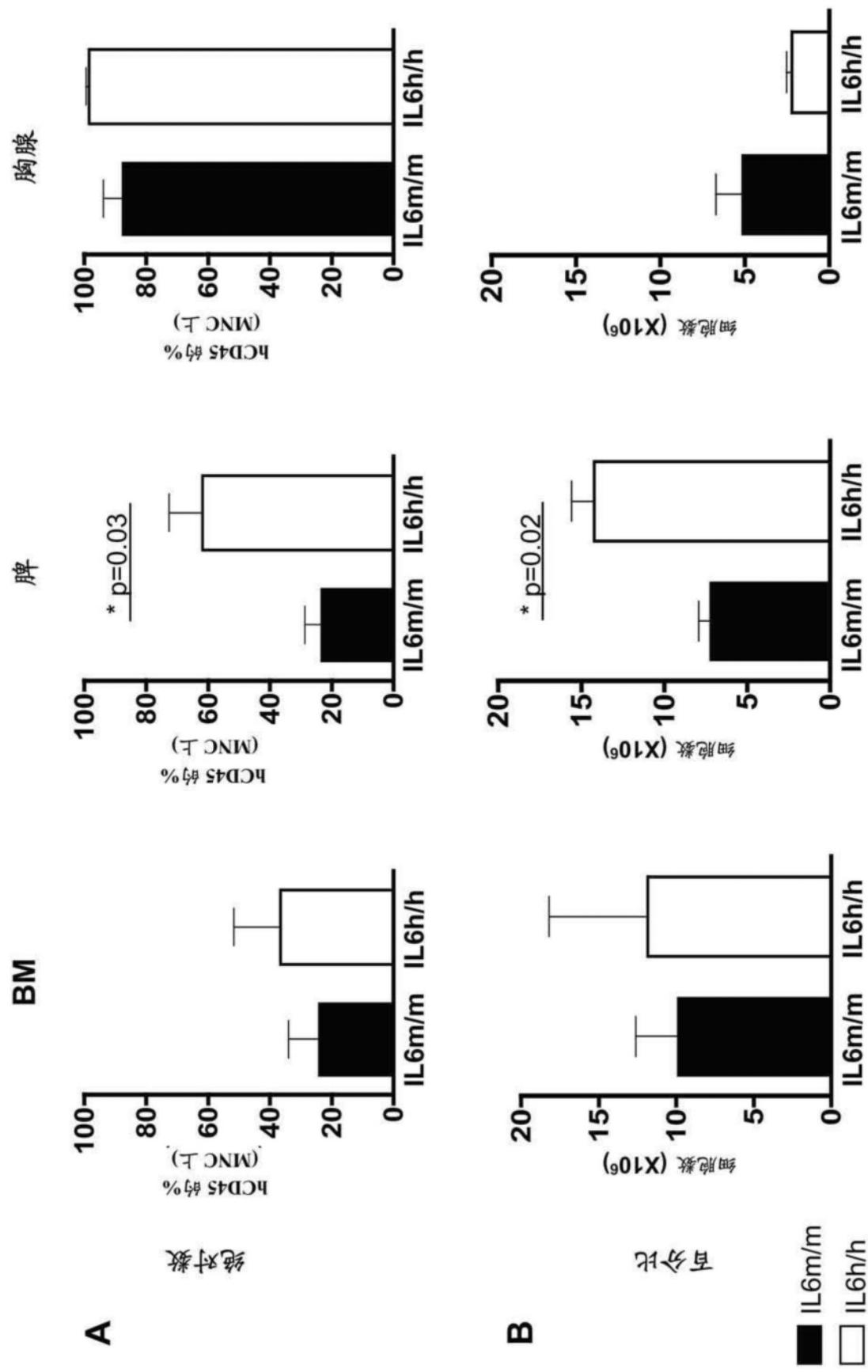


图11

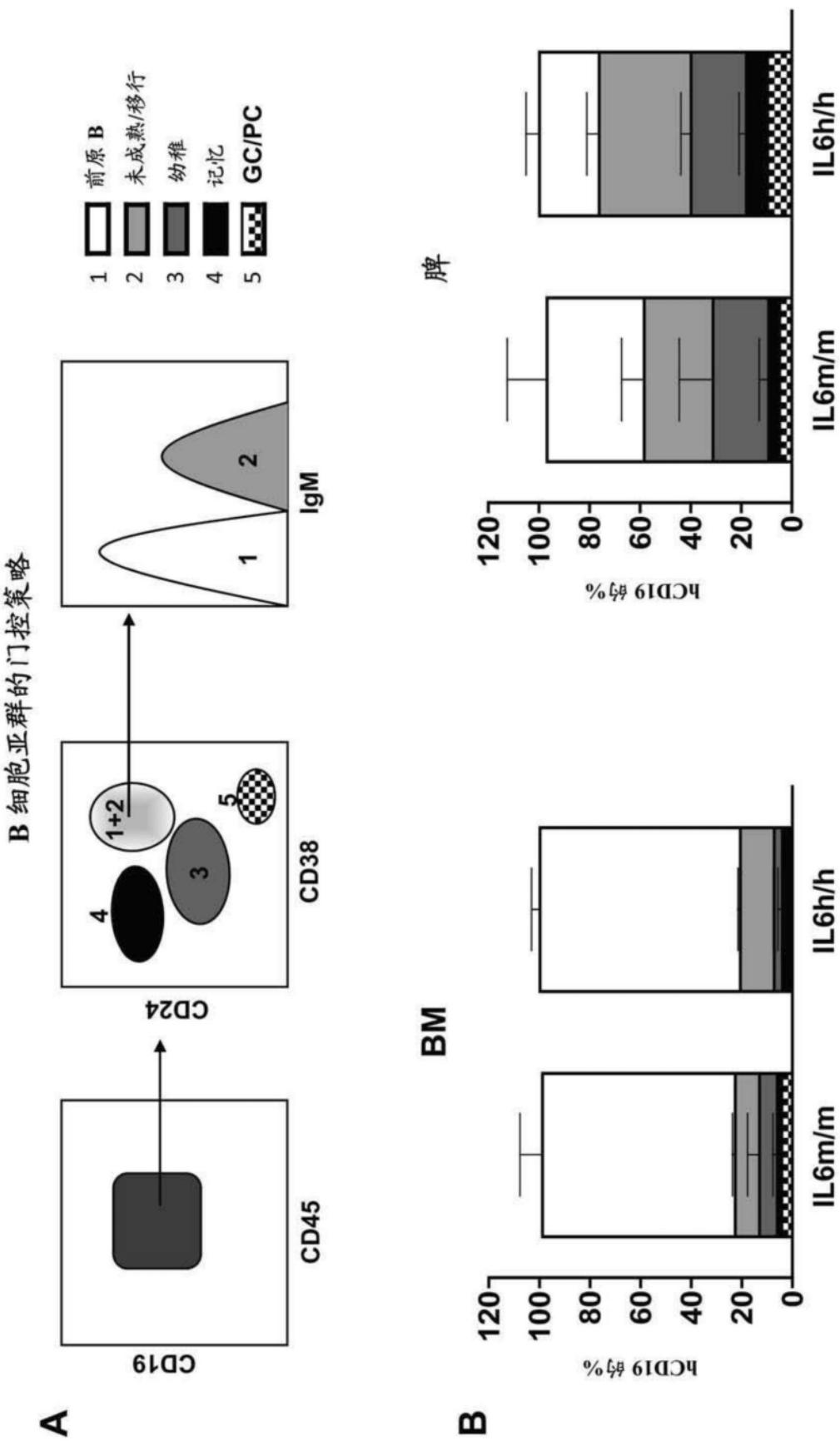


图12

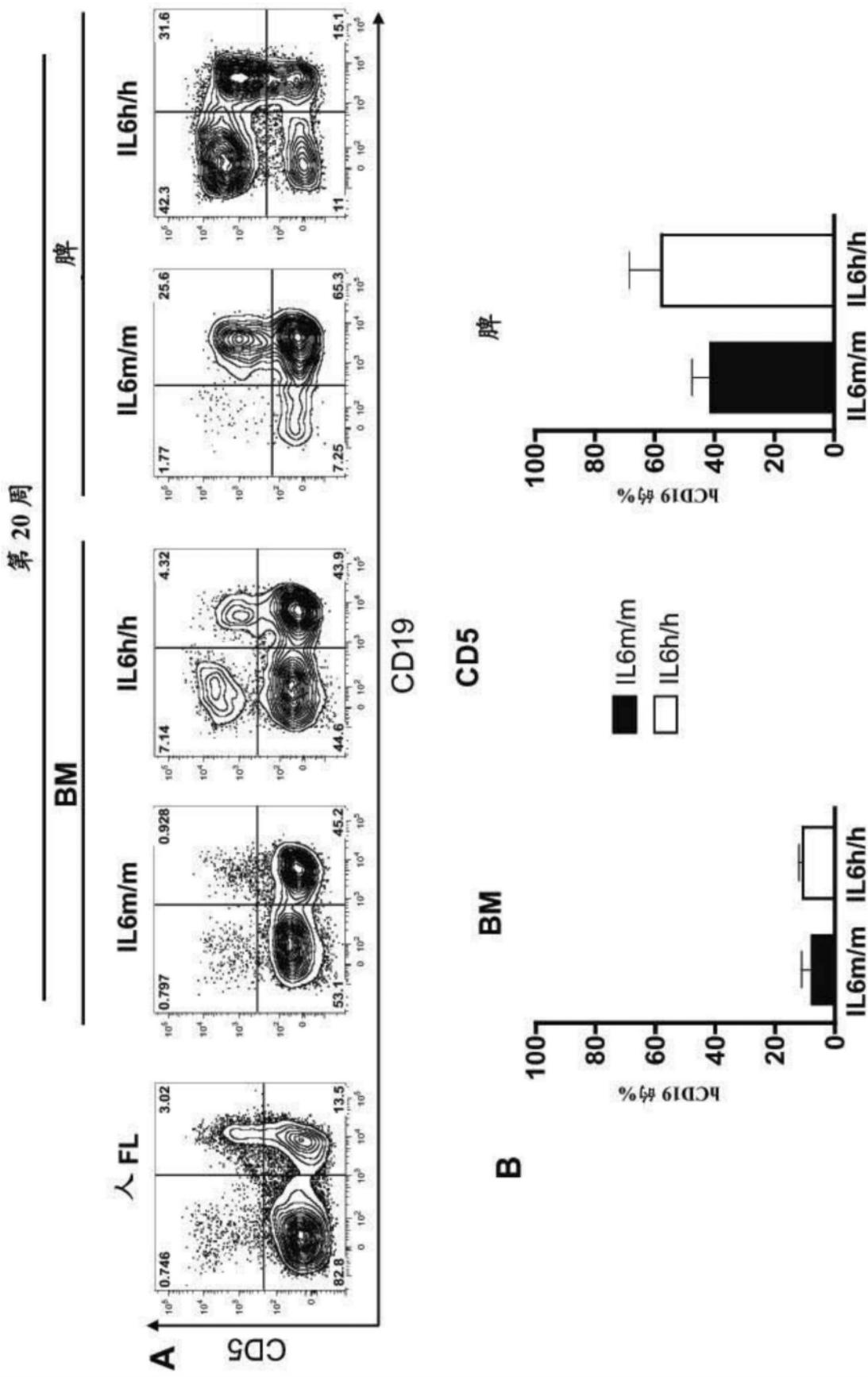


图13

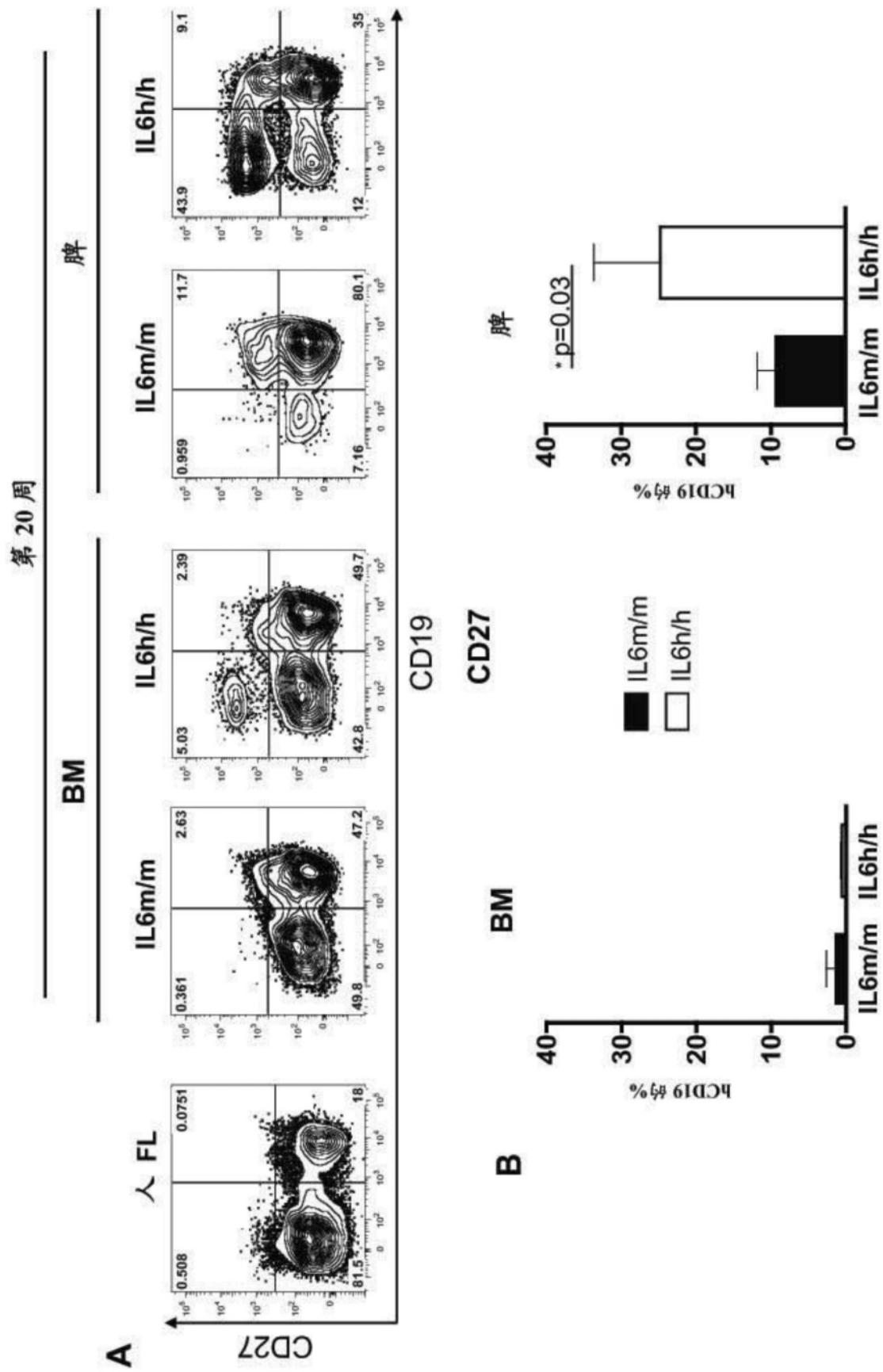


图14

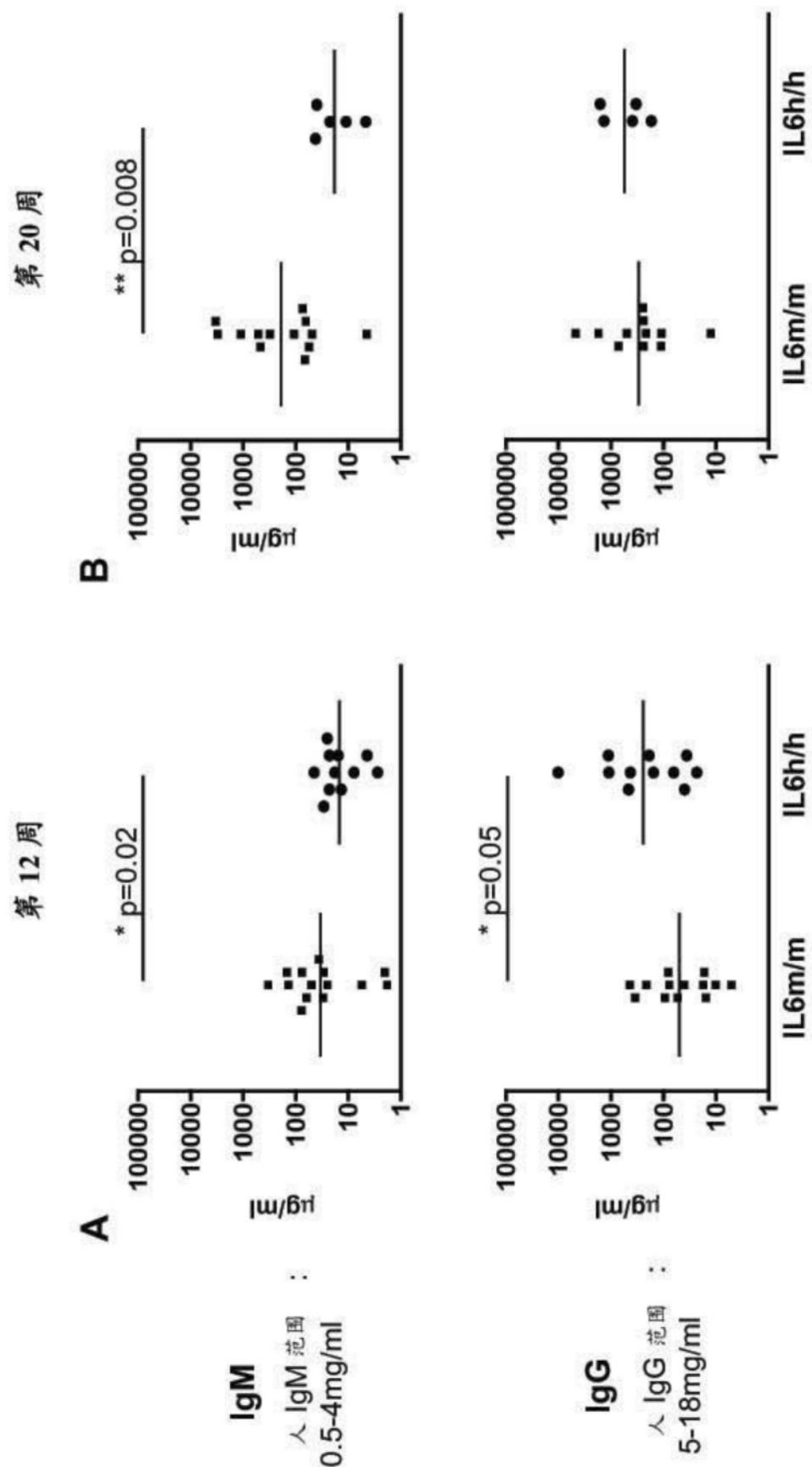


图15