(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 112118734 A
(43)申请公布日 2020.12.22

(21)申请号 201880063498.2
(22)申请日 2018.08.09
(30)优先权数据
62/543,218 2017.08.09 US
62/554,818 2017.09.06 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2020.03.27
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2018/046021 2018.08.09
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2019/032836 EN 2019.02.14
(71)申请人 杰克逊实验室
地址 美国缅因州
申请人 马萨诸塞州大学
(72)发明人 L·D·舒尔兹 M·A·布雷姆 D·L·格雷纳
(74)专利代理机构 北京市金杜律师事务所 11256
代理人 陈文平 徐志明
(51)Int.Cl.
A01K 67/027(2006.01)
C07K 14/54(2006.01)
C12N 5/078(2006.01)

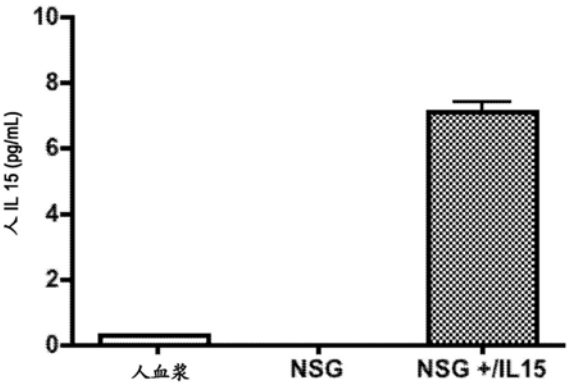
权利要求书2页 说明书31页
序列表3页 附图16页

(54)发明名称

表达人白介素15的免疫缺陷小鼠

(57)摘要

提供了一种在人类免疫、癌症、传染病和其他领域的研究中可用作人自然杀伤(NK)细胞和其他白介素15(IL-15)依赖性细胞群体和过程的功能和调节的模型的免疫缺陷小鼠。根据特定的方面,提供了一种经遗传修饰以表达人白介素15的免疫缺陷小鼠,其中该小鼠没有或不产生功能性小鼠自然杀伤细胞,且其中该小鼠被修饰以包括人自然杀伤细胞。描述了使用本发明的小鼠鉴定测试物质的抗肿瘤活性的方法以及制备该小鼠的方法。



CN 112118734 A

1.一种经遗传修饰以在其基因组中包括编码人白介素-15(hu-IL-15)的核苷酸序列的免疫缺陷小鼠,其中所述小鼠表达所述hu-IL-15。

2.权利要求1的免疫缺陷小鼠,其中所述小鼠不存在功能性内源小鼠自然杀伤(NK)细胞。

3.权利要求1或2的免疫缺陷小鼠,其中所述小鼠是IL-2RG null,使得其缺乏功能性内源IL-2RG基因和缺乏功能性内源小鼠NK细胞。

4.上述权利要求中任一项的免疫缺陷小鼠,其中所述免疫缺陷小鼠是遗传修饰的NSG、NRG或NOG小鼠。

5.上述权利要求中任一项的免疫缺陷小鼠,进一步包含:人造血干细胞、人外周血单核细胞(PBMC)、人NK细胞、人NK细胞系细胞或者其任意两种或更多种的组合。

6.上述权利要求中任一项的免疫缺陷小鼠,其中所述小鼠包含人自然杀伤细胞,且所述人自然杀伤细胞通过人造血干细胞在所述小鼠中的分化而在所述小鼠中产生,或者其中所述人自然杀伤细胞在施用包含人自然杀伤细胞的PBMC后在所述小鼠中维持和/或产生。

7.上述权利要求中任一项的免疫缺陷小鼠,进一步包含含有人肿瘤细胞的人异种移植物。

8.一种鉴定测试物质的抗肿瘤活性的方法,包括:

提供权利要求1-6中任一项的免疫缺陷小鼠;

向所述免疫缺陷小鼠施用人肿瘤细胞,其中所述人肿瘤细胞在所述遗传修饰的免疫缺陷小鼠中形成实体或非实体肿瘤;

向所述免疫缺陷小鼠施用测试物质;以及

测定所述实体或非实体肿瘤对所述测试物质的反应,其中所述测试物质对所述肿瘤和/或肿瘤细胞的抑制性作用确定所述测试物质具有抗肿瘤活性。

9.权利要求8的方法,进一步包括将所述反应与标准进行比较以确定所述测试物质对所述人肿瘤细胞的作用,其中所述测试物质对所述人肿瘤细胞的抑制性作用确定所述测试物质具有抗肿瘤活性。

10.权利要求8或9的方法,其中所述测试物质包括免疫治疗剂。

11.权利要求8至10中任一项的方法,其中所述测试物质是免疫检查点抑制剂。

12.权利要求11的方法,其中所述免疫检查点抑制剂是PD-1抑制剂、PD-L1抑制剂或CTLA-4抑制剂。

13.权利要求11或12的方法,其中所述免疫检查点抑制剂是阿特珠单抗、阿维鲁单抗、德瓦鲁单抗、伊匹单抗、纳武单抗或派姆单抗,或者所述免疫检查点抑制剂包括上述任何一种的抗原结合片段。

14.权利要求8至13中任一项的方法,其中所述测试物质包括抗体。

15.权利要求8至14中任一项的方法,其中所述测试物质包括抗癌剂。

16.一种制备遗传修饰的免疫缺陷的人源化小鼠模型的方法,包括:

提供根据权利要求1至4中任一项的免疫缺陷小鼠;以及

向所述免疫缺陷小鼠施用人造血干细胞、人外周血单核细胞(PBMC)、人NK细胞、人NK细胞系细胞或其任意两种或更多种的组合。

17.权利要求16的方法,进一步包括在施用人造血干细胞、人外周血单核细胞(PBMC)、

人NK细胞、人NK细胞系细胞或其任意两种或更多种的组合之前，调理所述免疫缺陷小鼠以减少所述小鼠的小鼠造血细胞。

18.权利要求17的方法，其中调理所述免疫缺陷小鼠以减少所述小鼠的小鼠造血细胞包括照射所述遗传修饰的免疫缺陷小鼠和/或向所述遗传修饰的免疫缺陷小鼠施用拟辐射药物。

19.权利要求18的方法，其中在施用人造血干细胞、人外周血单核细胞(PBMC)、人NK细胞、人NK细胞系细胞或者其任意两种或更多种的组合之前，不进行调理来减少所述小鼠的小鼠造血细胞。

20.权利要求16至19中任一项的方法，进一步包括向所述免疫缺陷小鼠施用包含人肿瘤细胞的人异种移植物。

21.一种遗传修饰的免疫缺陷小鼠，其基本上如本文所描述或所示。

22.一种制备遗传修饰的免疫缺陷人源化小鼠模型的方法，其基本上如本文所描述或所示。

23.一种鉴定测试物质的抗肿瘤活性的方法，其基本上如本文所描述或所示。

表达人白介素15的免疫缺陷小鼠

[0001] 相关申请的引用

[0002] 本申请要求2017年8月9日提交的美国临时专利申请序列号62/543,218,2017年9月6日提交的美国临时专利申请序列号62/545,818的优先权,两者的全部内容均以参考方式在此并入。

技术领域

[0003] 根据一般的方面,提供了一种可作为用于评估NK细胞介导的抗体依赖性细胞毒性(ADCC)的模型系统的模型,和作为在人类免疫、癌症、传染病和其他领域的研究中的人自然杀伤(NK)细胞和其他白介素15(IL-15)依赖性细胞群体和过程的功能和调节的模型的免疫缺陷小鼠。根据特定的方面,提供了一种经遗传修饰以表达人白介素15的免疫缺陷小鼠,其中该小鼠没有或不产生功能性小鼠自然杀伤细胞,并且其中该小鼠经修饰以包括人自然杀伤细胞。

背景技术

[0004] 在人类免疫、癌症、传染病和其他领域的研究中,持续地需要人自然杀伤(NK)细胞和其他白介素15(IL-15)依赖性细胞群体和过程的功能和调节的小鼠模型。人NK细胞在体内介导针对人类肿瘤的抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)。然而,由于缺乏人IL-15,难以研究人NK细胞在癌症免疫治疗中的体内作用。人IL-15是成熟的人功能性NK细胞的体内发育和存活所需要的,且小鼠IL-15不支持人NK细胞的发育。IL-15由包括骨髓基质细胞的多种细胞类型产生。据报道,当IL-15分泌细胞表达IL-15受体α(IL-15rα)时,IL-15的活性提高。IL-15:IL-15rα复合物转呈给NK细胞和其他IL-15反应性细胞。如本文所示,出乎意料的是,表达人IL-15的免疫缺陷小鼠支持人NK细胞的发育而不需要供应IL-15rα或任何其他因子。本发明的表达人IL-15的免疫缺陷小鼠提供了一种用于评估NK细胞介导的ADCC的小鼠模型系统,一种在人类免疫、癌症、传染病和其他领域的研究中人自然杀伤(NK)细胞和其他白介素15(IL-15)依赖性细胞群体和过程的功能和调节的模型。

发明内容

[0005] 根据本发明的方面,提供了经遗传修饰以在其基因组中包括编码人白介素15(hu-IL-15)的核苷酸序列的免疫缺陷小鼠,其中所述小鼠表达hu-IL-15。根据特别的方面,经遗传修饰以在其基因组中包括编码人白介素15(hu-IL-15)的核苷酸序列的免疫缺陷小鼠特征在于不存在功能性内源小鼠NK细胞。根据特别的方面,经遗传修饰以在其基因组中包括编码人白介素15(hu-IL-15)的核苷酸序列的免疫缺陷小鼠为IL-2RG null,使得其缺乏功能性内源IL-2RG基因,并且特征在于不存在功能性内源小鼠NK细胞。根据特别的方面,经遗传修饰以在其基因组中包括编码人白介素15(hu-IL-15)的核苷酸序列的免疫缺陷小鼠还包括包含人肿瘤细胞的人异种移植物。

[0006] 根据本发明的方面,提供了经遗传修饰以在其基因组中包括编码人白介素15(hu-

IL-15)的核苷酸序列的免疫缺陷的NSG、NRG或NOG小鼠，其中该NSG、NRG或NOG小鼠表达hu-IL-15。根据特别的方面，经遗传修饰以在其基因组中包括编码hu-IL-15的核苷酸序列的免疫缺陷NSG、NRG或NOG小鼠特征在于不存在功能性内源小鼠NK细胞。根据特别的方面，经遗传修饰以在其基因组中包括编码人白介素-15(hu-IL-15)的核苷酸序列的免疫缺陷NSG、NRG或NOG小鼠为IL-2RG null以使得其缺乏功能性内源IL-2RG基因，且特征在于不存在功能性内源小鼠NK细胞。根据特别的方面，经遗传修饰以在其基因组中包括编码hu-IL-15的核苷酸序列的免疫缺陷NSG、NRG或NOG小鼠还包括包含人肿瘤细胞的人异种移植物。

[0007] 根据本发明的方面，提供了经遗传修饰以在其基因组中包括编码hu-IL-15的核苷酸序列的免疫缺陷小鼠，其中所述小鼠表达hu-IL-15，并且其中所述小鼠还包括人造血干细胞、人外周血单核细胞(PBMC)、人NK细胞、人NK细胞系细胞或其任意两种或更多种的组合。根据特别的方面，经遗传修饰以在其基因组中包括编码hu-IL-15的核苷酸序列的免疫缺陷小鼠特征在于不存在功能性内源小鼠NK细胞。根据特别的方面，经遗传修饰以在其基因组中包括编码hu-IL-15的核苷酸序列的免疫缺陷小鼠为IL-2RG null，使得其缺乏功能性内源IL-2RG基因并且特征在于不存在功能性内源小鼠NK细胞。根据特别的方面，提供了经遗传修饰以在其基因组中包括编码hu-IL-15的核苷酸序列的免疫缺陷小鼠，其中所述小鼠表达hu-IL-15，并且其中所述小鼠包括人造血干细胞、人外周血单核细胞(PBMC)、人NK细胞、人NK细胞系细胞或其任意两种或更多种的组合，并且还包括含有人肿瘤细胞的人异种移植物。

[0008] 根据本发明的方面，提供了经遗传修饰以在其基因组中包括编码hu-IL-15的核苷酸序列的免疫缺陷NSG、NRG或NOG小鼠，其中NSG、NRG或NOG小鼠表达hu-IL-15，和其中小鼠进一步包括人造血干细胞、人外周血单核细胞(PBMC)、人NK细胞、人NK细胞系细胞或其任意两种或更多种的组合。根据特别的方面，经遗传修饰以在其基因组中包括编码hu-IL-15的核苷酸序列的免疫缺陷NSG、NRG或NOG小鼠特征在于不存在功能性内源小鼠NK细胞。根据特别的方面，经遗传修饰以在其基因组中包括编码hu-IL-15的核苷酸序列的免疫缺陷NSG、NRG或NOG小鼠为IL-2RG null，使得其缺乏功能性内源IL-2RG基因并且特征在于不存在功能性内源小鼠NK细胞。根据特别的方面，经遗传修饰以在其基因组中包括编码hu-IL-15的核苷酸序列的免疫缺陷NSG、NRG或NOG小鼠表达hu-IL-15，其中所述小鼠进一步包括人造血干细胞、人外周血单核细胞(PBMC)、人NK细胞、人NK细胞系细胞或其任意两种或更多种的组合，且其中小鼠进一步包括包含人肿瘤细胞的人异种移植物。

[0009] 根据本发明的方面，提供了一种经遗传修饰以在其基因组中包括编码人白介素15(hu-IL-15)的核苷酸序列的免疫缺陷小鼠，其中所述小鼠表达hu-IL-15，并且其中所述小鼠还包括人NK细胞系细胞和/或人自然杀伤细胞，其中所述人自然杀伤细胞通过人造血干细胞在小鼠中的分化和/或通过施用包括人自然杀伤细胞的PBMC，和/或通过施用纯化的人NK细胞而在小鼠中产生。根据特别的方面，经遗传修饰以在其基因组中包括编码人白介素15(hu-IL-15)的核苷酸序列的免疫缺陷小鼠特征在于不存在功能性内源小鼠NK细胞。根据特别的方面，经遗传修饰以在其基因组中包括编码人白介素15(hu-IL-15)的核苷酸序列的免疫缺陷小鼠为IL-2RG null，使得其缺乏功能性内源IL-2RG基因，并且特征在于不存在功能性内源小鼠NK细胞。根据特别的方面，经遗传修饰以在其基因组中包括编码人白介素15(hu-IL-15)的核苷酸序列的免疫缺陷小鼠表达hu-IL-15，其中该小鼠进一步包括人NK细胞

系细胞和/或人自然杀伤细胞，其中人自然杀伤细胞通过在小鼠中人造血干细胞的分化和/或通过施用包括人自然杀伤细胞的PBMC，和/或通过施用纯化的人NK细胞而在小鼠中产生，且其中小鼠进一步包括包含人肿瘤细胞的人异种移植物。

[0010] 根据本发明的方面，提供了经遗传修饰以在其基因组中包括编码人白介素15(hu-IL-15)的核苷酸序列的免疫缺陷的NSG、NRG或NOG小鼠，其中该NSG、NRG或NOG小鼠表达hu-IL-15，并且其中该小鼠进一步包括人NK细胞系细胞和/或人自然杀伤细胞，其中人自然杀伤细胞通过在小鼠中人造血干细胞的分化和/或通过施用包括人自然杀伤细胞的PBMC，和/或通过施用纯化的人NK细胞而在小鼠中产生。根据特别的方面，经遗传修饰以在其基因组中包括编码人白介素15(hu-IL-15)的核苷酸序列的免疫缺陷NSG、NRG或NOG小鼠特征在于不存在功能性内源小鼠NK细胞。根据特别的方面，经遗传修饰以在其基因组中包括编码人白介素-15(hu-IL-15)的核苷酸序列的免疫缺陷NSG、NRG或NOG小鼠为IL-2RG null，使得其缺乏功能性内源IL-2RG基因，且特征在于不存在功能性内源小鼠NK细胞。根据特别的方面，经遗传修饰以在其基因组中包括编码人白介素15(hu-IL-15)的核苷酸序列的免疫缺陷NSG、NRG或NOG小鼠表达hu-IL-15，其中所述小鼠进一步包括人NK细胞系细胞和/或人自然杀伤细胞，其中人自然杀伤细胞通过在小鼠中人造血干细胞的分化和/或通过施用包括人自然杀伤细胞的PBMC，和/或通过施用纯化的人NK细胞在小鼠中产生，且其中所述小鼠进一步包括包含人肿瘤细胞的人异种移植物。

[0011] 根据本发明的方面，提供了一种鉴定测试物质的抗肿瘤活性的方法，该方法包括提供根据本发明的方面的经遗传修饰以在其基因组中包括编码Hu-IL-15的核苷酸序列的免疫缺陷小鼠，其中该小鼠表达Hu-IL-15；向免疫缺陷小鼠施用人肿瘤细胞，其中人肿瘤细胞在遗传修饰的免疫缺陷小鼠中形成实体或非实体肿瘤；向免疫缺陷小鼠施用测试物质；和测定实体或非实体肿瘤对测试物质的反应，其中测试物质对肿瘤和/或肿瘤细胞的抑制性作用确定测试物质具有抗肿瘤活性。根据特别的方面，经遗传修饰以在其基因组中包括编码hu-IL-15的核苷酸序列的免疫缺陷小鼠(其中该小鼠表达hu-IL-15)特征在于不存在功能性内源小鼠NK细胞，且该方法包括向免疫缺陷小鼠施用人肿瘤细胞，其中人肿瘤细胞在遗传修饰的免疫缺陷小鼠中形成实体或非实体肿瘤；向免疫缺陷小鼠施用测试物质；和测定实体或非实体肿瘤对测试物质的反应，其中测试物质对肿瘤和/或肿瘤细胞的抑制性作用确定测试物质具有抗肿瘤活性。根据特别的方面，经遗传修饰以在其基因组中包括编码hu-IL-15的核苷酸序列的免疫缺陷小鼠(其中该小鼠表达hu-IL-15)是IL-2RG null，使得它缺乏功能性内源IL-2RG基因，且特征在于不存在功能性内源小鼠NK细胞，且该方法包括向免疫缺陷小鼠施用人肿瘤细胞，其中人肿瘤细胞在遗传修饰的免疫缺陷小鼠中形成实体或非实体肿瘤；向免疫缺陷小鼠施用测试物质；和测定实体或非实体肿瘤对测试物质的反应，其中测试物质对肿瘤和/或肿瘤细胞的抑制性作用确定测试物质具有抗肿瘤活性。根据特别的方面，经遗传修饰以在其基因组中包括编码hu-IL-15的核苷酸序列的免疫缺陷小鼠(其中该小鼠表达hu-IL-15)是遗传修饰的NSG、NRG或NOG小鼠，其特征在于不存在功能性内源小鼠NK细胞，且其中小鼠进一步包括人NK细胞系细胞和/或人自然杀伤细胞，其中人自然杀伤细胞通过在小鼠中人造血干细胞的分化和/或通过施用包括人自然杀伤细胞的PBMC，和/或通过施用纯化的人NK细胞而在小鼠中产生，且该方法包括向免疫缺陷小鼠施用人肿瘤细胞，其中人肿瘤细胞在遗传修饰的免疫缺陷小鼠中形成实体或非实体肿瘤；向免

疫缺陷小鼠施用测试物质;和测定实体或非实体肿瘤对测试物质的反应,其中测试物质对肿瘤和/或肿瘤细胞的抑制性作用确定测试物质具有抗肿瘤活性。

[0012] 根据特别的方面,经遗传修饰以在其基因组中包括编码hu-IL-15的核苷酸序列的免疫缺陷小鼠(其中该小鼠表达hu-IL-15)是IL-2RG null,使得其缺乏功能性内源IL-2RG基因,其特征在于不存在功能性内源小鼠NK细胞,其中小鼠进一步包括人NK细胞系细胞和/或人自然杀伤细胞,其中人自然杀伤细胞通过在小鼠中人造血干细胞的分化和/或通过施用包括人自然杀伤细胞的PBMC,和/或通过施用纯化的人NK细胞而在小鼠中产生,且该方法包括向免疫缺陷小鼠施用人肿瘤细胞,其中人肿瘤细胞在遗传修饰的免疫缺陷小鼠中形成实体或非实体肿瘤;向免疫缺陷小鼠施用测试物质;和测定实体或非实体肿瘤对测试物质的反应,其中测试物质对肿瘤和/或肿瘤细胞的抑制性作用确定测试物质具有抗肿瘤活性。

[0013] 根据特别的方面,经遗传修饰以在其基因组中包括编码hu-IL-15的核苷酸序列的免疫缺陷小鼠是遗传修饰的NSG、NRG或NOG小鼠(其中该小鼠表达hu-IL-15),其是IL-2RG null,使得其缺乏功能性内源IL-2RG基因,其特征在于不存在功能性内源小鼠NK细胞,其中小鼠进一步包括人NK细胞系细胞和/或人自然杀伤细胞,其中人自然杀伤细胞通过在小鼠中人造血干细胞的分化和/或通过施用包括人自然杀伤细胞的PBMC,和/或通过施用纯化的人NK细胞而在小鼠中产生,且该方法包括向免疫缺陷小鼠施用人肿瘤细胞,其中人肿瘤细胞在遗传修饰的免疫缺陷小鼠中形成实体或非实体肿瘤;向免疫缺陷小鼠施用测试物质;和测定实体或非实体肿瘤对测试物质的反应,其中测试物质对肿瘤和/或肿瘤细胞的抑制性作用确定测试物质具有抗肿瘤活性。

[0014] 根据特别的方面,该方法还包括将所述反应与标准进行比较以确定测试物质对人肿瘤细胞的作用,其中测试物质对人肿瘤细胞的抑制性作用确定测试物质具有抗肿瘤活性。

[0015] 根据特别的方面,测试物质是或包括免疫治疗剂。

[0016] 根据特别的方面,测试物质是或包括免疫检查点抑制剂。

[0017] 根据特别的方面,免疫检查点抑制剂是或包括PD-1抑制剂、PD-L1抑制剂或CTLA-4抑制剂。

[0018] 根据特别的方面,免疫检查点抑制剂是或包括作为阿特珠单抗、阿维鲁单抗、德瓦鲁单抗、伊匹单抗、纳武单抗或派姆单抗的免疫检查点抑制剂,或免疫检查点抑制剂包括上述任何一种的抗原结合片段。

[0019] 根据特别的方面,测试物质是或包括抗体。

[0020] 根据特别的方面,测试物质是或包括抗癌剂。

[0021] 根据本发明的方面,提供了一种制备遗传修饰的、免疫缺陷的人源化小鼠模型的方法,其包括提供根据本发明的方面的经遗传修饰以在其基因组中包括编码hu-IL-15的核苷酸序列的免疫缺陷小鼠,其中该小鼠表达hu-IL-15;和向免疫缺陷小鼠施用人造血干细胞、人NK细胞系细胞、人PBMC、纯化的人NK细胞或其任何两种或更多种的组合。

[0022] 根据本发明的方面,提供了一种制备遗传修饰的、免疫缺陷的人源化小鼠模型的方法,其包括提供经遗传修饰以在其基因组中包括编码hu-IL-15的核苷酸序列的免疫缺陷小鼠,其中该小鼠表达hu-IL-15,且其特征在于不存在功能性内源小鼠NK细胞;且该方法包括向免疫缺陷小鼠施用造血干细胞、人NK细胞系细胞、人PBMC、纯化的人NK细胞或其任何两

种或更多种的组合。根据特别的方面，经遗传修饰以在其基因组中包括编码人白介素-15(hu-IL-15)的核苷酸序列的免疫缺陷小鼠是IL-2RG null，使得其缺乏功能性内源IL-2RG基因，且特征在于不存在功能性内源小鼠NK细胞；且该方法包括向免疫缺陷小鼠施用造血干细胞、人NK细胞系细胞、人PBMC、纯化的人NK细胞或其任何两种或更多种的组合。

[0023] 根据本发明的方面，提供了一种制备遗传修饰的、免疫缺陷的人源化小鼠模型的方法，其包括提供根据本发明的方面提供的经遗传修饰以在其基因组中包括编码hu-IL-15的核苷酸序列的NSG、NRG或NOG小鼠，其中小鼠表达hu-IL-15；和向遗传修饰的NSG、NRG或NOG小鼠施用造血干细胞、人NK细胞系细胞、人PBMC、纯化的人NK细胞或其任何两种或更多种的组合。根据各个方面，免疫缺陷小鼠在施用人造血干细胞之前进行调理以减少小鼠的小鼠造血细胞。调理免疫缺陷小鼠以减少小鼠的小鼠造血细胞可包括照射遗传修饰的免疫缺陷小鼠和/或向遗传修饰的免疫缺陷小鼠施用拟放射药物。根据各个方面，在施用人造血干细胞之前，不进行调理来减少小鼠的小鼠造血细胞。根据各个方面，制备遗传修饰的、免疫缺陷的人源化小鼠模型的方法进一步包括向免疫缺陷小鼠施用包含人肿瘤细胞的异种移植物。

[0024] 根据本发明的方面，提供了一种制备遗传修饰的、免疫缺陷的人源化小鼠模型的方法，其包括提供经遗传修饰以在其基因组中包括编码hu-IL-15的核苷酸序列的NSG、NRG或NOG小鼠，其中遗传修饰的NSG、NRG或NOG小鼠表达hu-IL-15，且特征在于不存在功能性内源小鼠NK细胞；且该方法包括向遗传修饰的NSG、NRG或NOG小鼠施用人造血干细胞。根据特别的方面，经遗传修饰以在其基因组中包括编码人白介素-15(hu-IL-15)的核苷酸序列的NSG、NRG或NOG小鼠是IL-2RG null，使得其缺乏功能性内源IL-2RG基因，且特征在于不存在功能性内源小鼠NK细胞；和该方法包括向免疫缺陷小鼠施用造血干细胞、人NK细胞系细胞、人PBMC、纯化的人NK细胞或其任何两种或更多种的任何组合。根据各个方面，在施用造血干细胞、人NK细胞系细胞、人PBMC、纯化的人NK细胞或其任意两种或更多种的任何组合之前，免疫缺陷小鼠进行调理以减少小鼠的小鼠造血细胞。调理免疫缺陷小鼠以减少小鼠的小鼠造血细胞可包括照射遗传修饰的免疫缺陷小鼠和/或向遗传修饰的免疫缺陷小鼠施用拟放射药物。根据各个方面，在向免疫缺陷小鼠施用造血干细胞、人NK细胞系细胞、人PBMC、纯化的人NK细胞或其任意两种或更多种的任何组合之前，不进行调理来减少小鼠的小鼠造血细胞。根据各个方面，制备遗传修饰的、免疫缺陷的人源化小鼠模型的方法进一步包括向免疫缺陷小鼠施用包含人肿瘤细胞的异种移植物。

[0025] 附图简要说明

[0026] 在本文中分析统计学显著性的所有数字中，*表示P<0.05，**表示P<0.01，***表示P<0.001，和****表示P<0.0001。

[0027] 图1是显示来自NSG-Tg(Hu-IL15)半合子的血清中的人IL15水平的图。

[0028] 图2是显示来自NSG-Tg(Hu-IL15)纯合子的血清中的人IL15水平的图。

[0029] 图3是显示HSC移植的NSG-Tg(Hu-IL15)小鼠与HSC移植的NSG小鼠相比存活率相似的图。在本研究中，NSG或NSG-Tg(Hu-IL15)小鼠(6至8周龄)进行照射(200cGy)，并静脉内(IV)注射源自脐带血的100,000个CD34+HSC。监测两组小鼠的存活率。

[0030] 图4是显示HSC移植的NSG-Tg(Hu-IL15)小鼠血液中具有加速的CD45+细胞的发育的图。在本研究中，对NSG或NSG-Tg(Hu-IL15)小鼠(6至8周龄)进行照射(200cGy)，并IV注射

源自脐带血的100,000个CD34+HSC。通过流式细胞术监测外周血中CD45+细胞的水平。

[0031] 图5是显示NSG-Tg(Hu-IL15)小鼠与NSG小鼠相比的%hCD45植入的图。

[0032] 图6为显示HSC移植的NSG-Tg(Hu-IL15)小鼠在血液中显示出相似的人T细胞发育的图。在本研究中,对NSG或NSG-Tg(Hu-IL15)小鼠(6至8周龄)进行照射(200cGy),并IV注射源自脐带血的100,000个CD34+HSC。通过流式细胞术监测外周血中的人CD3+T细胞水平。

[0033] 图7显示血细胞亚型的流式细胞术分析的结果。

[0034] 图8是显示HSC移植的NSG-Tg(Hu-IL15)小鼠在血液中显示出人NK细胞发育增加的图。在本研究中,对NSG或NSG-Tg(Hu-IL15)小鼠(6至8周龄)进行照射(200cGy),并IV注射源自脐带血的100,000个CD34+HSC。通过流式细胞术监测外周血中的人CD56+/CD16+NK细胞水平。

[0035] 图9是显示移植的NSG-Tg(Hu-IL15)小鼠在血液中显示出较低比例的人B细胞的图。在本研究中,对NSG或NSG-Tg(Hu-IL15)小鼠(6至8周龄)进行照射(200cGy),并IV注射源自脐带血的100,000个CD34+HSC。通过流式细胞术监测外周血中的人CD20+B细胞水平。

[0036] 图10是显示HSC移植的NSG-Tg(Hu-IL15)小鼠在血液中具有相似的人骨髓细胞的发育的图。在本研究中,对NSG或NSG-Tg(Hu-IL15)小鼠(6至8周龄)进行照射(200cGy),并IV注射源自脐带血的100,000个CD34+HSC。通过流式细胞术监测外周血中的CD33+骨髓细胞水平。

[0037] 图11是显示HSC移植的NSG-Tg(Hu-IL15)小鼠在血液中显示出人NK细胞的一致数量的图。在本研究中,对NSG或NSG-Tg(Hu-IL15)小鼠(6至8周龄)进行照射(200cGy),并IV注射源自脐带血的100,000个CD34+HSC。通过流式细胞术监测外周血中的人CD56+/CD16+NK细胞的总细胞水平。

[0038] 图12A是显示来自HSC移植的NSG-Tg(Hu-IL15)小鼠的人NK细胞表达较高水平的颗粒酶B的图。在本研究中,对NSG或NSG-Tg(Hu-IL15)小鼠(6至8周龄)进行照射(200cGy),并IV注射源自脐带血的100,000个CD34+HSC。在注射后16周,通过流式细胞术评价血液和脾脏中人CD56+/CD16+NK细胞的颗粒酶B的表达。

[0039] 图12B是显示来自HSC移植的NSG-Tg(Hu-IL15)小鼠的NK细胞表达较高水平的颗粒酶B的图。在本研究中,对NSG或NSG-Tg(Hu-IL15)小鼠(6至8周龄)进行照射(200cGy),并IV注射来自脐带血的100,000个CD34+HSC。在注射后16周,通过流式细胞术评价血液和脾脏中人CD56+/CD16+NK细胞的颗粒酶B的表达。

[0040] 图13A是显示与NSG小鼠相比,NSG-Tg(IL15)小鼠血和脾脏中穿孔素阳性(穿孔素+)NK细胞的%的图。

[0041] 图13B是显示与NSG小鼠相比,NSG-Tg(IL15)小鼠脾脏中穿孔素的表达增加的图。

[0042] 图14显示使用NSG-Tg(IL15)小鼠和NSG小鼠的细胞进行的流式细胞术分析的结果。

[0043] 图15是显示来自HSC移植的NSG-Tg(Hu-IL15)小鼠的人NK细胞杀死NK敏感靶标(K562细胞)的图。在本研究中,人NK细胞从HSC移植的NSG-Tg(Hu-IL15)小鼠的脾脏或人PBMC富集,并使用标准的Cr^{51}释放试验评价裂解K562靶细胞的能力。NK细胞和K562细胞一起孵育20小时,并定量Cr^{51}的释放。

具体实施方式

[0044] 本文中使用的科学和技术术语旨在具有本领域普通技术人员通常理解的含义。这些术语在各种标准参考文献的上下文中定义和使用，其说明性地包括J.Sambrook和D.W.Russell,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory Press;3rd Ed.,2001;F.M.Ausubel,Ed.,Short Protocols in Molecular Biology,Current Protocols;5th Ed.,2002;B.Alberts等,Molecular Biology of the Cell,4th Ed.,Garland,2002;D.L.Nelson和M.M.Cox,Lehninger Principles of Biochemistry,4th Ed.,W.H.Freeman&Company,2004;Engelke,D.R.,RNA Interference (RNAi):Nuts and Bolts of RNAi Technology,DNA Press LLC,Eagleville,PA,2003;Herdewijn,P.(Ed.),Oligonucleotide Synthesis:Methods and Applications,Methods in Molecular Biology,Humana Press,2004;A.Nagy,M.Gertsenstein,K.Vintersten,R.Behringer,Manipulating the Mouse Embryo:A Laboratory Manual,3rd edition,Cold Spring Harbor Laboratory Press;December 15,2002,ISBN-10:0879695919;Kursad Turksen(Ed.),Embryonic stem cells:methods and protocols in Methods Mol Biol.2002;185,Humana Press;Current Protocols in Stem Cell Biology,ISBN:9780470151808;Chu,E.和Devita,V.T.,Eds.,Physicians'Cancer Chemotherapy Drug Manual,Jones&Bartlett Publishers,2005;J.M.Kirkwood等,Eds.,Current Cancer Therapeutics,4th Ed.,Current Medicine Group,2001;Remington:The Science and Practice of Pharmacy,Lippincott Williams&Wilkins,21st Ed.,2005;L.V.Allen,Jr.等,Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems,8th Ed.,Philadelphia,PA:Lippincott,Williams&Wilkins,2004;及L.Brunton等,Goodman&Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics,McGraw-Hill Professional,12th Ed.,2011。

[0045] 单数术语“一”、“一个”和“该”不是意图限制的，而是包括复数指代，除非另有明确说明或上下文清楚表明另外的情况。

[0046] 术语“包含”是指开放的组，例如，包含成员A、B和C的组也可以包括另外的成员。术语“由…组成”是指封闭的组，例如，由成员A、B和C组成的组不包括任何其他成员。

[0047] 本发明的小鼠模型是经遗传修饰以表达人IL-15的免疫缺陷小鼠，且在本文中称为“免疫缺陷hu-IL-15小鼠”。本文描述的免疫缺陷hu-IL-15小鼠模型通过消除NK细胞与人IL-15体外培养和体内重复注射重组IL-15的需要而提供了高通量体内测试人NK细胞介导的免疫治疗的平台。

[0048] 免疫缺陷Hu-IL-15小鼠

[0049] 本发明的方面涉及一种经遗传修饰以使得小鼠的基因组包括编码人IL-15的核酸的免疫缺陷小鼠(hu-IL-15小鼠)，其中该免疫缺陷的hu-IL-15小鼠表达人IL-15，和其中免疫缺陷的hu-IL-15小鼠包括人造血干细胞。本发明的方面涉及经遗传修饰以使得小鼠的基因组包括编码人IL-15的核酸的免疫缺陷hu-IL-15小鼠(hu-IL-15小鼠)，其中免疫缺陷hu-IL-15小鼠表达人IL-15，且其中免疫缺陷hu-IL-15小鼠包括分化的人造血干细胞，特别是人NK细胞。

[0050] 在特别的方面，编码人IL-15的核苷酸序列被整合到小鼠的选择细胞的基因组中。

例如,编码人IL-15的核苷酸序列整合到小鼠生殖细胞的基因组中,从而使编码人IL-15的核苷酸序列能够遗传给该小鼠的后代。

[0051] 人IL-15在本文中被确定为SEQ ID NO:1,且其功能变体在本发明中是有用的。

[0052] 本文中涉及人IL-15使用的术语"功能变体"是指保留人IL-15的生物活性的蛋白质。功能变体包括,例如,保留了与人IL-15Rα特异性结合以及调节人NK细胞的激活、增殖和发育的能力的SEQ ID NO:1的人IL-15的那些变体。

[0053] 本发明的特定方面涉及一种免疫缺陷的hu-IL-15小鼠,其基因组包括编码具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的人IL-15,或与SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列具有至少85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.4%或更大的序列同一性的其功能变体的核苷酸序列。

[0054] 根据本发明的方面,免疫缺陷的hu-IL-15小鼠表达编码具有SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列的人IL-15或与SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列具有至少85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.4%或更大的序列同一性的其功能变体的mRNA。

[0055] 根据本发明的方面,免疫缺陷的hu-IL-15小鼠表达具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的人蛋白IL-15或与SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列具有至少85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.4%或更大的序列同一性的其功能变体。

[0056] 根据本发明的方面,免疫缺陷的hu-IL-15小鼠在其基因组中包括与启动子可操作地连接的编码人IL-15的核酸,其中人IL-15包括SEQ ID NO:1的氨基酸序列,或由在高严格杂交条件下与SEQ ID NO:2杂交的核酸的互补序列编码的氨基酸序列。本领域技术人员将认识到,由于遗传密码的简并性质,可选核酸序列编码人IL-15及其功能变体,且这样的可选核酸可用于本文描述的组合物和方法中。

[0057] 为了确定两个氨基酸序列或两个核苷酸序列的百分同一性,序列为了最佳比较的目的而比对(例如,可以使用比对软件程序的默认参数在第一氨基酸或核苷酸序列中引入空位以与第二氨基酸或核苷酸序列进行最佳比对)。然后比较相应氨基酸位置或核苷酸位置处的氨基酸或核苷酸。当第一序列中的位置被与第二序列中相应位置的相同氨基酸或核苷酸占据时,则序列在该位置是相同的。两个序列之间的百分同一性是序列共有的相同位置数的函数(即,%同一性=相同比对位置数/比对位置总数*100%)。在一些实施方案中,两个序列具有相同的长度。

[0058] 两个序列之间的百分同一性的确定可以用数学算法来完成。用于两个序列的比较的数学算法的非限制实例是Karlin和Altschul,1990年,PNAS USA 87:2264-68的算法,例如,如Karlin和Altschul,1993年,PNAS USA 90:5873-77中修改的。这种算法被纳入Altschul等人,1990年,J.Mol.Biol.215:403的NBLAST和XBLAST程序中。BLAST核苷酸检索可以使用NBLAST核苷酸程序参数集进行,例如,评分=100,字长=12,以获得与本发明的核苷酸序列同源的核苷酸序列。BLAST蛋白质检索可以使用XBLAST程序参数集进行,例如,评分50,字长=3,以获得与本发明的蛋白质分子同源的氨基酸序列。为了获得用于比较目的的带空位比对,可以使用Gapped BLAST,如Altschul等人,1997年,Nucleic Acids Res.25:3389-02中所描述的。或者,PSI BLAST可以用于执行检测分子之间的远源关系的迭代检索(id.)。在使用BLAST、Gapped BLAST和PSI Blast时,使用相应程序(例如,XBLAST和NBLAST)

的默认参数(例如,参见NCBI网站)。用于比较序列的数学算法的另一优选的、非限制的实例是Myers和Miller,1988年,CABIOS 4:11-17的算法。这种算法被纳入了ALIGN程序(2.0版)中,其是GCG序列比对软件包的部分。在利用ALIGN程序比较氨基酸序列时,采用PAM120权重残基表、空位长度罚分12和空位罚分4。软件程序的Clustal包提供另外的用于比对序列的方法以确定百分序列同一性。

[0059] 两个序列之间的百分同一性使用类似于上述那些的技术来确定,具有或不具有允许的空位。在计算百分同一性时,通常只计算精确匹配。

[0060] 术语“杂交(hybridization)”和“杂交(hybridizes)”是指互补核酸的配对和结合。杂交根据如核酸的互补程度、核酸的解链温度T_M和杂交条件的严格性的因素在两个核酸之间以不同的程度发生,如本领域众所周知的。术语“杂交条件的严格性”是指温度、离子强度和相对于特定的常见添加剂如甲酰胺和Denhardt溶液的杂交介质的组成的条件。确定与指定核酸有关的特定杂交条件是常规的,且是本领域中众所周知的,例如,如J.Sambrook和D.W.Russell,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory Press;3rd Ed.,2001及F.M.Ausubel,Ed.,Short Protocols in Molecular Biology,Current Protocols;5th Ed.,2002中所描述的。高严格性杂交条件是指只允许基本上互补的核酸杂交的那些条件。通常,具有约85-100%互补性的核酸被认为是高度互补的且在高严格性条件下杂交。中等严格性条件以具有中等互补性(约50%-84%的互补性)的核酸以及具有高互补性水平的核酸进行杂交的条件来例示。相反,低严格性杂交条件是其中具有低互补性水平的核酸杂交的那些条件。

[0061] 术语“特异性的杂交”和“特异性地杂交”是指特定核酸与靶核酸的杂交,而不与样品中目标核酸以外的核酸实质性杂交。

[0062] 杂交和洗涤条件的严格性取决于几个因素,包括探针和靶标的TM以及杂交和洗涤条件的离子强度,如本领域技术人员所熟知的。杂交和实现所需杂交严格性的条件描述于,例如,Sambrook等,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory Press,2001;和Ausubel,F.等,(Eds.),Short Protocols in Molecular Biology,Wiley,2002中。

[0063] 突变可以使用标准分子生物学技术如定点诱变和PCR介导的诱变引入。本领域技术人员将认识到,一个或多个氨基酸突变可以在不改变人IL-15的功能特性的情况下引入。编码人IL-15的一个或多个核苷酸序列可以从编码人IL-15的基因和/或mRNA来改变,例如,以对于特定小鼠优化密码子使用,或者为了方便起见,例如添加或删除限制位点或者改变对克隆、扩增和/或测序具有挑战性的序列。

[0064] 保守氨基酸置换可以在人IL-15蛋白中进行以产生功能性人IL-15变体。保守氨基酸置换是本领域公认的一个氨基酸取代具有相似特性的另一氨基酸的置换。例如,每个氨基酸可以描述为具有以下特性中的一个或多个:电正性、电负性、脂肪族、芳香族、极性、疏水性和亲水性。保守置换是具有特定结构或功能特性的一个氨基酸替代具有相同特性的另一氨基酸的置换。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、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;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、蛋氨酸、脯氨酸、缬氨酸和色氨酸;且保守置换包括各个组内的氨基酸之间的置换。氨基酸也可以就空间效应或相对大小来描述,例如丙氨酸、半胱氨酸、天冬氨酸、甘氨酸、天冬酰胺、脯氨酸、苏氨酸、丝氨酸和缬氨酸通常都被认为是小的。

[0065] 术语“核酸”是指具有超过一个核苷酸的任何形式的RNA或DNA分子,包括单链、双链、寡核苷酸或多核苷酸。术语“核苷酸序列”是指核酸中核苷酸的排序。

[0066] 编码人IL-15及其变体的核酸可以使用众所周知的方法分离或重组地或合成地产生。

[0067] 根据本发明的方面提供了免疫缺陷的hu-IL-15小鼠,其基因组包括含有编码人IL-15或其功能变体的核苷酸序列的表达盒,其中小鼠表达编码的人IL-15或其功能变体。

[0068] 术语“表达构建体”和“表达盒”在本文中用于指包含所需编码序列(例如,编码人IL-15的核苷酸序列)以及包含一个或多个对可操作地连接的编码序列的表达必要或希望的调控元件的双链重组核苷酸序列。如本文使用的术语“调控元件”是指控制核苷酸序列表达的某些方面的核苷酸序列。示例性的调控元件说明性地包括增强子、内部核糖体进入位点(IRES)、内含子、复制起点、多腺苷化信号(pA)、启动子、转录终止序列和上游调控结构域,它们有助于核苷酸序列的复制、转录和转录后加工。本领域技术人员能够仅使用常规的实验在表达构建体中选择和使用这些和其他调控元件。表达构建体可以用众所周知的方法重组或合成地产生。

[0069] 本文所用的术语“可操作地连接”是指与第二核苷酸序列处于功能关系的核苷酸序列。

[0070] 如上所述,表达盒中包含的调控元件可以是启动子。

[0071] 如本文所用的术语“启动子”是指与待转录的编码核苷酸序列如编码所需氨基酸的核苷酸序列可操作地连接的调控核苷酸序列。启动子通常位于待转录的核苷酸序列的上游,并提供用于由RNA聚合酶和其他转录因子特异性结合的位点。因此,在本发明的特别的方面,编码人IL-15的核苷酸序列与启动子可操作地连接。在本发明的特别的方面,启动子是组成型启动子或诱导型启动子。在本发明的特别的方面,启动子提供遍在的、组织特异性的或细胞类型特异性的表达。

[0072] 可包括在表达构建体中的遍在启动子包括但不限于3-磷酸甘油酸激酶(PGK-1)启动子、β-肌动蛋白启动子、ROSA26启动子、热休克蛋白70(Hsp70)启动子、编码伸长因子1α(EF1)的EF-1α基因启动子、真核启动因子4A(EIF-4A1)启动子、氯霉素乙酰转移酶(CAT)启动子和巨细胞病毒(CMV)。

[0073] 启动子可以例如是组成型启动子。在本发明的特别的方面,免疫缺陷hu-IL-15小鼠在其基因组中包括编码人IL-15的核苷酸序列,其与组成型启动子可操作地连接。在特别的方面,启动子能够在宿主小鼠(例如免疫缺陷小鼠)中驱动基因表达。例如,启动子可以是CAG启动子。该CAG启动子包括巨细胞病毒早期增强子元件(“C”)、鸡β-肌动蛋白基因的第一外显子和第一内含子(“A”)以及兔β-球蛋白基因的剪接受体(“G”)。CAG启动子是众所周知的且在小鼠细胞中表现出稳定的表达(参见例如,Jun-ichi等人,1989年,Gene,79(2):269)。CAG启动子可以例如进行修饰以去除外显子。已知在小鼠中驱动稳定的基因表达的其他启动子包括巨细胞病毒(CMV)直接早期启动子和猿病毒40(SV40)早期启动子,其各自可以用于本发明的各种实施方案中。

[0074] 这些和其他启动子是本领域中已知的，如Abboud等，2003，J.Histochem&Cytochem.，51(7):941-49；Schorpp等，1996，Nucl.Acids Res.，24(9):1787-88；McBurney等，1994，Devel.Dynamics，200:278-93；和Majumder等，1996，Blood，87(8):3203-11中例示的。

[0075] 除了启动子外，还可以包括一个或多个增强子序列，例如但不限于巨细胞病毒(CMV)早期增强子元件和SV40增强子元件。

[0076] 在本发明的各个方面，另外包括的序列包括内含子序列，如β球蛋白内含子或通用内含子、转录终止序列和mRNA多腺苷化(pA)序列，例如但不限于SV40-pA、β-球蛋白-pA和AAT-pA。

[0077] 在本发明的各个方面，表达构建体包括在细菌细胞中扩增所需的序列，如选择标记(例如，卡那霉素或氨苄青霉素抗性基因)和复制起点。

[0078] 用于设计基因和在转基因构建体中定位启动子的方法是已知的(参见例如，Haruyama等人，2009年，Curr.Protoc.Cell Biol.，19.10)。

[0079] 根据本发明的方面提供了一种免疫缺陷的hu-IL-15，其基因组包括含有编码人IL-15或其功能变体的核苷酸序列的表达盒，其中核苷酸序列与启动子和多腺苷化信号可操作地连接，并且小鼠表达编码的人IL-15或其功能变体。

[0080] 表达构建体可以使用公知的方法引入受精小鼠卵母细胞、植入前小鼠胚胎或小鼠干细胞(胚胎干细胞或诱导多能干细胞)中以产生遗传修饰的小鼠。

[0081] 对于将表达构建体引入小鼠植入前胚胎中的方法，表达构建体可以在注射到胚胎中之前线性化。

[0082] 优选地，表达构建体注射到受精卵母细胞中。受精的卵母细胞在交配后一天(性交后0.5天)从超排卵雌性收集，并注射表达构建体。注射的卵母细胞培养过夜或直接转移到性交后0.5天假孕雌性的输卵管中。用于超排卵、卵母细胞收获、表达构建体注射和胚胎移植的方法是本领域已知的，且例如在Manipulating the Mouse Embryo:A Laboratory Manual，3rd edition，Cold Spring Harbor Laboratory Press；December 15，2002，ISBN-10:0879695919中描述。后代可以通过DNA分析(如PCR、DNA印迹或核苷酸测序)来测试编码人IL-15或其功能变体的外源核苷酸序列的存在。携带外源核苷酸序列的小鼠可以例如通过ELISA或蛋白质印迹分析来测试蛋白质的表达。

[0083] 或者，表达构建体通过如电穿孔、磷酸钙沉淀或脂质体转染的技术引入。细胞然后通过DNA分析如PCR、DNA印迹或核苷酸测序进行转基因整合的筛选。具有正确整合的细胞可以通过蛋白质分析来测试人IL-15或其功能变体的功能表达，例如使用ELISA或蛋白质印迹分析。

[0084] 胚胎干细胞在对于特定细胞系优化的培养基中生长。通常，胚胎干细胞培养基在Dulbecco's Modified Eagle Media(DMEM)中包含15％胎牛血清(FBS)或者合成或半合成等同物、2mM谷氨酰胺、1mM丙酮酸钠、0.1mM非必需氨基酸、50U/mL青霉素和链霉素、0.1mM 2-巯基乙醇及1000U/mL LIF(对于一些细胞系，加分化的化学抑制剂)。详细描述是本领域已知的(Tremml等人，2008年，Current Protocols in Stem Cell Biology，Chapter 1:Unit 1C.4)。有关胚胎干细胞分化的抑制剂的综述，参见Buehr等人，2003年，Genesis of embryonic stem cells，Philosophical Transactions of the Royal Society B:

Biological Sciences,358:1397-1402。

[0085] 合并表达构建体的所选择细胞可注射到植入前胚胎中。对于显微注射，胚胎干细胞或诱导多能干细胞使用胰蛋白酶和EDTA的混合物成为单细胞，然后重悬浮在胚胎干细胞培养基中。单细胞的组使用精细拉制的玻璃针(内径20-25微米)选择，并使用配备有显微操作器的倒置显微镜通过胚胎的透明带引入到囊胚的腔(囊胚腔)中。干细胞也可以注射到早期胚胎(例如，2-细胞、4-细胞、8-细胞、前桑椹或桑椹胚)中。注射可以用在透明带中激光或压电脉冲的钻孔辅助。每个囊胚或8-细胞阶段胚胎注射大约9-10个选择的干细胞(胚胎干细胞或诱导多能干细胞)，每4细胞阶段胚胎注射6-9个干细胞，和每2-细胞阶段胚胎注射大约6个干细胞。在干细胞引入后，允许胚胎在37℃下在氮气中5％CO_2，5％O_2中恢复几个小时，或培养过夜，然后转移到假孕受体雌性中。在干细胞注射的另一替代方式中，干细胞可以与桑椹期胚胎聚集。所有这些方法都是良好确立的，并可用于产生干细胞嵌合体。对于更详细的描述，参见例如，Manipulating the Mouse Embryo:A Laboratory Manual,3rd edition (Nagy,Gertsenstein,Vintersten,and Behringer,Cold Spring Harbor Laboratory Press,December 15,2002,ISBN-10:0879695919;也参见Nagy等人，1990,Development 110:815-821;Kraus等人，2010,Genesis 48:394-399;及美国专利号7,576,259,7,659,442和7,294,754)。

[0086] 假孕胚胎受体使用本领域中已知的方法制备。简言之，6-8周龄的可育雌性小鼠与切除输精管的或不育的雄性交配以诱导适用于支持手术引入的胚胎的激素状态。在性交后2.5天(dpc)，多达15个含干细胞的囊胚引入子宫角中非常接近子宫-输卵管接头。对于早期胚胎和桑椹胚，这种胚胎在体外培养成囊胚或根据胚胎阶段植入0.5dpc或1.5dpc的假孕雌性的输卵管中。来自植入胚胎的嵌合幼仔在移植后16-20天出生，这取决于植入时的胚胎年龄。选择嵌合雄性进行繁殖。后代可以通过毛色和/或遗传分析(如PCR、DNA印迹或核苷酸测序)来分析胚胎干细胞基因组的传递。蛋白质表达(例如，人IL-15或其功能变体)可通过蛋白质分析(蛋白质印迹、ELISA)或其他功能分析来进行分析。表达编码hu-IL-15或其功能变体的核苷酸序列的后代可以相互杂交以产生对于转基因纯合的小鼠。转基因小鼠可以与免疫缺陷小鼠杂交以产生表达hu-IL-15或其功能变体的同源免疫缺陷品系。

[0087] 编码hu-IL-15或其功能变体的核苷酸序列也可以靶向到已知导致可靠表达的干细胞基因组的特定基因座中，如Hprt或Rosa26基因座。对于靶向基因转移，靶向构建体可以使用重组DNA技术制备。靶向构建体可以任选地包括与内源基因靶标同源的5’和3’序列。靶向构建体可以任选地进一步包括选择标记，如新霉素磷酸转移酶、潮霉素或嘌呤霉素，例如编码人IL-15的核酸，和多腺苷化信号。为确保编码基因的核苷酸序列的正确转录和翻译，例如，该序列与内源基因座同框，或包括剪接受体位点和内部核糖体进入位点(IRES)序列。这样的靶向构建体可以转染到干细胞中，并且干细胞可以使用PCR、DNA印迹或核苷酸测序来筛选以检测同源重组事件。具有正确同源重组事件的细胞可以通过蛋白质分析如ELISA或蛋白质印迹分析进一步分析转基因表达。如果需要，可以去除选择标记，例如，通过用Cre重组酶处理干细胞。在Cre重组酶处理后，分析细胞中编码该基因的核苷酸序列的存在。具有正确的基因组事件的细胞可以选择并注射到植入前胚胎中，如上所述。选择嵌合雄性进行繁殖。后代可以通过毛色和遗传分析(如PCR、DNA印迹或核苷酸测序)来分析胚胎干细胞基因组的传递，并且它们可以例如通过蛋白质分析(蛋白质印迹、ELISA)或其他功能分析来

测试蛋白质表达。表达所需的IL-15或功能性IL-15变体蛋白的后代可以相互杂交以产生对于转基因纯合的小鼠。转基因小鼠可以与免疫缺陷小鼠杂交以产生具有转基因的同源免疫缺陷品系。

[0088] 本发明的特定实施方案提供了在其基本上所有细胞中包括编码人IL-15或其功能变体的核苷酸序列的转基因小鼠，以及在一些但不是所有细胞中包括编码人IL-15或其功能变体的核苷酸序列的转基因小鼠。在本发明的特别的方面，编码人IL-15或其功能变体的核苷酸序列的一个或多个拷贝(如串联体(concatamer))可以整合到转基因小鼠的细胞的基因组中。

[0089] 各种不同方法中的任何一种可以用于将编码人IL-15或其功能变体的核苷酸序列引入小鼠中以产生表达人IL-15或其功能变体的转基因小鼠。这类技术是本领域中公知的，且包括但不限于胚胎干细胞的前核显微注射和转化。可使用的用于产生转基因小鼠的方法包括但不限于Sundberg和Ichiki,(Eds.),Genetically Engineered Mice Handbook,CRC Press,2006;Hofker和van Deursen,(Eds.),Transgenic Mouse Methods and Protocols, Humana Press,2002;Joyner,Gene Targeting:A Practical Approach,Oxford University Press,2000;Manipulating the Mouse Embryo:A Laboratory Manual,3rd edition,Cold Spring Harbor Laboratory Press,December 15,2002,ISBN-10: 0879695919;Turksen(Ed.),Embryonic stem cells:methods and protocols in Methods Mol Biol.2002,185,Humana Press;Current Protocols in Stem Cell Biology,ISBN: 978047015180;Meyer等,PNAS USA,107(34):15022-26中描述的那些方法。

[0090] 基于同源性的重组遗传修饰策略可用于通过“敲入”对免疫缺陷小鼠进行遗传修饰，以将编码人IL-15或其功能变体的核苷酸序列引入免疫缺陷小鼠的基因组中，如归巢内切核酸酶、整合酶、大范围核酸酶、转座子、使用锌指核酸酶(ZFN)的核酸酶介导的过程、转录激活物样(TAL)、成簇规律间隔的短回文重复序列(CRISPR)-Cas或果蝇重组相关蛋白(DRAP)方法。参见例如，Cerbini等人，PLoS One.2015年;10(1):e0116032;Shen等人，PLoS ONE 8(10):e77696;和Wang等人，Protein&Cell，2016年2月，第7卷，第2期，152-156。

[0091] 免疫缺陷

[0092] 术语“免疫缺陷小鼠”是指特征在于以下一种或多种的小鼠：缺乏功能性免疫细胞，如T细胞和B细胞;DNA修复缺陷;淋巴细胞上编码抗原特异性受体的基因重排的缺陷;和缺乏免疫功能分子，如IgM、IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3和IgA。免疫缺陷小鼠可以特征在于涉及免疫功能的基因如Rag1和Rag2的一个或多个缺陷(Oettinger,M.A等人，Science，248: 1517-1523，1990;和Schatz,D.G.等人，Cell，59:1035-1048，1989)。免疫缺陷小鼠可以具有导致小鼠的免疫功能异常的这些或其他缺陷中的任一种。

[0093] 根据特别的方面，免疫缺陷hu-IL-15小鼠的编码白介素-2受体γ亚基(IL-2RG)的内源性基因存在缺陷，其导致小鼠表达有缺陷的内源性白介素-2受体γ亚基和/或减少量的内源性白介素-2受体γ亚基，或者小鼠可能完全不表达内源性白介素-2受体γ亚基。I12rg缺陷的主要后果是不存在功能性内源小鼠NK细胞。因此，根据本发明的特别的方面，免疫缺陷hu-IL-15小鼠具有I12rg缺陷，使得小鼠缺乏功能性内源小鼠NK细胞。根据进一步的特别的方面，本发明的免疫缺陷hu-IL-15小鼠为IL-2RG null，使得它缺乏功能性内源IL-2RG基因和缺乏功能性内源小鼠NK细胞。

[0094] 在进一步的方面，免疫缺陷的hu-IL-15小鼠在编码DNA依赖性蛋白激酶，催化亚基(Prkdc)的内源性基因中存在缺陷，这导致小鼠表达有缺陷的内源性DNA依赖性蛋白激酶，催化亚基和/或减少量的内源性DNA依赖性蛋白激酶，催化亚基，或者小鼠可能完全不表达内源性DNA依赖性蛋白激酶，催化亚基。本发明的免疫缺陷hu-IL-15小鼠可以任选地为Prkdc null，使得其缺乏功能性内源Prkdc基因。

[0095] 如本文涉及基因和他们编码的蛋白质使用的“内源性”是指在小鼠基因组中其天然基因座处存在的基因。

[0096] 在本发明的各个方面中，免疫缺陷的hu-IL-15小鼠为IL-2RG null和/或Prkdc null，从而缺乏功能性内源IL-2RG和Prkdc基因。本发明的免疫缺陷hu-IL-15小鼠可以任选地包括Prkdc敲除和/或IL-2rg敲除。在本发明的各个方面中，免疫缺陷的hu-IL-15小鼠不表达IL-2rg，不表达Prkdc，或不表达IL-2rg和Prkdc。

[0097] 在本发明的各个方面中，免疫缺陷的hu-IL-15小鼠具有严重的联合免疫缺陷。术语“严重的联合免疫缺陷”或“SCID”是指以不存在T细胞和缺乏B细胞功能为特征的状况。

[0098] SCID的常见形式包括：X-连锁SCID，其特征是IL-2RG基因中的γ链基因突变和淋巴细胞表型T(-)B(+)NK(-)，和常染色体隐性SCID。常染色体隐性SCID可以特征在于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-7Rα-链突变和淋巴细胞表型T(-)B(+)NK(+)，CD3δ或ε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(+)，及CD45基因突变和淋巴细胞表型T(-)B(+)NK(+)。

[0099] 根据本发明的方面，免疫缺陷的hu-IL-15小鼠具有严重的联合免疫缺陷突变($Prkdc^{scid}$)，通常称为scid突变。scid突变是众所周知的且位于小鼠16号染色体上，如Bosma等人，1989年，Immunogenetics 29:54-56中所描述的。对于scid突变纯合的小鼠特征是不存在功能性T细胞和B细胞、淋巴细胞减少症、低球蛋白血症和正常的造血微环境。例如，可以通过使用众所周知的方法如PCR或流式细胞术检测scid突变的标志物来检测scid突变。

[0100] 根据本发明的方面，免疫缺陷的hu-IL-15小鼠具有IL2受体γ链缺陷。术语“IL2受体γ链缺陷”是指IL2受体γ链减少。减少的IL2受体γ链可能是由于基因缺失或突变。减少的IL2受体γ链可以，例如，通过使用众所周知的方法检测IL2受体γ链基因缺失或突变和/或检测减少的IL2受体γ链表达来检测。

[0101] 根据本发明的方面，免疫缺陷的hu-IL-15小鼠具有严重的联合免疫缺陷或与严重的联合免疫缺陷结合的IL2受体γ链缺陷，其中小鼠的基因组包括编码人IL-15或其功能变体的核苷酸序列。

[0102] 根据本发明的方面，免疫缺陷的hu-IL-15小鼠具有scid突变或与scid突变结合的IL2受体γ链缺陷，其中小鼠的基因组包括编码人IL-15或其功能变体的核苷酸序列。

[0103] 在本发明的各个方面中，免疫缺陷的hu-IL-15小鼠是遗传修饰的NSG小鼠、遗传修饰的NRG小鼠或遗传修饰的NOG小鼠，其中遗传修饰的NSG、NRG或NOG小鼠的基因组包括编码人IL-15或其功能变体的核苷酸序列。

[0104] 术语“NOD scidγ”、“NOD-scid IL2Rg^{null}”和“NSG”在本文中可互换使用以指众所周知的免疫缺陷小鼠品系NOD.Cg-$Prkdc^{scid}$ IL-$2rg^{tm1Wjl}$/SzJ，其详细描述于Shultz LD等

人,2005年,J.Immunol,174:6477-89中。NSG小鼠组合了来自NOD/ShiLtJ背景的多种免疫缺陷、严重的联合免疫缺陷(scid)突变和白介素-2受体γ链的完全敲除。因此,NSG小鼠缺乏成熟的小鼠T、B和NK细胞,且它们是小鼠细胞因子信号传导途径缺陷的。NSG小鼠特征在于缺乏小鼠IL-2R-γ(γc)表达,没有可检测的小鼠血清免疫球蛋白,没有小鼠溶血补体,没有成熟的小鼠T淋巴细胞,且没有成熟的小鼠自然杀伤细胞。

[0105] 表达人IL-15或其功能变体的NSG小鼠可选地称为"NSG-hu-IL-15"小鼠或"NSG-Tg(Hu-IL15)"小鼠,这表明遗传修饰的NSG小鼠的基因组在NOD.Cg-Prkdc^{scid} IL-2rg^{tm1Wjl}/SzJ的背景上包括编码人IL-15或其功能变体的核苷酸序列,且小鼠表达人IL-15或其功能变体。

[0106] NRG小鼠通称为NOD.Cg-Rag1^{tm1Mom} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ,其详细描述于Shultz LD等人,2008,Clin Exp Immunol 154(2):270-84中。表达人IL-15或其功能变体的NRG小鼠称为"NRG-hu-IL-15"小鼠,这表明遗传修饰的NRG小鼠的基因组在NOD.Cg-Rag1^{tm1Mom} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ背景上包括编码人IL-15或其功能变体的核苷酸序列,且小鼠表达人IL-15或其功能变体。NRG小鼠特征在于缺乏小鼠自然杀伤(NK)细胞。

[0107] NOG小鼠通称为NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Sug}/JicTac,其详细描述于Ito,M.等人,Blood 100,3175-3182(2002年)中。表达人IL-15或其功能变体的NOG小鼠被为"NOG-hu-IL-15"小鼠,这表明遗传修饰的NOG小鼠的基因组在NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Sug}/JicTac背景上包括编码人IL-15或其功能变体的核苷酸序列,且小鼠表达人IL-15或其功能变体。NOG小鼠特征在于缺乏小鼠自然杀伤(NK)细胞。

[0108] 异种移植物

[0109] 分化为异种NK细胞的异种细胞、包括异种NK细胞的细胞群体或纯化的异种NK细胞群体施用于免疫缺陷的hu-IL-15小鼠,从而产生通过小鼠中异种细胞的分化而具有在小鼠中产生的自然杀伤细胞的免疫缺陷的hu-IL-15小鼠。在小鼠中分化为NK细胞的异种细胞包括异种造血干细胞。异种外周血单核细胞(PBMC)是包括异种NK细胞的细胞群体。

[0110] 造血干细胞异种移植物

[0111] 本发明的各个方面涉及将异种造血干细胞(HSC)施用于免疫缺陷的hu-IL-15小鼠,从而产生具有移植的HSC的免疫缺陷hu-IL-15小鼠。

[0112] 根据本发明的方面,异种HSC是人HSC。

[0113] 本文中使用的术语"异种HSC"是指表达c-Kit受体的多能干细胞。表达c-Kit受体的多能干细胞的例子包括但不限于造血干细胞,也称为成血细胞。C-Kit受体在本领域中是众所周知的,例如,如Vandenbark GR等,1992,Cloning and structural analysis of the human c-kit gene,Oncogene 7(7):1259-66;和Edling CE,Hallberg B,2007,c-Kit--a hematopoietic cell essential receptor tyrosine kinase,Int.J.Biochem.Cell Biol.39(11):1995-8中所描述的。

[0114] 异种HSC的分离、异种HSC对宿主小鼠的施用以及评估其在宿主小鼠体内的植入的方法是本领域众所周知的。

[0115] 用于施用于免疫缺陷的hu-IL-15小鼠的造血干细胞可从任何含有HSC的组织获得,例如但不限于脐带血、骨髓、GM-CSF动员的外周血和胎儿肝脏。

[0116] 异种HSC可通过经由各种途径施用到例如但不限于心脏、肝脏和/或面静脉中而施

用于新生小鼠中。异种HSC可通过各种途径施用于成体小鼠，例如但不限于施用到尾静脉中、股骨骨髓腔中或脾脏中。在进一步的例子中，包含异种HSC的胎儿肝脏可以在肾囊下植入。

[0117] 将异种HSC施用于免疫缺陷的hu-IL-15小鼠可包括向免疫缺陷的hu-IL-15小鼠施用包含异种HSC的组合物。该组合物可以进一步包括，例如，水、张力调节剂(例如，盐，如氯化钠)、pH缓冲剂(例如，柠檬酸盐)和/或糖(例如，葡萄糖)。

[0118] 异种造血干细胞在免疫缺陷的hu-IL-15小鼠中的植入特征在于在免疫缺陷的hu-IL-15小鼠中存在分化的异种造血细胞。异种HSC的植入可以通过各种不同方法中的任一种来评估，例如但不限于在HSC施用后一个或多个时间点施用异种HSC的动物中的细胞的流式细胞术分析。

[0119] 用于分离异种HSC、对宿主小鼠施用异种HSC和评估其植入的示例方法在本文中和在T.Pearson等，Curr.Protoc.Immunol.81:15.21.1-15.21.21,2008;Ito,M.等,Blood 100:3175-3182;Traggiai,E.等,Science 304:104-107;Ishikawa,F.等,Blood 106:1565-1573;Shultz,L.D.等,J.Immunol.174:6477-6489;Holyoake TL等,Exp Hematol.,1999,27(9):1418-27中描述。

[0120] 根据本发明的方面，施用于免疫缺陷的hu-IL-15小鼠的异种HSC从原始来源材料分离以获得HSC富集的细胞群体。分离的异种HSC可以是或不是纯的。根据各个方面，异种HSC通过针对细胞标志物如CD34选择来纯化。根据各个方面，施用的异种HSC是其中CD34+细胞占总细胞的约1％-100％的细胞群体，尽管可以使用其中CD34+细胞占总细胞的不到1％的细胞群体。根据实施方案，施用的异种HSC是T细胞耗尽的脐带血细胞(其中CD34+细胞占总细胞的约1-3％)、谱系耗尽的脐带血细胞(其中CD34+细胞占总细胞的约50％)或CD34+正向选择的细胞(其中CD34+细胞占总细胞的约90％)。

[0121] 施用的异种HSC的数量就免疫缺陷的hu-IL-15小鼠中异种造血和免疫系统的产生而言不认为是限制的。单个异种HSC可以在宿主免疫缺陷hu-IL-15小鼠中产生造血和免疫系统。因此，施用的异种HSC的数量通常在$1x10^3$到$1x10^6$(1,000到1,000,000)个CD34+细胞的范围内(其中受体是小鼠)，尽管可以使用更多或更少的细胞。

[0122] 因此，根据本发明的方面的方法可以包括向免疫缺陷hu-IL-15小鼠施用10^3(1000)至约10^6(1,000,000)、约10^3至约10^5、约10^4至约10^6、约10^5至约10^7、约1x 10^3至约1x 10^4、约5x 10^3至约5x 10^4、约1x 10^4至约1x 10^5、约5x 10^4至约5x 10^5、约1x 10^5至约1x 10^6、约5x 10^5至约5x 10^6、约1x 10^6至约1x 10^7、约2x 10^4至约5x 10^5或约5x 10^4至约2x 10^5个异种HSC，如人造血干细胞。该方法可以包括向免疫缺陷的hu-IL-15小鼠施用至少约1x 10^2、约2x 10^2、约3x 10^2、约4x 10^2、约5x 10^2、约6x 10^2、约7x 10^2、约8x 10^2、约9x 10^2、约1x 10^3、约2x 10^3、约3x 10^3、约4x 10^3、约5x 10^3、约6x 10^3、约7x 10^3、约8x 10^3、约9x 10^3、约1x 10^4、约2x 10^4、约3x 10^4、约4x 10^4、约5x 10^4、约6x 10^4、约7x 10^4、约8x 10^4、约9x 10^4、约1x 10^5、约2x 10^5、约3x 10^5、约4x 10^5、约5x 10^5、约6x 10^5、约7x 10^5、约8x 10^5、约9x 10^5、约1x 10^6、约2x 10^6、约3x 10^6、约4x 10^6、约5x 10^6、约6x 10^6、约7x 10^6、约8x 10^6、约9x 10^6或约1x 10^7个异种HSC，如人造血干细胞。该方法可以包括向免疫缺陷的hu-IL-15小鼠施用约1x 10^2、约2x 10^2、约3x 10^2、约4x 10^2、约5x 10^2、约6x 10^2、约7x 10^2、约8x 10^2、约9x 10^2、约1x 10^3、约2x 10^3、约3x 10^3、约4x 10^3、约5x 10^3、约6x 10^3、约7x 10^3、约8x 10^3、约9x 10^3、约1x

10^4、约2x 10^4、约3x 10^4、约4x 10^4、约5x 10^4、约6x 10^4、约7x 10^4、约8x 10^4、约9x 10^4、约1x 10^5、约2x 10^5、约3x 10^5、约4x 10^5、约5x 10^5、约6x 10^5、约7x 10^5、约8x 10^5、约9x 10^5、约1x 10^6、约2x 10^6、约3x 10^6、约4x 10^6、约5x 10^6、约6x 10^6、约7x 10^6、约8x 10^6、约9x 10^6或约1x 10^7个异种HSC，如人HSC。本领域技术人员能够仅使用常规实验确定应施用于特定小鼠的异种HSC的数量。

[0123] 在其中受体免疫缺陷hu-IL-15小鼠中异种HSC和/或从异种HSC分化的细胞在大多数任何施用的非HSC已经变性时被检测到的情况下，植入是成功的。例如，分化的异种HSC细胞的检测可以通过在受体免疫缺陷hu-IL-15小鼠中异种DNA的检测或完整的异种HSC和从异种HSC分化的细胞的检测来实现。CD34+细胞连续转移到二级受体和异种造血系统的植入是一级受体中HSC植入的进一步测试。植入可以通过流式细胞术检测为在施用异种HSC后10-12周在受体免疫缺陷hu-IL-15小鼠的血液、脾脏或骨髓中0.05％或更多的异种CD45+细胞。

[0124] 根据本发明的方面，在免疫缺陷的hu-IL-15小鼠中异种造血干细胞(HSC)的植入包括在施用异种HSC之前对免疫缺陷的hu-IL-15小鼠进行“调理”，例如通过对受体动物用高频电磁辐射进行亚致死照射，通常使用伽马辐射，或使用诸如白消安或氮芥的拟放射药物进行处理。调理被认为减少宿主造血细胞的数量，为异种HSC的植入创造适当的微环境因素，和/或为异种HSC的植入创造微环境生境。标准调理方法是本领域已知的，如本文中和J.Hayakawa等人，2009年，Stem Cells，27(1)：175-182中描述的。

[0125] 根据本发明的方面提供了包括向免疫缺陷的hu-IL-15小鼠施用异种HSC而在施用异种HSC前不对免疫缺陷的hu-IL-15小鼠进行“调理”的方法。根据本发明的方面提供的方法包括向免疫缺陷的hu-IL-15小鼠施用异种HSC而在施用异种HSC之前不对免疫缺陷的hu-IL-15小鼠通过辐射或拟放射药物进行“调理”。

[0126] 本发明的各个方面涉及将异种造血干细胞(HSC)施用于免疫缺陷的hu-IL-15小鼠，从而产生具有移植的HSC的免疫缺陷hu-IL-15小鼠。移植的异种HSC分化以产生具有异种免疫系统或其组分的免疫缺陷的hu-IL-15小鼠。

[0127] 异种HSC施用于免疫缺陷的hu-IL-15小鼠导致小鼠中产生造血谱系的分化异种细胞。例如，异种HSC施用于免疫缺陷的hu-IL-15小鼠导致小鼠产生异种骨髓谱系和异种淋巴谱系细胞，如异种$CD33^+$骨髓细胞、异种髓系祖细胞、异种肥大细胞、异种髓系树突状细胞、异种B细胞、异种T细胞、异种T辅助细胞、异种细胞毒性T细胞和/或异种T_{reg}细胞。根据本发明的方面，人HSC施用于免疫缺陷的hu-IL-15小鼠，其分化以使得小鼠包括以下的一种或多种：人$CD33^+$骨髓细胞、人髓系祖细胞、人肥大细胞、人髓系树突状细胞、人B细胞、人T细胞、人T辅助细胞、人细胞毒性T细胞和/或人T_{reg}细胞。

[0128] 异种HSC施用于免疫缺陷的hu-IL-15小鼠导致产生可通过流式细胞术表征的造血谱系的分化异种细胞。例如，人HSC施用于免疫缺陷的hu-IL-15小鼠导致产生可通过流式细胞术表征的造血谱系的分化人细胞，包括选自$CD45^+$、$CD20^+$、$CD20^+CD45^+$、$CD3^+$、$CD3^+CD45^+$、$CD33^+$、$CD33^+CD45^+$、$CD14^+$、$CD14^+CD45^+$、$CD56^+$和$CD56^+CD45^+$人白细胞中的1、2、3、4、5、6、7、8、9、10种或全部的人白细胞。

[0129] 人HSC施用于免疫缺陷的hu-IL-15小鼠导致产生造血谱系的分化人细胞，包括人NK细胞。

[0130] 外周血单核细胞异种移植物

[0131] 本发明的各个方面涉及向免疫缺陷的hu-IL-15小鼠施用异种外周血单核细胞(PBMC),从而产生具有异种NK细胞的免疫缺陷的hu-IL-15小鼠。

[0132] 根据本发明的方面,异种PBMC是人PBMC。

[0133] 本文所用的术语"异种PBMC"是指从外周血获得的细胞群体,其天然包括NK细胞,通常在1-10%的范围内,但可以更高或更低。

[0134] 异种PBMC的分离和异种PBMC施用于宿主小鼠是本领域中众所周知的。

[0135] 用于施用于免疫缺陷hu-IL-15小鼠的异种PBMC可从外周血获得。

[0136] 异种PBMC可通过各种途径的施用而施用到新生小鼠中,例如但不限于心脏、肝脏和/或面静脉中。异种PBMC可通过各种途径施用到成年小鼠中,例如但不限于施用到尾静脉中、股骨骨髓腔中或脾脏中。在进一步的实例中,含有异种PBMC的胎儿肝脏可以在肾囊下植入。

[0137] 异种PBMC施用于免疫缺陷的hu-IL-15小鼠可以包括向免疫缺陷的hu-IL-15小鼠施用包含异种PBMC的组合物。该组合物可以进一步包括,例如,水、张力调节剂(例如,盐,如氯化钠)、pH缓冲剂(例如,柠檬酸盐)和/或糖(例如,葡萄糖)。

[0138] 在免疫缺陷的hu-IL-15小鼠中异种PBMC的植入特征在于免疫缺陷的hu-IL-15小鼠中存在异种自然杀伤细胞。异种自然杀伤细胞的存在可以通过各种不同方法中的任一种来评估,例如但不限于在施用PBMC后的一个或多个时间点时施用异种PBMC的动物中的细胞的流式细胞术分析。

[0139] 根据本发明的方面,施用于免疫缺陷的hu-IL-15小鼠的异种PBMC从原始来源材料分离以获得PBMC和/或NK细胞富集的细胞群体。分离的异种PBMC和/或NK细胞可以是或不是纯的。根据各个方面,异种PBMC和/或NK细胞通过针对细胞标志物如CD16或CD56的选择来纯化。根据各个方面,施用的异种PBMC是其中CD16+和/或CD56+细胞占总细胞的约1%至100%的细胞群体,尽管可以使用其中CD16+和/或CD56+细胞占总细胞的少于1%的细胞群体。根据实施方案,施用的异种PBMC是其中CD16+和/或CD56+细胞占总细胞的约1-3%的T细胞耗尽的细胞,或其中CD16+和/或CD56+细胞占总细胞的约90%的正向选择的细胞。

[0140] 对于在免疫缺陷的hu-IL-15小鼠中生成NK细胞的模型时,施用的异种PBMC的数量不考虑是限制的。因此,施用的异种PBMC的数量通常在$1x10^5$至$1x10^8$(100,000至100,000,000)个PBMC的范围内,其中受体是鼠标,尽管可以使用更多或更少的细胞。

[0141] 因此,根据本发明的方面的方法可以包括向免疫缺陷的hu-IL-15小鼠施用约$1x10^5$到$1x10^8$(100,000至100,000,000)个PBMC,10^5(100,000)至约10^7(10,000,000)、约$1x\ 10^5$至约$1x\ 10^6$、约$5x\ 10^5$至约$5x\ 10^6$或约$1x\ 10^6$至约$1x\ 10^7$个异种PBMC,如人PBMC。该方法可以包括施用至少约$1x\ 10^5$、约$2x\ 10^5$、约$3x\ 10^5$、约$4x\ 10^5$、约$5x\ 10^5$、约$6x\ 10^5$、约$7x\ 10^5$、约$8x\ 10^5$、约$9x\ 10^5$、约$1x\ 10^6$、约$2x\ 10^6$、约$3x\ 10^6$、约$4x\ 10^6$、约$5x\ 10^6$、约$6x\ 10^6$、约$7x\ 10^6$、约$8x\ 10^6$、约$9x\ 10^6$、约$1x\ 10^7$、约$2x\ 10^7$、约$3x\ 10^7$、约$4x\ 10^7$、约$5x\ 10^7$、约$6x\ 10^7$、约$7x\ 10^7$、约$8x\ 10^7$、约$9x\ 10^7$或约$1x\ 10^8$个异种PBMC,如人PBMC。那些普通技术人员能够仅使用常规实验确定应施用于特定的小鼠的异种PBMC的数量。

[0142] 在其中受体免疫缺陷hu-IL-15小鼠中施用的任何非PBMC大多数已经变性时检测到异种NK细胞的情况下,植入是成功的。移植可通过流式细胞术检测为在异种PBMC施用后

10-12周在受体免疫缺陷的hu-IL-15小鼠的血液或脾脏中0.05％或更多的异种CD16+和/或CD56+细胞。

[0143] 根据本发明的方面，在免疫缺陷的hu-IL-15小鼠中异种PBMC的植入包括在施用异种PBMC之前对免疫缺陷的hu-IL-15小鼠进行“调理”，例如通过用高频电磁辐射对受体动物进行亚致死照射，通常使用伽马辐射，或用拟放射药物如白消安或氮芥进行处理。调理被认为减少宿主造血细胞的数量，产生对于NK细胞的维持和/或产生适宜的微环境因素，和/或产生用于NK细胞的维持和/或产生的微环境生境。标准调理方法是本领域中已知的，如本文中和J.Hayakawa等人，2009年，Stem Cells，27(1)：175-182中描述的。

[0144] 根据本发明的方面提供了包括向免疫缺陷的hu-IL-15小鼠施用异种PBMC，而不在施用异种PBMC前对免疫缺陷的hu-IL-15小鼠进行“调理”的方法。根据本发明的方面提供了包括向免疫缺陷的hu-IL-15小鼠施用异种PBMC，而不在施用异种PBMC之前通过放射或拟放射药物对免疫缺陷的hu-IL-15小鼠进行“调理”的方法。

[0145] 本发明的各个方面涉及将异种PBMC施用于免疫缺陷的hu-IL-15小鼠，从而产生具有异种NK细胞的免疫缺陷的hu-IL-15小鼠。

[0146] 对免疫缺陷的hu-IL-15小鼠施用异种PBMC导致小鼠中异种自然杀伤细胞的维持和/或产生。

[0147] 将异种PBMC施用于免疫缺陷的hu-IL-15小鼠导致小鼠中异种PBMC的维持和/或产生，其可通过流式细胞术表征。例如，对免疫缺陷的hu-IL-15小鼠施用人PBMC导致小鼠中自然杀伤细胞的维持和/或产生，其可以通过流式细胞术表征，包括人CD16+和/或CD56+人NK细胞。

[0148] NK细胞异种移植物

[0149] 本发明的各个方面涉及将纯化的异种自然杀伤细胞(NK细胞)施用于免疫缺陷的hu-IL-15小鼠，从而产生具有异种NK细胞的免疫缺陷的hu-IL-15小鼠。

[0150] 根据本发明的方面，异种NK细胞是人NK细胞。

[0151] 异种NK细胞的纯化和异种NK细胞施用于宿主小鼠是本领域中众所周知的。

[0152] 用于施用于免疫缺陷的hu-IL-15小鼠的异种NK细胞可从外周血获得。

[0153] 异种NK细胞可以通过经由各种途径施用而施用到新生小鼠中，例如但不限于到心脏、肝脏和/或面静脉中。异种NK细胞可以通过各种途径施用到成年小鼠中，例如但不限于施用到尾静脉中、股骨骨髓腔中或脾脏中。在进一步的实例中，含异种NK细胞的胎儿肝脏可以在肾囊下植入。

[0154] 向免疫缺陷的hu-IL-15小鼠施用异种NK细胞可以包括向免疫缺陷的hu-IL-15小鼠施用包含异种NK细胞的组合物。该组合物可以进一步包括，例如，水、张力调节剂(例如，盐，如氯化钠)、pH缓冲剂(例如，柠檬酸盐)和/或糖(例如，葡萄糖)。

[0155] 在免疫缺陷的hu-IL-15小鼠中植入异种NK细胞特征在于免疫缺陷的hu-IL-15小鼠中异种自然杀伤细胞的存在。异种自然杀伤细胞的存在可以通过各种不同方法中的任一种来评估，例如但不限于在施用NK细胞后的一个或多个时间点对施用异种NK细胞的动物中的细胞的流式细胞术分析。

[0156] 根据本发明的方面，施用于免疫缺陷的hu-IL-15小鼠的纯化的异种NK细胞从原始来源材料分离以获得NK细胞富集的细胞群体。纯化的异种NK细胞可以是或不是纯的。根据

各个方面，异种NK细胞通过针对细胞标志物(如CD16或CD56)进行选择和/或通过耗尽非NK细胞来纯化，例如通过去除CD3+细胞来耗尽T细胞。根据各个方面，施用的纯化异种NK细胞是其中CD16+和/或CD56+细胞占总细胞的约25-100％的细胞群体。根据各个实施方案，施用的纯化异种NK细胞是其中CD16+和/或CD56+细胞占总细胞的约25-100％的T细胞耗尽的细胞，或其中CD16+和/或CD56+NK细胞占总细胞的约90％或更多的正向选择的细胞。

[0157] 施用的纯化异种NK细胞的数量一般在$1x10^5$至$1x10^8$(100,000至100,000,000)个纯化的异种NK细胞的范围内，其中受体是小鼠，尽管可以使用更多或更少的数量。

[0158] 因此，根据本发明的方面的方法可以包括向免疫缺陷的hu-IL-15小鼠施用约$1x10^5$至$1x10^8$(100,000至100,000,000)个纯化的异种NK细胞、10^5(100,000)至约10^7(10,000,000)、约$1x\ 10^5$至约$1x\ 10^6$、约$5x\ 10^5$至约$5x\ 10^6$或约$1x\ 10^6$至约$1x\ 10^7$个纯化的异种NK细胞(如纯化的人NK细胞)。该方法可以包括向免疫缺陷的hu-IL-15小鼠施用至少约$1x\ 10^5$、约$2x\ 10^5$、约$3x\ 10^5$、约$4x\ 10^5$、约$5x\ 10^5$、约$6x\ 10^5$、约$7x\ 10^5$、约$8x\ 10^5$、约$9x\ 10^5$、约$1x\ 10^6$、约$2x\ 10^6$、约$3x\ 10^6$、约$4x\ 10^6$、约$5x\ 10^6$、约$6x\ 10^6$、约$7x\ 10^6$、约$8x\ 10^6$、约$9x\ 10^6$、约$1x\ 10^7$、约$2x\ 10^7$、约$3x\ 10^7$、约$4x\ 10^7$、约$5x\ 10^7$、约$6x\ 10^7$、约$7x\ 10^7$、约$8x\ 10^7$、约$9x\ 10^7$或约$1x\ 10^8$个纯化的异种NK细胞，如纯化的人NK细胞。本领域技术人员能够仅使用常规实验确定应施用于特定小鼠的纯化的异种NK细胞的数量。

[0159] 成功的移植可以通过流式细胞术检测为异种PBMC施用后10-12周受体免疫缺陷hu-IL-15小鼠的血液或脾脏中0.05％或更高的异种CD16+和/或CD56+细胞。

[0160] 根据本发明的方面在免疫缺陷的hu-IL-15小鼠中纯化的异种NK细胞的植入包括在施用纯化的异种NK细胞之前对免疫缺陷的hu-IL-15小鼠进行“调理”，例如通过使得高频电磁辐射对受体动物进行亚致死照射，通常使用γ辐射，或者使用拟放射药物如白消安或氮芥进行处理。调理被认为减少宿主造血细胞的数量，为NK细胞的维持和/或产生创造适当的微环境因素和/或为NK细胞的维持和/或产生创造微环境生境。标准调理方法是本领域中已知的，如本文中和J.Hayakawa等人，2009年，Stem Cells，27(1)：175-182中描述的。

[0161] 根据本发明的方面提供了包括向免疫缺陷的hu-IL-15小鼠施用纯化的异种NK细胞，而不在施用纯化的异种NK细胞前对免疫缺陷的hu-IL-15小鼠进行“调理”的方法。根据本发明的方面提供了包括向免疫缺陷的hu-IL-15小鼠施用纯化的异种NK细胞，而不在施用纯化的异种NK细胞前通过放射或拟放射药物对免疫缺陷的hu-IL-15小鼠进行“调理”的方法。

[0162] 本发明的各个方面涉及将纯化的异种NK细胞施用于免疫缺陷的hu-IL-15小鼠，从而产生具有异种NK细胞的免疫缺陷的hu-IL-15小鼠。本发明的各个方面涉及将纯化的人NK细胞施用于免疫缺陷的hu-IL-15小鼠，从而产生具有人NK细胞的免疫缺陷的hu-IL-15小鼠。

[0163] 将纯化的异种NK细胞施用于免疫缺陷的hu-IL-15小鼠导致小鼠中异种自然杀伤细胞的维持和/或产生。将纯化的人NK细胞施用于免疫缺陷的hu-IL-15小鼠导致小鼠中人自然杀伤细胞的维持和/或产生。

[0164] 将纯化的异种NK细胞施用于免疫缺陷的hu-IL-15小鼠导致小鼠中异种NK细胞的维持和/或产生，其可以通过流式细胞术表征。例如，将人NK细胞施用于免疫缺陷的hu-IL-15小鼠导致小鼠中自然杀伤细胞的维持和/或产生，其可通过流式细胞术表征，包括人CD16

+和/或CD56+人NK细胞。

[0165] NK细胞系异种移植物

[0166] 本发明的各个方面涉及将异种的永生化自然杀伤细胞(NK细胞系细胞)施用于免疫缺陷的hu-IL-15小鼠,从而产生具有异种NK细胞系细胞的免疫缺陷的hu-IL-15小鼠。术语"永生化NK细胞系细胞"是指由于一个或多个突变而无限增殖的NK细胞,NK细胞通过该突变而逃脱限制其增殖能力的细胞控制限制(称为Hayflick极限)。

[0167] 根据本发明的方面,异种NK细胞系细胞是人NK细胞系细胞。

[0168] NK细胞系细胞可以是遗传修饰的细胞系的细胞。NK细胞系细胞可以包括嵌合抗原受体(CAR)。NK细胞系细胞可以是治疗性NK细胞系的细胞,包括但不限于NK-92。NK细胞系细胞可以是各种NK细胞系细胞中的任何一种,包括但不限于NK细胞系NK-92、NK-YS、KHYG-1、NKL、NKG、SNK-6或IMC-1的细胞,所有这些细胞可以从商业和/或公共细胞储存库来源(如ATCC®)获得,参见Chen IM等,Leuk Res(2004)28:275-84;Cheng M等,Cell Transplant(2011)20:1731-46;Gong JH等,Leukemia(1994)8:652-8;Nagata H等,Blood(2001)97:708-13;Robertson MJ等,Exp Hematol(1996)24:406-15;Tsuchiyama J等,Blood(1998)92:1374-83;和Yagita M等,Leukemia(2000)14:922-30。

[0169] 异种NK细胞系细胞可通过经由各种途径施用而施用于新生小鼠,例如但不限于施用到心脏、肝脏和/或面静脉中。异种NK细胞系细胞可通过各种途径施用到成年小鼠中,例如但不限于施用到尾静脉中、股骨骨髓腔中或脾脏中。在进一步的实例中,含有异种NK细胞系细胞的胎儿肝脏可以在肾囊下植入。

[0170] 向免疫缺陷的hu-IL-15小鼠施用异种NK细胞系细胞可以包括向免疫缺陷的hu-IL-15小鼠施用包含异种NK细胞系细胞的组合物。该组合物可以进一步包括,例如,水、张力调节剂(例如,盐,如氯化钠)、pH缓冲剂(例如,柠檬酸盐)和/或糖(例如,葡萄糖)。

[0171] 异种NK细胞系细胞的存在可以通过各种方法中的任一种来评估,例如但不限于对NK细胞系细胞施用后的一个或多个时间点施用异种NK细胞系细胞的动物中的细胞的流式细胞术分析。

[0172] 异种NK细胞系细胞可以是或不是纯的。根据各个实施方案,施用的NK细胞系细胞占施用的总细胞的约90%或更高,95%或更高,99%或更高,或100%。

[0173] 施用的异种NK细胞系细胞的数量不被认为是限制性的。单个异种NK细胞系细胞可以增殖并产生足够的NK细胞系细胞用于功能的检测。因此,施用的异种NK细胞系细胞的数量通常在$1x10^3$至$1x10^6$(1,000至1,000,000)个异种NK细胞系细胞的范围内,其中受体是小鼠,尽管可以使用更多或更少的细胞。

[0174] 因此,根据本发明的方面的方法可以包括向免疫缺陷的hu-IL-15小鼠施用约10^3(1000)至约10^6(1,000,000)、约10^3至约10^5、约10^4至约10^6、约10^5至约10^7、约$1x\ 10^3$至约$1x\ 10^4$、约$5x\ 10^3$至约$5x\ 10^4$、约$1x\ 10^4$至约$1x\ 10^5$、约$5x\ 10^4$至约$5x\ 10^5$、约$1x\ 10^5$至约$1x\ 10^6$、约$5x\ 10^5$至约$5x\ 10^6$、约$1x\ 10^6$至约$1x\ 10^7$、约$2x\ 10^4$至约$5x\ 10^5$或约$5x\ 10^4$至约$2x\ 10^5$个异种NK细胞系细胞,如人NK细胞系细胞。该方法可以包括向免疫缺陷的hu-IL-15小鼠施用至少约$1x\ 10^2$、约$2x\ 10^2$、约$3x\ 10^2$、约$4x\ 10^2$、约$5x\ 10^2$、约$6x\ 10^2$、约$7x\ 10^2$、约$8x\ 10^2$、约$9x\ 10^2$、约$1x\ 10^3$、约$2x\ 10^3$、约$3x\ 10^3$、约$4x\ 10^3$、约$5x\ 10^3$、约$6x\ 10^3$、约$7x\ 10^3$、约$8x\ 10^3$、约$9x\ 10^3$、约$1x\ 10^4$、约$2x\ 10^4$、约$3x\ 10^4$、约$4x\ 10^4$、约$5x\ 10^4$、约$6x\ 10^4$、约$7x\ 10^4$、约$8x\ 10^4$、约$9x$

10^4、约1x 10^5、约2x 10^5、约3x 10^5、约4x 10^5、约5x 10^5、约6x 10^5、约7x 10^5、约8x 10^5、约9x 10^5、约1x 10^6、约2x 10^6、约3x 10^6、约4x 10^6、约5x 10^6、约6x 10^6、约7x 10^6、约8x 10^6、约9x 10^6或约1x 10^7个异种NK细胞系细胞，如人NK细胞系细胞。该方法可以包括向免疫缺陷的hu-IL-15小鼠施用约1x 10^2、约2x 10^2、约3x 10^2、约4x 10^2、约5x 10^2、约6x 10^2、约7x 10^2、约8x 10^2、约9x 10^2、约1x 10^3、约2x 10^3、约3x 10^3、约4x 10^3、约5x 10^3、约6x 10^3、约7x 10^3、约8x 10^3、约9x 10^3、约1x 10^4、约2x 10^4、约3x 10^4、约4x 10^4、约5x 10^4、约6x 10^4、约7x 10^4、约8x 10^4、约9x 10^4、约1x 10^5、约2x 10^5、约3x 10^5、约4x 10^5、约5x 10^5、约6x 10^5、约7x 10^5、约8x 10^5、约9x 10^5、约1x 10^6、约2x 10^6、约3x 10^6、约4x 10^6、约5x 10^6、约6x 10^6、约7x 10^6、约8x 10^6、约9x 10^6或约1x 10^7个异种NK细胞系细胞，如人NK细胞系细胞。本领域技术人员能够仅使用常规实验确定应施用于特定小鼠的异种HSC的数量。

[0175] 成功的植入可以通过流式细胞术检测为在异种细胞施用后10-12周受体免疫缺陷hu-IL-15小鼠的血液或脾脏中0.05％或更多的异种NK细胞系细胞。

[0176] 根据本发明的方面，在免疫缺陷的hu-IL-15小鼠中异种NK细胞系细胞的植入包括在施用异种NK细胞系细胞之前对免疫缺陷的hu-IL-15小鼠进行“调理”，例如通过用高频电磁辐射对受体动物进行亚致死照射，通常使用γ辐射，或者使用拟放射药物如白消安或氮芥进行处理。调理被认为减少宿主造血细胞的数量，为异种NK细胞系细胞的维持和/或产生创造适当的微环境因素，和/或为异种NK细胞系细胞的维持和/或产生创造微环境生境。标准调理方法是本领域中已知的，如本文中和J.Hayakawa等人，2009年，Stem Cells，27(1)：175-182中描述的。

[0177] 根据本发明的方面提供了包括向免疫缺陷的hu-IL-15小鼠施用异种NK细胞系细胞，而不在施用异种NK细胞系细胞前对免疫缺陷的hu-IL-15小鼠进行“调理”的方法。根据本发明的方面提供了包括向免疫缺陷的hu-IL-15小鼠施用异种NK细胞系细胞，而不在施用异种NK细胞系细胞前通过放射或拟放射药物对免疫缺陷的hu-IL-15小鼠进行“调理”的方法。

[0178] 本发明的各个方面涉及向免疫缺陷的hu-IL-15小鼠施用异种NK细胞系细胞，从而产生具有异种NK细胞系细胞的免疫缺陷的hu-IL-15小鼠。本发明的各个方面涉及将人NK细胞系细胞施用于免疫缺陷的hu-IL-15小鼠，从而产生具有人NK细胞系细胞的免疫缺陷的hu-IL-15小鼠。

[0179] 将异种NK细胞系细胞施用于免疫缺陷的hu-IL-15小鼠导致小鼠中异种NK细胞系细胞的维持和/或产生。将人NK细胞系细胞施用于免疫缺陷的hu-IL-15小鼠导致小鼠中人NK细胞系细胞的维持和/或产生。

[0180] 异种NK细胞系细胞施用于免疫缺陷的hu-IL-15导致小鼠中异种NK细胞系细胞的维持和/或产生，其可通过流式细胞术表征。例如，人NK细胞系细胞NK细胞施用于免疫缺陷的hu-IL-15小鼠导致小鼠中异种NK细胞系细胞的维持和/或产生，其可以通过流式细胞术表征。

[0181] 肿瘤异种移植物

[0182] 本发明的各个方面涉及将异种肿瘤细胞施用于免疫缺陷的hu-IL-15小鼠。

[0183] 施用于本发明的免疫缺陷的hu-IL-15小鼠的异种肿瘤细胞可以是各种肿瘤细胞中的任何一种，包括但不限于肿瘤细胞系和原代肿瘤细胞的细胞。异种肿瘤细胞可以源于

各种生物体中的任何一种，优选哺乳动物，包括人、非人灵长类动物、大鼠、豚鼠、兔、猫、狗、马、牛、山羊、猪和绵羊。

[0184] 根据本发明的具体方面，异种肿瘤细胞是人肿瘤细胞。根据本发明的具体方面，人肿瘤细胞存在于从人获得的样品中，例如但不限于血液样品、组织样品或通过人体肿瘤活检获得的样品。

[0185] 从人获得的肿瘤细胞可以直接施用于本发明的免疫缺陷hu-IL-15小鼠，或者也可以在施用于免疫缺陷hu-IL-15小鼠之前在体外培养。

[0186] 如本文所用，术语“肿瘤”是指以未调控的生长为特征的细胞，包括但不限于前肿瘤过度增生、原位癌、肿瘤、转移瘤及实体和非实体肿瘤。肿瘤的实例是由癌症引起的那些，包括但不限于淋巴瘤、白血病、鳞状细胞癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺的腺癌、肺的鳞状癌、腹膜癌、肾上腺癌、肛门癌、胆管癌、膀胱癌、脑癌、乳腺癌、三阴性乳腺癌、中央或外周神经系统癌、宫颈癌、结肠癌、结肠直肠癌、子宫内膜癌、食管癌、胆囊癌、胃肠癌、胶质母细胞瘤、头颈癌、肾癌、肝癌、鼻咽癌、鼻腔癌、口咽癌、口腔癌、骨肉瘤、卵巢癌、胰腺癌、甲状旁腺癌、垂体癌、前列腺癌、视网膜母细胞瘤、肉瘤、唾液腺癌、皮肤癌、小肠癌、胃癌、睾丸癌、胸腺癌、甲状腺癌、子宫癌、阴道癌和外阴癌。

[0187] 向免疫缺陷的hu-IL-15小鼠施用肿瘤细胞可以是本领域公认适合的任何方法。例如，施用可以包括将细胞施用到器官、体腔或血管中，例如通过注射或植入，如皮下和/或腹膜内植入。肿瘤细胞可以作为肿瘤块、肿瘤细胞团块或解离的细胞施用。

[0188] 肿瘤细胞可以通过各种途径施用，例如但不限于皮下注射、腹膜内注射或注射到尾静脉中。

[0189] 异种肿瘤细胞的植入可通过各种方法中的任何一种进行评估，例如但不限于对小鼠进行肿瘤形成迹象的视觉检查。

[0190] 各种方法的任何一种可以用于测量异种肿瘤的生长，包括但不限于活小鼠中的测量、从活小鼠切除的肿瘤的测量或者原位或从死小鼠切除的肿瘤的测量。测量可以使用如卡尺的测量仪器，采用一种或多种成像技术如超声检查、计算机断层扫描、正电子发射断层扫描、荧光成像、生物发光成像、磁共振成像以及这些中任何两种或更多种的组合或者其它肿瘤测量方法获得。从携带异种肿瘤细胞的小鼠获得的样品中的肿瘤细胞的数量可以用于测量肿瘤生长，特别是对于非实体肿瘤。例如，可以评估血液样品中非实体肿瘤细胞的数量以获得小鼠中非实体肿瘤生长的测量。

[0191] 施用的肿瘤细胞的数量不认为是限制的。在本文描述的遗传修饰免疫缺陷动物中，单个肿瘤细胞可以扩增成可检测的肿瘤。施用的肿瘤细胞的数量一般在1000-1,000,000个肿瘤细胞的范围内，尽管可以施用更多或更少的细胞。

[0192] 因此，根据本发明的方面的方法可以包括向免疫缺陷的hu-IL-15小鼠施用约10^2(100)至约10^7(10,000,000)、约10^3至约10^5、约10^4至约10^6、约10^5至约10^7、约1x 10^3至约1x 10^4、约5x 10^3至约5x 10^4、约1x 10^4至约1x 10^5、约5x 10^4至约5x 10^5、约1x 10^5至约1x 10^6、约5x 10^5至约5x 10^6、约1x 10^6至约1x 10^7、约2x 10^4至约5x 10^5或约5x 10^4至约2x 10^5个异种肿瘤细胞，如人肿瘤细胞，该方法可以包括向免疫缺陷的hu-IL-15小鼠施用至少约1x 10^2、约2x 10^2、约3x 10^2、约4x 10^2、约5x 10^2、约6x 10^2、约7x 10^2、约8x 10^2、约9x 10^2、约1x 10^3、约2x 10^3、约3x 10^3、约4x 10^3、约5x 10^3、约6x 10^3、约7x 10^3、约8x 10^3、约9x 10^3、约1x

10^4、约2x 10^4、约3x 10^4、约4x 10^4、约5x 10^4、约6x 10^4、约7x 10^4、约8x 10^4、约9x 10^4、约1x 10^5、约2x 10^5、约3x 10^5、约4x 10^5、约5x 10^5、约6x 10^5、约7x 10^5、约8x 10^5、约9x 10^5、约1x 10^6、约2x 10^6、约3x 10^6、约4x 10^6、约5x 10^6、约6x 10^6、约7x 10^6、约8x 10^6、约9x 10^6或约1x 10^7个异种肿瘤细胞，如人肿瘤细胞。该方法可以包括向免疫缺陷的hu-IL-15小鼠施用约1x 10^2、约2x 10^2、约3x 10^2、约4x 10^2、约5x 10^2、约6x 10^2、约7x 10^2、约8x 10^2、约9x 10^2、约1x 10^3、约2x 10^3、约3x 10^3、约4x 10^3、约5x 10^3、约6x 10^3、约7x 10^3、约8x 10^3、约9x 10^3、约1x 10^4、约2x 10^4、约3x 10^4、约4x 10^4、约5x 10^4、约6x 10^4、约7x 10^4、约8x 10^4、约9x 10^4、约1x 10^5、约2x 10^5、约3x 10^5、约4x 10^5、约5x 10^5、约6x 10^5、约7x 10^5、约8x 10^5、约9x 10^5、约1x 10^6、约2x 10^6、约3x 10^6、约4x 10^6、约5x 10^6、约6x 10^6、约7x 10^6、约8x 10^6、约9x 10^6或约1x 10^7个异种肿瘤细胞，如人肿瘤细胞。本领域技术人员能够仅使用常规实验确定应施用于特定小鼠的异种肿瘤细胞的数量。

[0193] 根据本发明的方面，异种肿瘤细胞及异种HSC和/或异种PBMC施用于免疫缺陷的hu-IL-15小鼠。异种肿瘤细胞及异种HSC和/或异种PBMC可以在相同时间或不同时间施用。

[0194] 根据本发明的方面，异种肿瘤细胞源自与施用的HSC和/或异种PBMC相同的物种。根据各个方面，施用于免疫缺陷的hu-IL-15小鼠的肿瘤细胞及HSC和/或异种PBMC是人细胞。

[0195] 根据本发明的方面，施用的HSC和/或异种PBMC及肿瘤细胞是人白细胞抗原(HLA)匹配的(例如MHC I类匹配的和/或MHC II类匹配的)。HLA匹配可以降低针对HLA细胞表面蛋白的移植物抗移植物免疫反应的可能性。针对HLA的免疫反应可能错误地表明异种免疫细胞成功地靶向异种癌细胞。

[0196] 施用的HSC和/或异种PBMC及施用的肿瘤细胞可以包括至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个匹配的HLA等位基因。施用的HSC和/或异种PBMC以及肿瘤细胞可以包括至少2、3、4、5、6、7或8个匹配的HLA等位基因，其选自对于HLA-A、HLA-B、HLA-C和HLA-DRB1的等位基因。完美的HLA匹配在没有基因工程的情况下是很少可能的，且完美的HLA匹配可能是不必要的。例如，对照实验可以解释任何HLA介导的移植物抗移植物免疫反应。

[0197] 测定方法

[0198] 根据本发明的方面提供的方法和免疫缺陷的hu-IL-15小鼠具有各种用途，例如，对针对人类癌症的物质进行的体内测试。

[0199] 根据本发明的方面用于鉴定测试物质的抗肿瘤活性的方法包括提供免疫缺陷的hu-IL-15小鼠；向免疫缺陷的hu-IL-15小鼠施用异种肿瘤细胞，其中异种肿瘤细胞在免疫缺陷的hu-IL-15小鼠中形成实体或非实体肿瘤；向免疫缺陷的hu-IL-15小鼠施用测试物质；测定异种肿瘤和/或肿瘤细胞对测试物质的反应，其中测试物质对肿瘤和/或肿瘤细胞的抑制性作用确定测试物质具有抗肿瘤活性。

[0200] 根据本发明的方面用于鉴定测试物质的抗肿瘤活性的方法包括提供免疫缺陷的hu-IL-15小鼠，其中免疫缺陷的hu-IL-15小鼠移植了异种HSC；向免疫缺陷的hu-IL-15小鼠施用异种肿瘤细胞，其中异种肿瘤细胞在免疫缺陷的hu-IL-15小鼠中形成实体或非实体肿瘤；向免疫缺陷的hu-IL-15小鼠施用测试物质；测定异种肿瘤和/或肿瘤细胞对测试物质的反应，其中测试物质对肿瘤和/或肿瘤细胞的抑制性作用确定测试物质具有抗肿瘤活性。

[0201] 根据本发明的方面用于鉴定测试物质的抗肿瘤活性的方法包括提供免疫缺陷的hu-IL-15小鼠，其中免疫缺陷的hu-IL-15小鼠移植了人HSC；向免疫缺陷的hu-IL-15小鼠施用人肿瘤细胞，其中人肿瘤细胞在免疫缺陷的hu-IL-15小鼠中形成实体或非实体肿瘤；向免疫缺陷的hu-IL-15小鼠施用测试物质；测定人肿瘤和/或肿瘤细胞对测试物质的反应，其中测试物质对肿瘤和/或肿瘤细胞的抑制性作用确定测试物质具有抗肿瘤活性。

[0202] 在用于根据本发明的方面鉴定测试物质的抗肿瘤活性的测定中使用的免疫缺陷hu-IL-15小鼠是NSG-hu-IL-15小鼠、NRG-hu-IL-15小鼠或NOG-hu-IL-15小鼠。

[0203] 本文使用的术语“抑制性作用”是指测试物质抑制以下一种或多种的作用：肿瘤生长、肿瘤细胞代谢和肿瘤细胞分裂。

[0204] 测定异种肿瘤和/或肿瘤细胞对测试物质的反应包括将反应与标准进行比较以根据本发明方法的方面确定测试物质对异种肿瘤细胞的作用，其中测试物质对异种肿瘤细胞的抑制性作用确定测试物质为抗肿瘤组合物。标准是本领域中众所周知的，且所使用的标准可以是任何适当的标准。在一个实例中，标准是已知具有抗肿瘤作用的化合物。在进一步的实例中，相当的异种肿瘤的非处理提供了没有处理的情况下肿瘤生长的基础水平指标用于比较测试物质的作用。标准可以是先前在单个可比小鼠中或在可比小鼠群体中确定的，并存储在打印或电子介质中用于回忆和与测定结果进行比较的预期肿瘤生长的参考水平。

[0205] 测定结果可以通过各种方法中的任何一种使用统计分析进行分析以确定测试物质是否对肿瘤具有抑制性作用，例如参数检验或非参数检验、方差分析、协方差分析、多元分析的逻辑回归、Fisher精确检验、卡方检验、Student’s T检验、Mann-Whitney检验、Wilcoxon符号秩检验、McNemar检验、Friedman检验和Page’s L趋势检验。这些和其他统计学检验是本领域中众所周知的，如在Hicks,CM,Research Methods for Clinical Therapists:Applied Project Design and Analysis,Churchill Livingstone(出版);5th Ed.,2009;和Freund,RJ等,Statistical Methods,Academic Press;3rd Ed.,2010中详细描述的。

[0206] 本发明方法中使用的测试物质可以是任何化学实体，说明性地包括合成或天然存在的化合物或者合成或天然存在的化合物、小的有机或无机分子、蛋白质、肽、核酸、碳水化合物、寡糖、脂质或这些中任意的组合。根据本发明的方面，测试物质是免疫治疗剂。

[0207] 根据本发明的方面，测试物质是抗癌剂。根据本发明的方面，测试物质为抗癌免疫治疗剂，如抗癌抗体或其抗原结合片段。

[0208] 例如，在Brunton等(eds.),Goodman and Gilman’s The Pharmacological Basis of Therapeutics,12th Ed.,Macmillan Publishing Co.,2011中描述了抗癌剂。

[0209] 抗癌剂说明性地包括阿西维辛、阿柔比星、阿考达唑、阿克洛宁、阿多来新、阿地白介素、阿利维A酸、别嘌呤醇、六甲蜜胺、安波霉素、阿美蒽醌、氨磷汀、氨鲁米特、安吖啶、阿那曲唑、安曲霉素、三氧化二砷、天冬酰胺酶、曲林菌素、阿扎胞苷、氮替派、含氮霉素、巴马司他、苯佐替派、比卡鲁胺、比生群、双法奈德二甲磺酸盐、比折来新、博来霉素、布喹那、溴匹立明、白消安、放线菌素、卡鲁睾酮、卡培他滨、卡醋胺、卡贝替姆、卡铂、卡莫司丁、卡柔比星、卡折来新、西地芬戈、塞来考昔、苯丁酸氮芥、西罗霉素、顺铂、克拉屈滨、考比替尼、甲磺酸克立那托、环磷酰胺、阿糖胞苷、达卡巴嗪、放线菌素D、柔红霉素、地西他滨、右奥马铂、地扎呱宁、地扎呱宁甲磺酸盐、地吖醌、多西他赛、阿霉素、屈洛昔芬、屈他雄酮、偶氮霉素、依

达曲沙、依氟鸟氨酸(eflomithine)、恩洛铂、恩普氨酯、依匹哌啶、表柔比星、厄布洛唑、依索比星、雌莫司汀、乙苯咪唑、依托泊苷、艾托卜宁(etoprine)、法屈唑、法扎拉滨、芬维A胺、氟尿苷、氟达拉滨、氟尿嘧啶、氟西他滨、磷喹酮、福司曲星、氟维司群、吉西他滨、羟基脲、伊达比星、异环磷酰胺、伊莫福新、白介素II(IL-2,包括重组白介素II或rIL2)、干扰素α-2a、干扰素α-2b、干扰素α-n1、干扰素α-n3、干扰素β-Ia、干扰素γ-Ib、异丙铂、伊立替康、兰瑞肽、来曲唑、亮丙瑞林、利阿唑、洛美曲索、洛莫司汀、洛索蒽醌、马丙考、美登素、盐酸氮芥、甲地孕酮、醋酸美仑孕酮、美法仑、美诺立尔、巯基嘌呤、甲氨蝶呤、氯苯氨啶、美乌替派、米丁度胺、米托卡星、丝裂红素、米托洁林、丝裂马霉素、丝裂霉素、丝裂帕菌素、米托坦、米托蒽醌、霉酚酸、奈拉滨、诺卡达唑、诺加霉素、奥姆纳铂(ormnaplatin)、奥昔舒仑(oxisuran)、紫杉醇、天门冬酰胺酶、培利霉素、戊氮芥、培洛霉素、培磷酰胺、哌泊溴烷、哌泊舒凡、盐酸吡罗昔酮、普列卡霉素、普洛美坦、卟菲尔钠、甲基丝裂霉素、泼尼莫司汀、丙卡嗪、嘌呤霉素、吡唑呋林、利波腺苷(riboprine)、罗格列胺(rogletimide)、沙芬戈、司莫司汀、辛曲嗪、司帕腾、稀疏霉素、螺旋锗、螺莫司汀、螺铂、链黑菌素、链脲菌素、磺氯苯脲、他利霉素、他莫昔芬、替考加兰、替加氟、替洛蒽醌、替莫泊芬、替尼泊苷、替罗昔隆、睾内酯、硫咪嘌呤、硫代鸟嘌呤、噻替派、噻唑呋林、替拉扎明、托泊替康、托瑞米芬、曲托龙、曲西立滨、曲美沙特、曲普瑞林、妥布氯唑、尿嘧啶氮芥、乌瑞替哌、伐普肽、维莫非尼、维替泊芬、长春花碱、硫酸长春新碱、长春地辛、长春匹定、长春甘酯、长春罗辛、长春瑞滨、长春罗定、长春利定、伏罗唑、折尼铂、净司他丁、唑来膦酸和佐柔比星。

[0210] 根据本发明的方面,抗癌剂是抗癌抗体。使用的抗癌抗体可以是有效抑制至少一种类型的肿瘤,特别是人类肿瘤的任何抗体。抗癌抗体包括但不限于3F8、8H9、阿巴伏单抗(abagovomab)、abituzumab、阿达木单抗(adecatumab)、adecatumumab、aducanumab、阿夫土珠单抗(afutuzumab)、alacizumab pegol、阿仑单抗(alemtuzumab)、amatuximab、麻安莫单抗(anatumomab mafenatox)、anetumab ravtansine、apolizumab、阿西莫单抗(arcitumomab)、ascrinvacumab、阿特珠单抗、巴维妥昔单抗(bavituximab)、贝利木单抗(belimumab)、贝伐单抗(bevacizumab)、bivatuzumab mertansine、brentuximab vedotin、brontictuzumab、cantuzumab mertansine、cantuzumab ravtansine、卡罗单抗喷地肽(capromab pendetide)、卡妥索单抗(catumaxomab)、西妥昔单抗(cetuximab)、citatuzumab bogatox、西妥木单抗(cixutumumab)、clivatuzumab tetraxetan、coltuximab ravtansine、conatumumab、达西珠单抗(dacetuzumab)、dalotuzumab、demcizumab、denintuzumab mafodotin、depatuxizumab mafodotin、德瓦鲁单抗(durvalumab)、dusigitumab、依决洛单抗(edrecolomab)、elotuzumab、emactuzumab、emibetuzumab、enoblituzumab、enfortumab vedotin、enavatuzumab、依帕珠单抗(epratuzumab)、ertumaxomab、etaracizumab、farletuzumab、ficlatuzumab、figitumumab、flanvotumab、futuximab、加利昔单抗(galiximab)、ganitumab、吉妥珠单抗(gemtuzumab)、girentuximab、glembatumumab vedotin、替伊莫单抗(ibritumomab tiuxetan)、伊戈伏单抗(igovomab)、imab362、imalumab、imgatuzumab、indatuximab ravtansine、indusatumab vedotin、inebilizumab、inotuzumab ozogamicin、intetumumab、伊匹单抗、iratumumab、isatuximab、labetuzumab、lexatumumab、lifastuzumab vedotin、林妥珠单抗(lintuzumab)、lirilumab、lorvotuzumab mertansine、lucatumumab、lumiliximab、

lumretuzumab、mapatumumab、margetuximab、matuzumab、milatuzumab、mirvetuximab soravtansine、米妥莫单抗(mitumomab)、mogamulizumab、moxetumomab pasudotox、他那可单抗(nacolomab tafenatox)、naptumomab estafenatox、narnatumab、necitumumab、nesvacumab、nimotuzumab、纳武单抗(nivolumab)、ocaratuzumab、奥法木单抗(ofatumumab)、olaratumab、onartuzumab、ontuxizumab、oregovomab、oportuzumab monatox、otlertuzumab、帕尼单抗(panitumumab)、pankomab、parsatuzumab、patritumab、派姆单抗(pembrolizumab)、pemtumomab、帕妥珠单抗(pertuzumab)、pidilizumab、pinatuzumab vedotin、polatuzumab vedotin、pritumumab、racotumomab、radretumab、雷莫芦单抗(ramucirumab)、利妥木单抗(rilotumumab)、利妥昔单抗(rituximab)、robatumumab、sacituzumab govitecan、samalizumab、seribantumab、西罗珠单抗(sibrotuzumab)、siltuximab、sofituzumab vedotin、tacatuzumab tetraxetan、tarextumab、tenatumomab、teprotumumab、tetulomab、tigatuzumab、托西莫单抗(tositumomab)、tovetumab、曲妥珠单抗(trastuzumab)、tremelimumab、tucotuzumab celmoleukin、ublituximab、utomilumab、vandortuzumab vedotin、vantictumab、vanucizumab、varlilumab、vesencumab、volociximab、vorsetuzumab mafodotin、伏妥莫单抗(votumumab)、zalutumumab和zatuximab。

[0211] 根据本发明的方面，测试物质是特异性地结合以下一种或多种的测试物质：1)细胞表面蛋白，如分化簇(CD)细胞表面分子；2)细胞内蛋白，如激酶；和3)细胞外蛋白，如脱落细胞表面受体或细胞表面受体的可溶性配体。

[0212] 根据本发明的方面，测试物质是特异性地结合由白细胞(例如，淋巴细胞或髓系谱系白细胞)表达的蛋白质的物质。在进一步的选择中，测试物质是特异性地结合白细胞的配体的物质。在再另外的选择中，测试物质是特异性地结合由癌细胞表达的分子的物质。

[0213] 根据本发明的方面，测试物质是化疗剂或免疫治疗剂。根据本发明的方面，测试物质可以特异性地结合PD-1、PD-L1或CTLA-4。根据本发明的方面，测试物质可以是免疫检查点抑制剂，如PD-1抑制剂、PD-L1抑制剂或CTLA-4抑制剂。根据本发明的方面，测试物质是选自阿特珠单抗、阿维鲁单抗、德瓦鲁单抗、伊匹单抗、纳武单抗、派姆单抗及上述任何一种的抗原结合片段的免疫检查点抑制剂。

[0214] 测试物质可通过任何适当的施用途径施用，例如但不限于口服、直肠、颊部、鼻、肌内、阴道、眼部、耳、皮下、透皮、肿瘤内、静脉内和腹膜内。

[0215] 下面的实施例说明了本发明的组合物和方法的实施方案。这些实施例用于说明性的目的而提供，且并不被认为是对本发明组合物和方法的范围的限制。

[0216] 实施例

[0217] 人IL-15转基因NSG小鼠的产生

[0218] ～200K bp BAC(命名为RP11-620F3，含有人IL15基因)购自Chori BACPAC。NSG胚胎的原核注射产生了将人IL15基因传递给其后代的转基因雄性创始动物。NSG-Tg(Hu-IL15)半合子后代通过聚合酶链反应(PCR)鉴定，且扩增群落。人IL-15水平首先在NSG-Tg(Hu-IL15)半合子上确定。血浆从人IL-15转基因半合的3只雌性小鼠和3只雌性NSG非转基因小鼠(55天龄)中采集。ELISA分析使用Quantikine人IL-15ELISA试剂盒(R&D Systems，Minneapolis，MN)。NSG-Tg(Hu-IL15)半合子具有生理水平的人IL-15(7.1+/-0.3pg/ml)，而

非转基因NSG小鼠如预期的缺乏人IL-15，证明了转基因动物中人IL-15蛋白的产生(图1)。

[0219] 随后的杂交和试验交配产生另外的NSG-Tg(Hu-IL15)后代。进行遗传杂交以将人IL-15转基因固定至纯合性，且发现Hu-IL15转基因纯合子存活良好且在纯合子的交配中繁殖。NSG-Tg(Hu-IL15)群落通过近亲交配在高屏障小鼠室中维持。人IL15转基因的纯合表达导致人IL-15水平比NSG-Tg(Hu-IL15)半合子高两倍(图2)。转基因表达鼠IL-15的免疫活性小鼠在T.A.Fehniger等人，Fatal leukemia in interleukin-15transgenic mice,Blood cells,molecules&diseases 27,223-230(2001)中描述，且这些小鼠IL-15转基因动物发生致命的淋巴细胞性白血病，T-NK细胞表型从6周龄开始。相反，NSG-Tg(Hu-IL15)小鼠缺乏内源性鼠T和NK细胞，且不发生小鼠白血病。NSG-Tg(Hu-IL15)纯合繁殖对通常在繁殖群落中保持6-9个月，然后由于育种效率下降而退出，并且没有发现白血病的证据。

[0220] NSG-Tg(Hu-IL15)小鼠支持人NK细胞发育

[0221] 为了确定NSG-Tg(Hu-IL15)小鼠在移植人造血干细胞(HSC)后是否支持人NK细胞的发育，将8至12周龄的NSG-Tg(HuIL15)小鼠与年龄和性别匹配的NSG对照的组一起用人HSC移植。简单地说，受体小鼠接受200cGy照射，然后静脉内注射从脐带血富集的$1x10^5$个人CD34+HSC。采用流式细胞术监测人NK细胞发育和表型。人HSC移植的NSG和NSG-Tg(Hu-IL15)小鼠在实验的整个过程中的存活水平相似(图3)。通过流式细胞术监测外周血中的人CD45+细胞的水平。与NSG小鼠相比，NSG-Tg(Hu-IL15)小鼠在血液中CD45+细胞的发育加速，如图4所示。人白细胞的发育，如通过人CD45+细胞水平测定的，在NSG和NSG-Tg(Hu-IL15)小鼠的外周血中在所有测试时间点是相似的，在HSC注射后12周的代表性数据如图5所示。

[0222] 通过流式细胞术监测外周血中人CD3+T细胞的水平。与NSG小鼠相比，HSC移植的NSG-Tg(Hu-IL15)小鼠在血液中表现出类似的人T细胞的发育，参见图6。

[0223] HSC移植的NSG-Tg(Hu-IL15)小鼠与HSC移植的NSG小鼠相比，人NK细胞发育明显增强。来自HSC移植的小鼠的外周血在指示的时间点回收，并检测人NK细胞，如图7所述。NSG-Tg(Hu-IL15)小鼠与NSG小鼠相比，发现人NK细胞的水平在所有测试的时间点明显更高(图8)。

[0224] 通过流式细胞术监测外周血中人CD20+B细胞的水平。移植的NSG-Tg(Hu-IL15)小鼠与NSG小鼠相比，血液中人B细胞的比例较低，参见图9。

[0225] 通过流式细胞术监测外周血中人CD33+骨髓细胞的水平。与NSG小鼠相比，HSC移植的NSG-Tg(Hu-IL15)小鼠在血液中具有相似的人骨髓细胞的发育，参见图10。

[0226] 通过流式细胞仪监测外周血中人CD56+/CD16+NK细胞的总细胞水平。与NSG小鼠相比，HSC移植的NSG-Tg(Hu-IL15)小鼠在血液中显示出一致的人NK细胞数量，参见图11。

[0227] 从NSG-Tg(HuIL15)小鼠回收的人NK细胞也表现出功能表型。如图12A和12B以及图13A和图13B中所示，NSG-Tg(HuIL15)小鼠的血液和脾脏中显著较高比例的人NK细胞表达高水平的细胞内颗粒酶B(存在于NK细胞颗粒中的丝氨酸蛋白酶)和细胞内穿孔素(负责形成细胞膜内的孔的糖蛋白)。图12A中的虚线是“同型对照”或“FMO”(“荧光减一”对照)的曲线，其显示了其中背景水平用于实线中阳性染色的截止值的情况。它类似于图13B中的“FMO”标记的线。

[0228] NSG-Tg(Hu-IL15)小鼠维持植入的人NK细胞

[0229] 除了在人HSC移植后人IL-15支持人NK细胞发育的需要外，人NK细胞需要人IL-15

在体内和体外存活。为了确定NSG-Tg(Hu-IL15)小鼠在移植人外周血后是否支持人NK细胞的维持,8至12周龄的NSG-Tg(Hu-IL15)小鼠及年龄和性别匹配的NSG对照的组用IV注射的人外周血单核细胞(1x10^7PBMC)移植。第5天测定注射小鼠的外周血中CD56+人NK细胞的水平。与NSG小鼠相比,NSG-Tg(Hu-IL15)小鼠支持来自人PBMC的人NK细胞的增强的植入和存活。图14显示了人CD56+CD3-细胞作为总人CD45+白细胞比例的比例。NSG-Tg(Hu-IL15)小鼠超过50%的NK细胞保留,与NSG对照中不到10%的NK细胞保留相比。

[0230] 为了确定来自HSC移植的NSG-Tg(Hu-IL15)小鼠的人NK细胞是否杀伤NK敏感的靶标(K562细胞),人NK细胞从HSC移植的NSG-Tg(Hu-IL15)小鼠的脾脏或人PBMC富集,并使用标准的Cr^{51}释放分析评价其裂解K562靶细胞的能力。NK细胞和K562细胞一起孵育20小时,并定量Cr^{51}的释放。图15是显示来自HSC移植的NSG-Tg(Hu-IL15)小鼠的人NK细胞杀死NK敏感的靶标(K562细胞)的图。

[0231] 体内ADCC(抗体依赖性细胞介导的细胞毒性)分析

[0232] NSG-IL15小鼠移植人CD34+HSC。为评估发育的人NK细胞的ADCC活性,移植的小鼠和对照的未移植小鼠皮下注射(500万细胞)NK细胞敏感的B细胞肿瘤系(CD20+、Daudi或Raji细胞)。当肿瘤变得可触及时,小鼠每周3次用100ug抗CD20抗体(利妥昔单抗)治疗或保持不治疗。每周2次监测肿瘤生长,直至肿瘤大小达到2000mm^3。

[0233] 项目

[0234] 项目1.一种经遗传修饰以在其基因组中包括编码人白介素-15(hu-IL-15)的核苷酸序列的免疫缺陷小鼠,其中该小鼠表达hu-IL-15。

[0235] 项目2.项目1的免疫缺陷小鼠,其中小鼠不存在功能性内源小鼠NK细胞。

[0236] 项目3.项目1或项目2的免疫缺陷小鼠,其中小鼠为IL-2RG null,使得其缺乏功能性内源IL-2RG基因和缺乏功能性内源小鼠NK细胞。

[0237] 项目4.上述项目任何一项的免疫缺陷小鼠,其中免疫缺陷小鼠是遗传修饰的NSG、NRG或NOG小鼠。

[0238] 项目5.上述项目任何一项的免疫缺陷小鼠,进一步包含人造血干细胞、人外周血单核细胞(PBMC)、人NK细胞、人NK细胞系细胞或其任意两种或更多种的组合。

[0239] 项目6.上述项目任何一项的免疫缺陷小鼠,其中小鼠包含人自然杀伤细胞,且人自然杀伤细胞通过小鼠中人造血干细胞的分化在小鼠中产生,或其中人自然杀伤细胞在施用含有人自然杀伤细胞的PBMC后在小鼠中维持和/或产生。

[0240] 项目7.上述项目中任何一项的免疫缺陷小鼠,进一步包括包含人肿瘤细胞的人异种移植物。

[0241] 项目8.一种鉴定测试物质的抗肿瘤活性的方法,包括:提供根据项目1至6中任何一项的免疫缺陷小鼠;将人肿瘤细胞施用于免疫缺陷小鼠,其中人肿瘤细胞在遗传修饰的免疫缺陷小鼠中形成实体或非实体肿瘤;向免疫缺陷小鼠施用测试物质;和测定实体或非实体肿瘤对测试物质的反应,其中测试物质对肿瘤和/或肿瘤细胞的抑制性作用确定测试物质具有抗肿瘤活性。

[0242] 项目9.项目8的方法,进一步包括将所述反应与标准进行比较以确定测试物质对人肿瘤细胞的作用,其中测试物质对人肿瘤细胞的抑制性作用确定测试物质具有抗肿瘤活性。

[0243] 项目10.项目8或9的方法,其中测试物质包括免疫治疗剂。

[0244] 项目11.项目8至10中任何一项的方法,其中测试物质是免疫检查点抑制剂。

[0245] 项目12.项目11的方法,其中免疫检查点抑制剂是PD-1抑制剂、PD-L1抑制剂或CTLA-4抑制剂。

[0246] 项目13.项目11或12的方法,其中免疫检查点抑制剂是阿特珠单抗、阿维鲁单抗、德瓦鲁单抗、伊匹单抗、纳武单抗或派姆单抗,或者免疫检查点抑制剂包括上述任何一种的抗原结合片段。

[0247] 项目14.项目8至13中任何一项的方法,其中测试物质包括抗体。

[0248] 项目15.项目8至14中任何一项的方法,其中测试物质包括抗癌剂。

[0249] 项目16.一种制备遗传修饰的、免疫缺陷的人源化小鼠模型的方法,包括:提供根据项目1至4中任何一项的免疫缺陷小鼠;和向免疫缺陷小鼠施用人造血干细胞、人外周血单核细胞(PBMC)、人NK细胞、人NK细胞系细胞或其任何两种或更多种的组合。

[0250] 项目17.项目16的方法,进一步包括在施用人造血干细胞、人外周血单核细胞(PBMC)、人NK细胞、人NK细胞系细胞或其任意两种或更多种的组合之前,对免疫缺陷小鼠进行调理以减少小鼠的小鼠造血细胞。

[0251] 项目18.项目17的方法,其中调理免疫缺陷小鼠以减少小鼠的小鼠造血细胞包括照射遗传修饰的免疫缺陷小鼠和/或向遗传修饰的免疫缺陷小鼠施用拟放射药物。

[0252] 项目19.项目18的方法,其中在施用人造血干细胞之前不进行调理来减少小鼠的小鼠造血细胞。

[0253] 项目20.项目16至19中任何一项的方法,进一步包括向免疫缺陷小鼠施用包含人肿瘤细胞的人异种移植物。

[0254] 项目21.一种遗传修饰的免疫缺陷小鼠,其基本上如本文所描述或所显示。

[0255] 项目22.一种制备遗传修饰的、免疫缺陷的人源化小鼠模型的方法,其基本上如本文所描述或所显示。

[0256] 项目23.一种鉴定测试物质的抗肿瘤活性的方法,其基本上如本文所描述或所显示。

[0257] 序列

[0258] SEQ ID NO:1人白介素15

[0259] MRISKPHLRSISIQCYLCLLLNSHFLTEAGIHVFILGCFSAGLPKTEANWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS

[0260] SEQ ID NO:2编码人白介素15

[0261] atgagaatttcgaaaccacatttgagaagtatttccatccagtgctacttgtgtttacttctaaacagtcattttctaactgaagctggcattcatgtcttcattttgggctgtttcagtgcagggcttcctaaaacagaagccaactgggtgaatgtaataagtgatttgaaaaaaattgaagatcttattcaatctatgcatattgatgctactttatatacggaaagtgatgttcaccccagttgcaaagtaacagcaatgaagtgctttctcttggagttacaagttatttcacttgagtccggagatgcaagtattcatgatacagtagaaaatctgatcatcctagcaaacaacagtttgtcttctaatgggaatgtaacagaatctggatgcaaagaatgtgaggaactggaggaaaaaaatattaaagaatttttgcagagttttgtacatattgtccaaatgttcatcaacacttct

[0262] 应理解，为了清楚起见在单独实施方案的情况中描述的本发明的某些特征也可以在单一实施方案中组合地提供。相反，为了简洁起见在单一实施方案的上下文中描述的本发明的各种特征也可以单独地或以任何适当的子组合提供。

[0263] 本说明书中提到的任何专利或出版物在本文中通过引用并入，其程度如同每一个单独的出版物被具体和单独地表示通过引用并入的程度相同。

[0264] 本文描述的组合物和方法目前代表了优选的实施方案，是示例性的，并且不打算作为对本发明范围的限制。其中的变化和其他用途是本领域技术人员可以想到的。这种改变和其他用途可以在不偏离如权利要求书中所示的本发明范围的情况下作出。

序列表

<110> The Jackson Laboratory

<120> 转基因表达人白介素 15 的免疫缺陷小鼠

<130> 47JLA12452WO

<150> 62/543,218
<151> 2017-08-09

<150> 62/554,818
<151> 2017-09-06

<160> 2

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 162
<212> PRT
[0001] <213> 智人

<400> 1

Met Arg Ile Ser Lys Pro His Leu Arg Ser Ile Ser Ile Gln Cys Tyr
1 5 10 15

Leu Cys Leu Leu Leu Asn Ser His Phe Leu Thr Glu Ala Gly Ile His
20 25 30

Val Phe Ile Leu Gly Cys Phe Ser Ala Gly Leu Pro Lys Thr Glu Ala
35 40 45

Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys Lys Ile Glu Asp Leu Ile
50 55 60

Gln Ser Met His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr Glu Ser Asp Val His
65 70 75 80

Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu Leu Glu Leu Gln
85 90 95

Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile His Asp Thr Val Glu
100 105 110

Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asn Ser Leu Ser Ser Asn Gly Asn Val
115 120 125

Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu Glu Lys Asn Ile
130 135 140

Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val Gln Met Phe Ile Asn
145 150 155 160

Thr Ser

[0002]

<210> 2
<211> 486
<212> DNA
<213> 智人

<400> 2
atgagaattt cgaaaccaca tttgagaagt atttccatcc agtgctactt gtgtttactt 60

ctaaacagtc attttctaac tgaagctggc attcatgtct tcattttggg ctgtttcagt 120

gcagggcttc ctaaaacaga agccaactgg gtgaatgtaa taagtgattt gaaaaaaatt 180

gaagatctta ttcaatctat gcatattgat gctactttat atacggaaag tgatgttcac 240

cccagttgca aagtaacagc aatgaagtgc tttctcttgg agttacaagt tatttcactt 300

gagtccggag atgcaagtat tcatgataca gtagaaaatc tgatcatcct agcaaacaac 360

agtttgtctt ctaatgggaa tgtaacagaa tctggatgca aagaatgtga ggaactggag 420

gaaaaaaata ttaaagaatt tttgcagagt tttgtacata ttgtccaaat gttcatcaac 480

[0003]

acttct 486

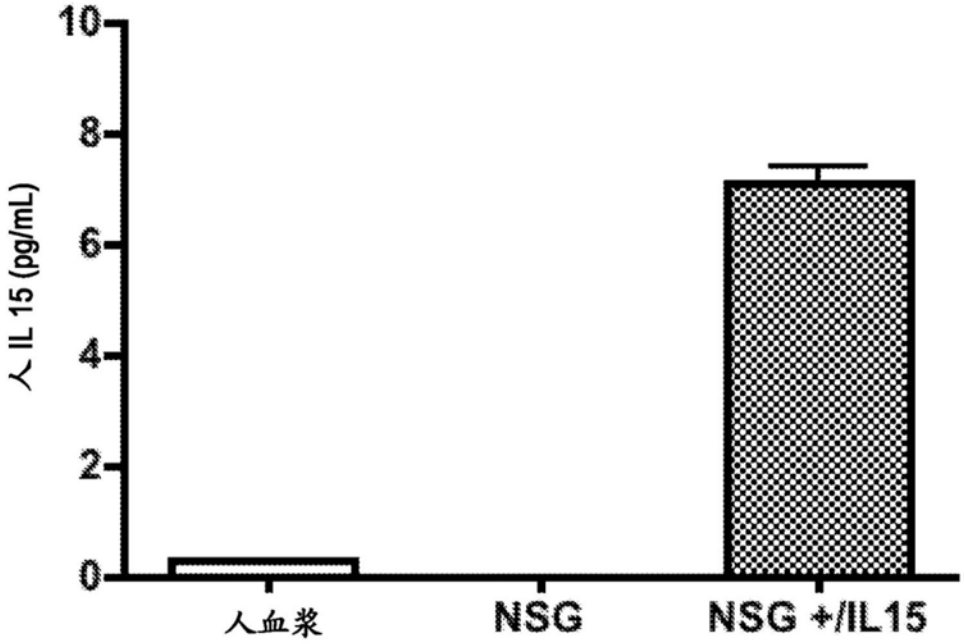

10
8
6
4
2
0
人 IL 15 (pg/mL)
人血浆
NSG
NSG +/IL15

图1

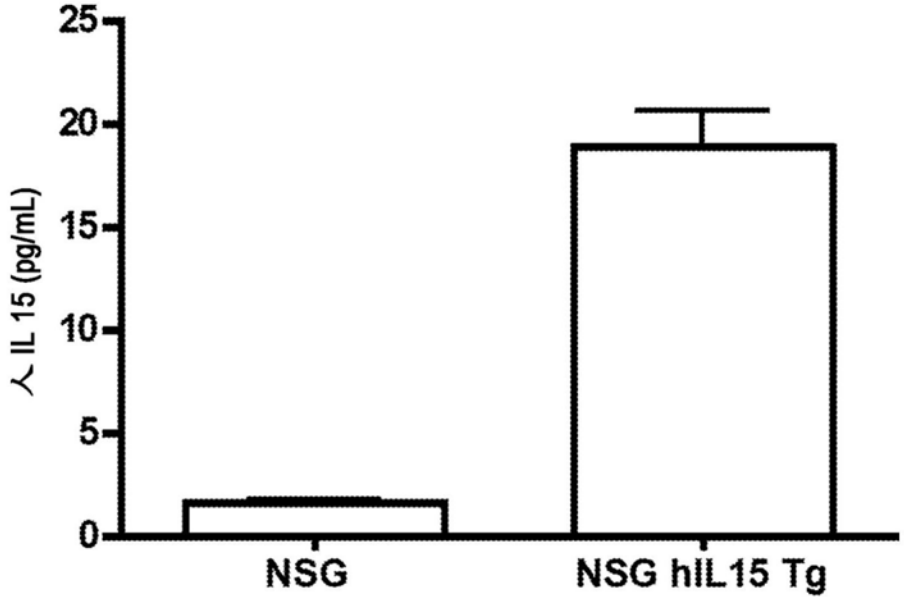

25
20
15
10
5
0
人 IL 15 (pg/mL)
NSG
NSG hIL15 Tg

图2

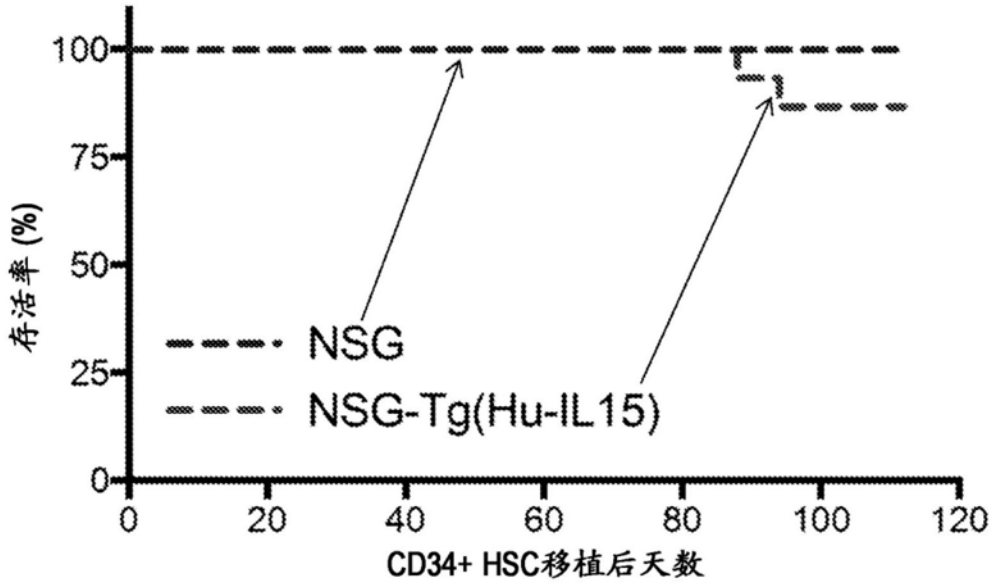

100
75
50
25
0
存活率 (%)
NSG
NSG-Tg(Hu-IL15)
0
20
40
60
80
100
120
CD34+ HSC移植后天数

图3

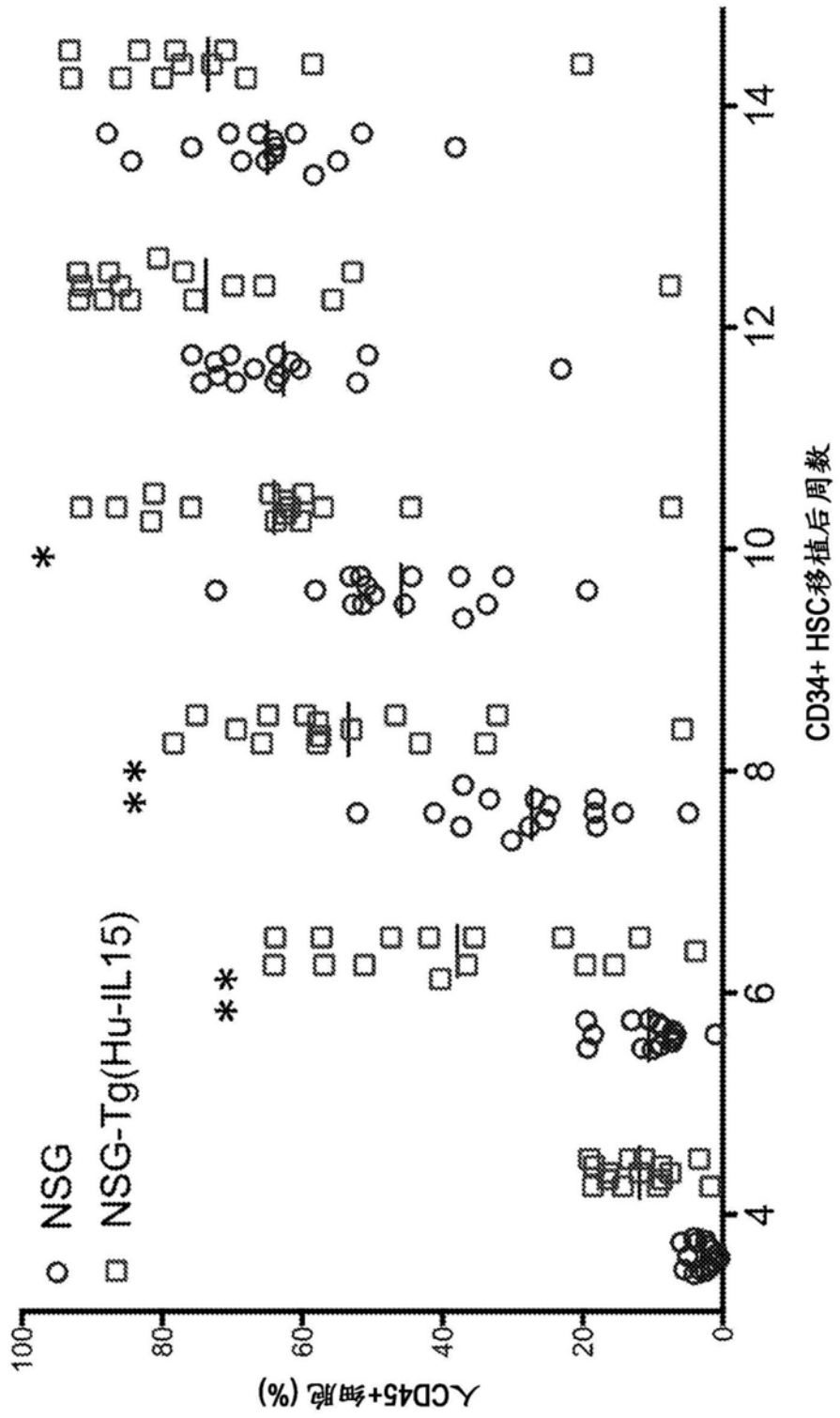

NSG
NSG-Tg(Hu-IL15)
*
**
**
CD34+ HSC移植后周数
人CD45+细胞 (%)
0
20
40
60
80
100
4
6
8
10
12
14

图4

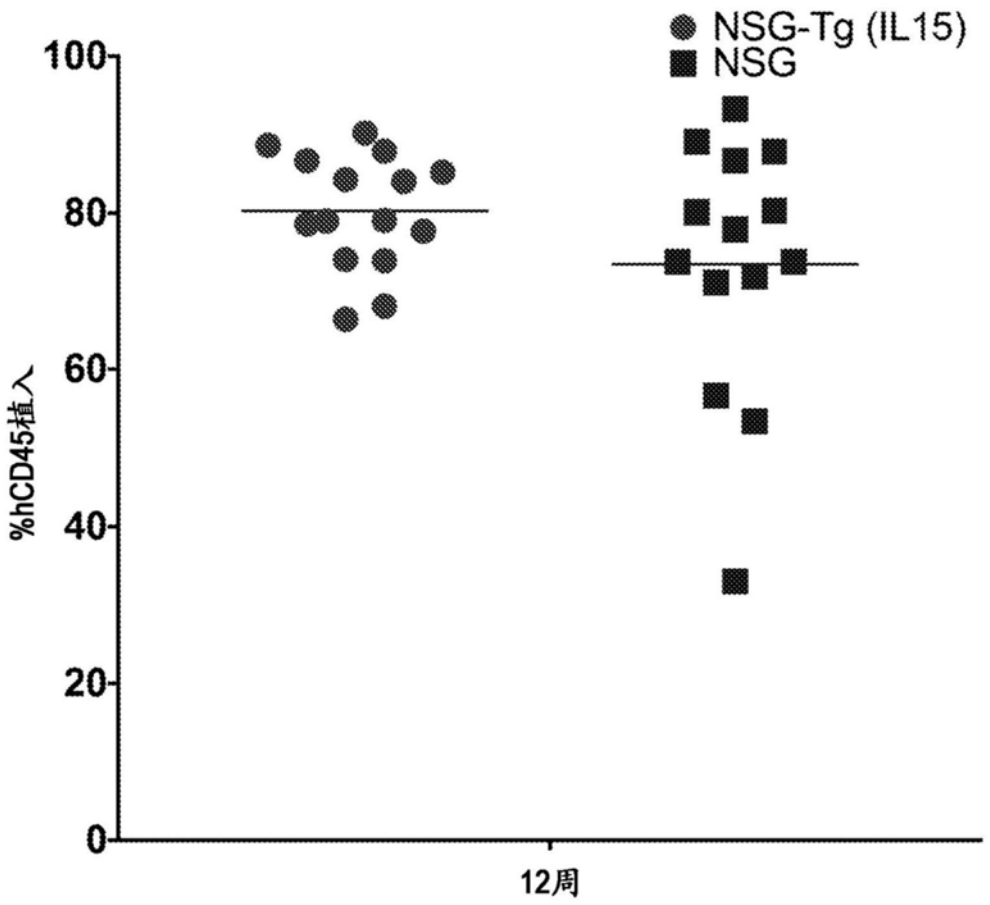


图5

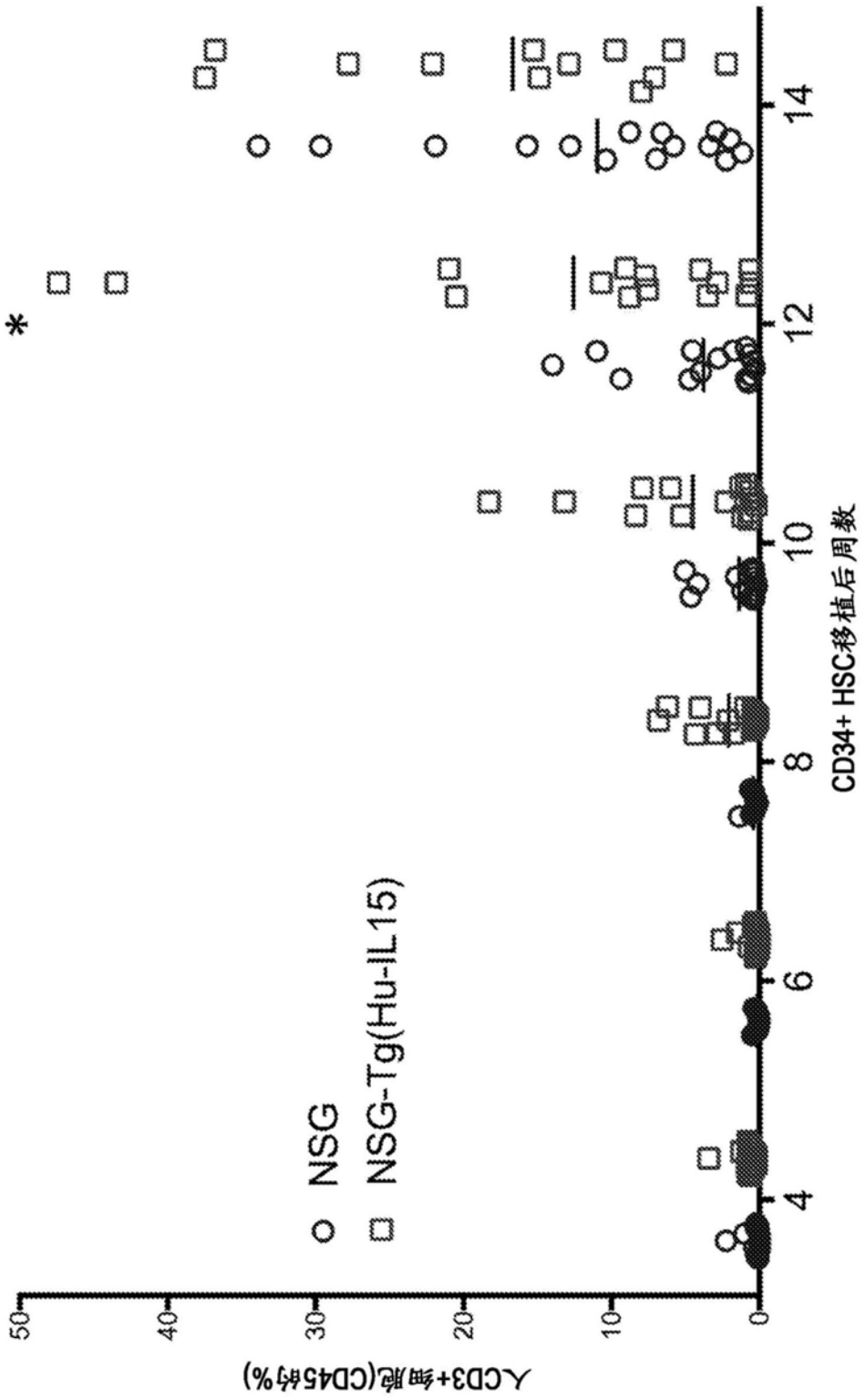

人CD3+细胞(CD45的%)
0
10
20
30
40
50
4
6
8
10
12
14
CD34+ HSC移植后周数
NSG
NSG-Tg(Hu-IL15)
*

图6

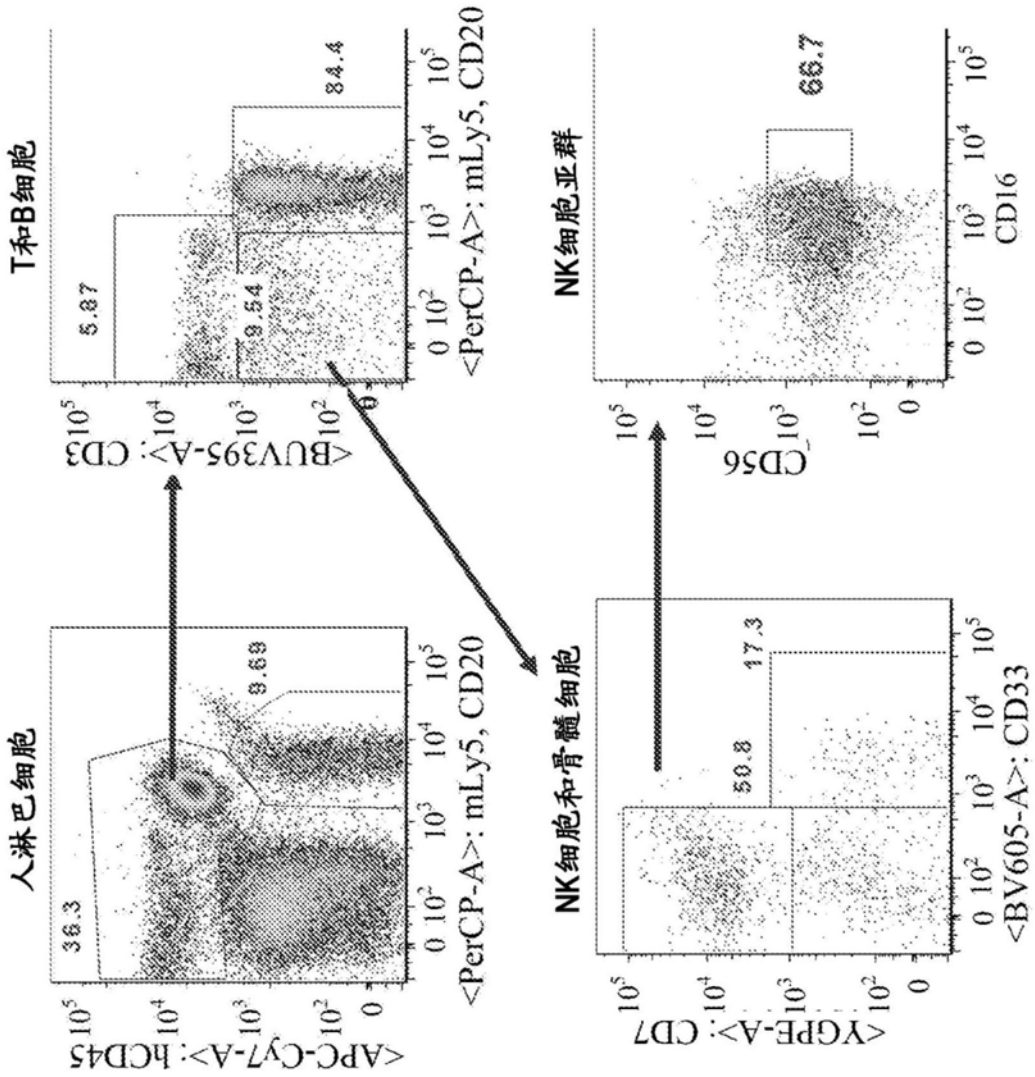

人淋巴细胞
T和B细胞
NK细胞和骨髓细胞
NK细胞亚群
36.3
9.69
5.87
9.54
84.4
50.8
17.3
66.7
<APC-Cy7-A>: hCD45
<PerCP-A>: mLy5, CD20
<BUV395-A>: CD3
<PerCP-A>: mLy5, CD20
<YGPE-A>: CD7
<BV605-A>: CD33
CD56
CD16

图7

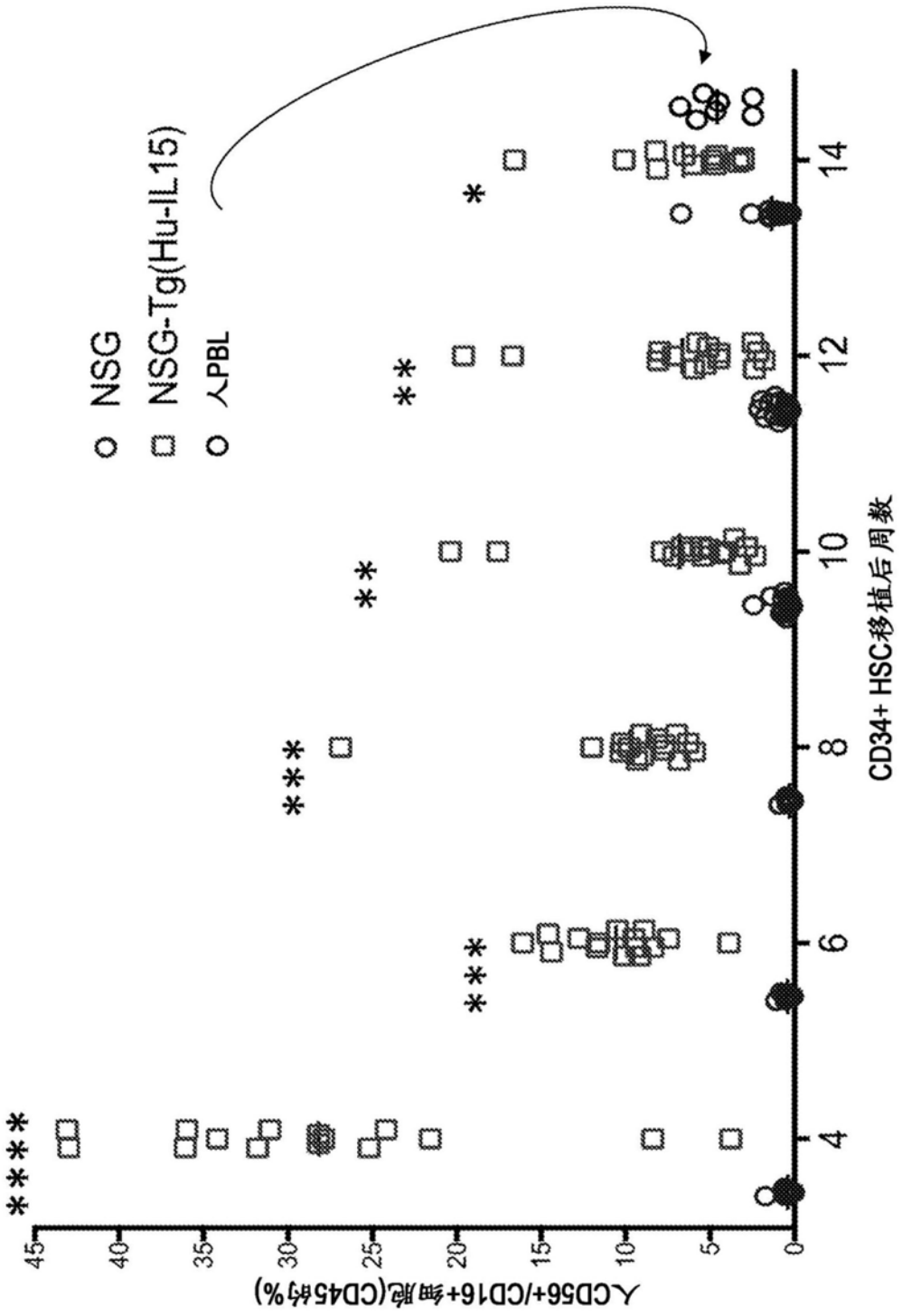

NSG
NSG-Tg(Hu-IL15)
人PBL
CD34+ HSC移植后周数
人CD56+/CD16+细胞(CD45的%)
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
4
6
8
10
12
14

图8

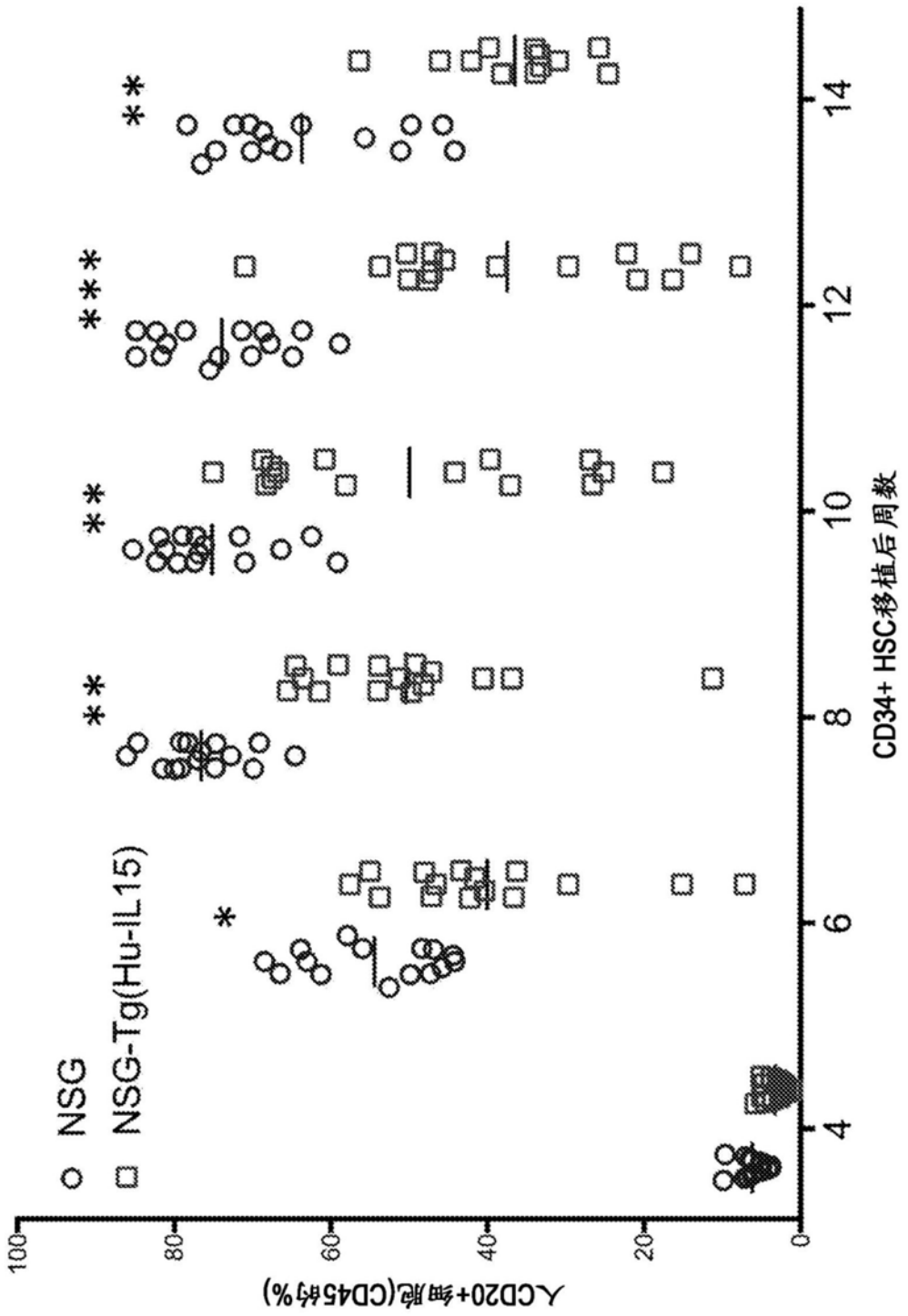

NSG
NSG-Tg(Hu-IL15)
人CD20+细胞(CD45的%)
CD34+ HSC移植后周数
0
20
40
60
80
100
4
6
8
10
12
14
*
**
***
**
**
***
**

图9

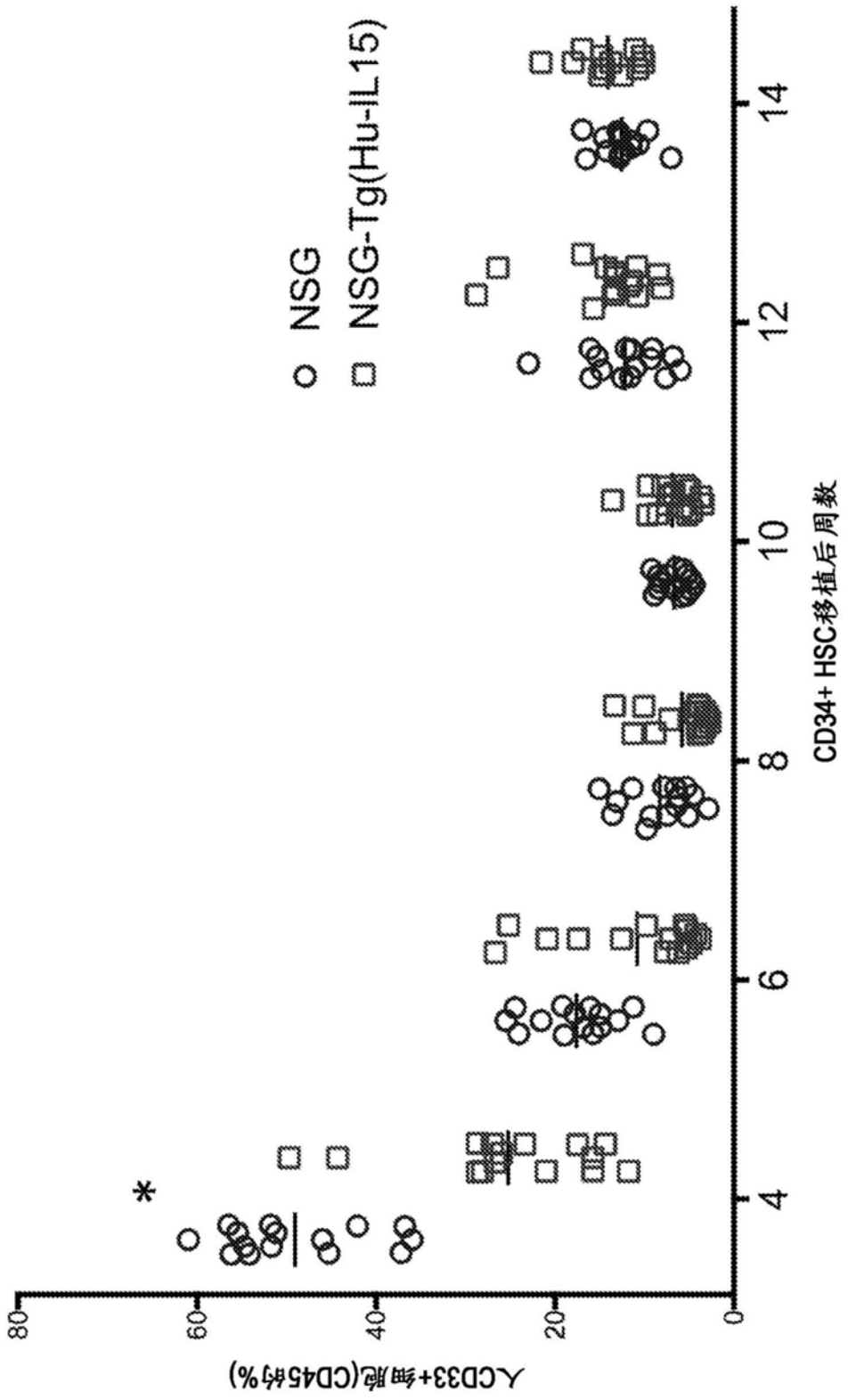

NSG
NSG-Tg(Hu-IL15)
*
0
20
40
60
80
4
6
8
10
12
14
CD34+ HSC移植后周数
人CD33+细胞(CD45的%)

图10

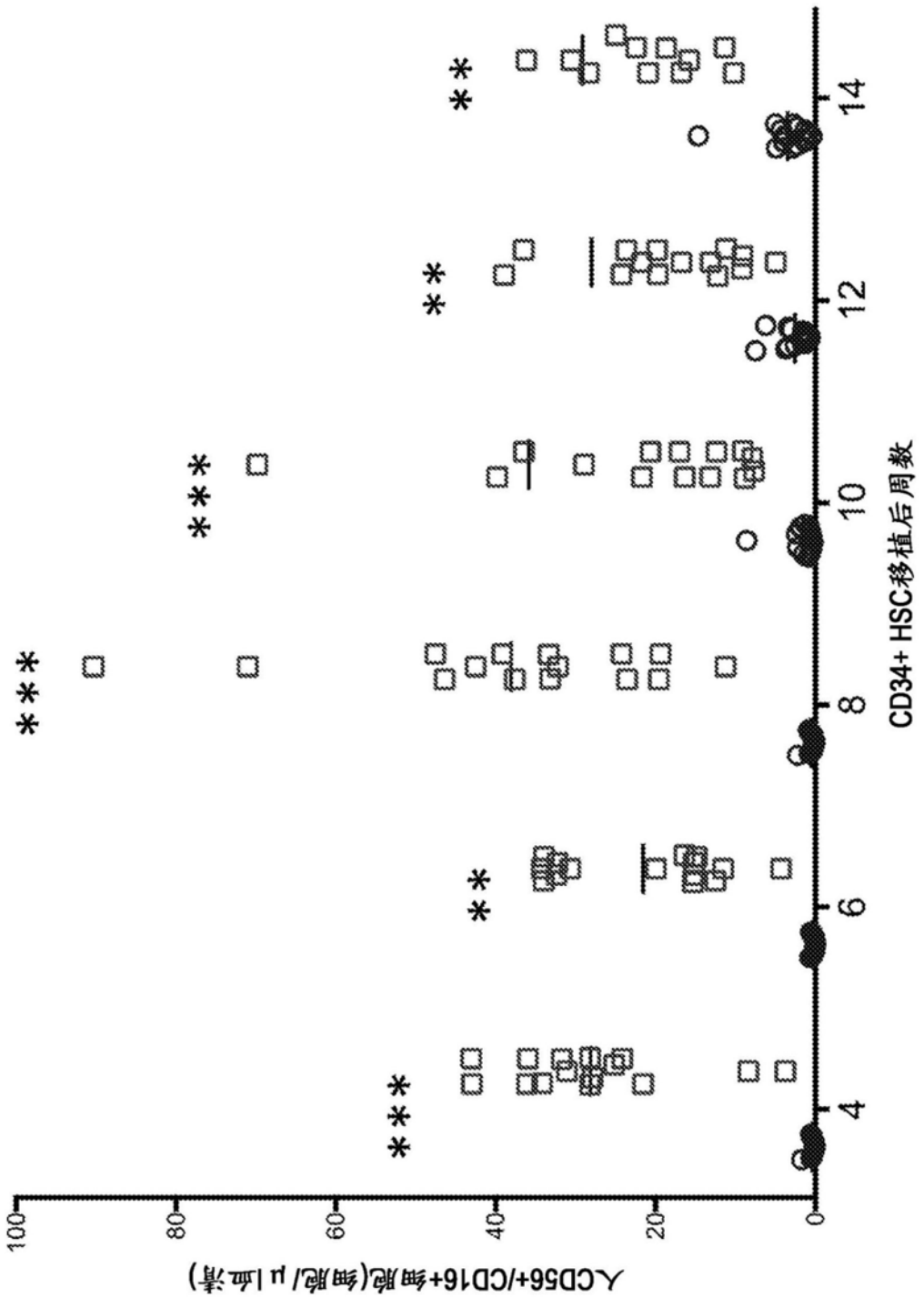

CD34+ HSC移植后周数
4
6
8
10
12
14
0
20
40
60
80
100
人CD56+/CD16+细胞(细胞/μl血清)

图11

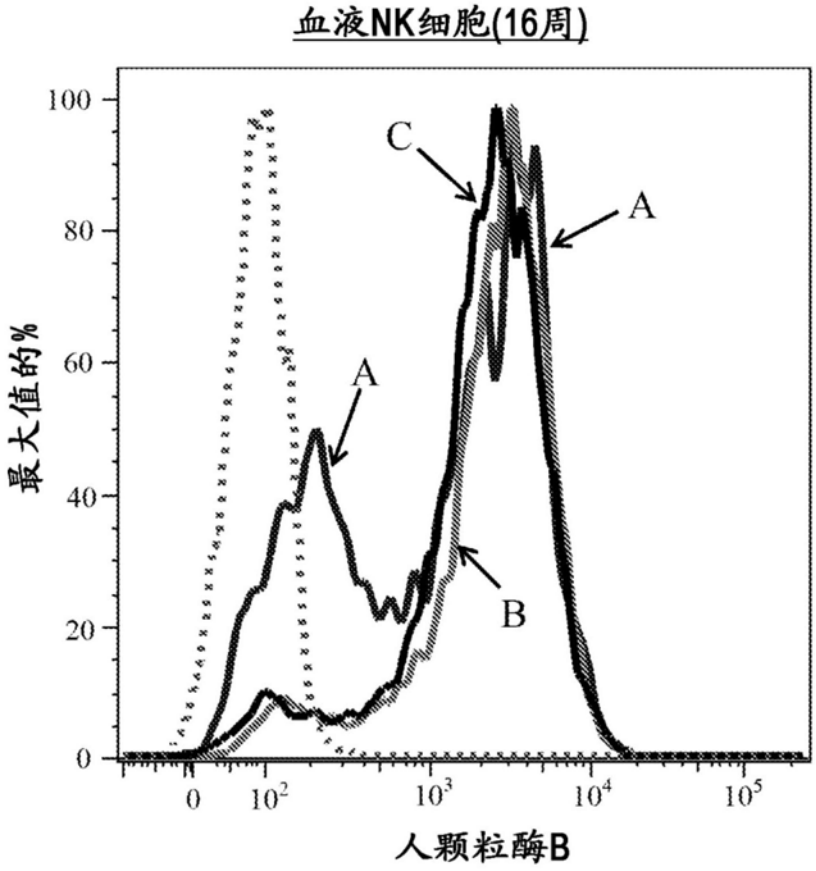

血液NK细胞(16周)
100
80
60
40
20
0
最大值的%
0
10^2
10^3
10^4
10^5
人颗粒酶B
A
B
C
A
NSG (A)
NSG-Tg(Hu-IL15) (B)
人PBL (C)

图12A

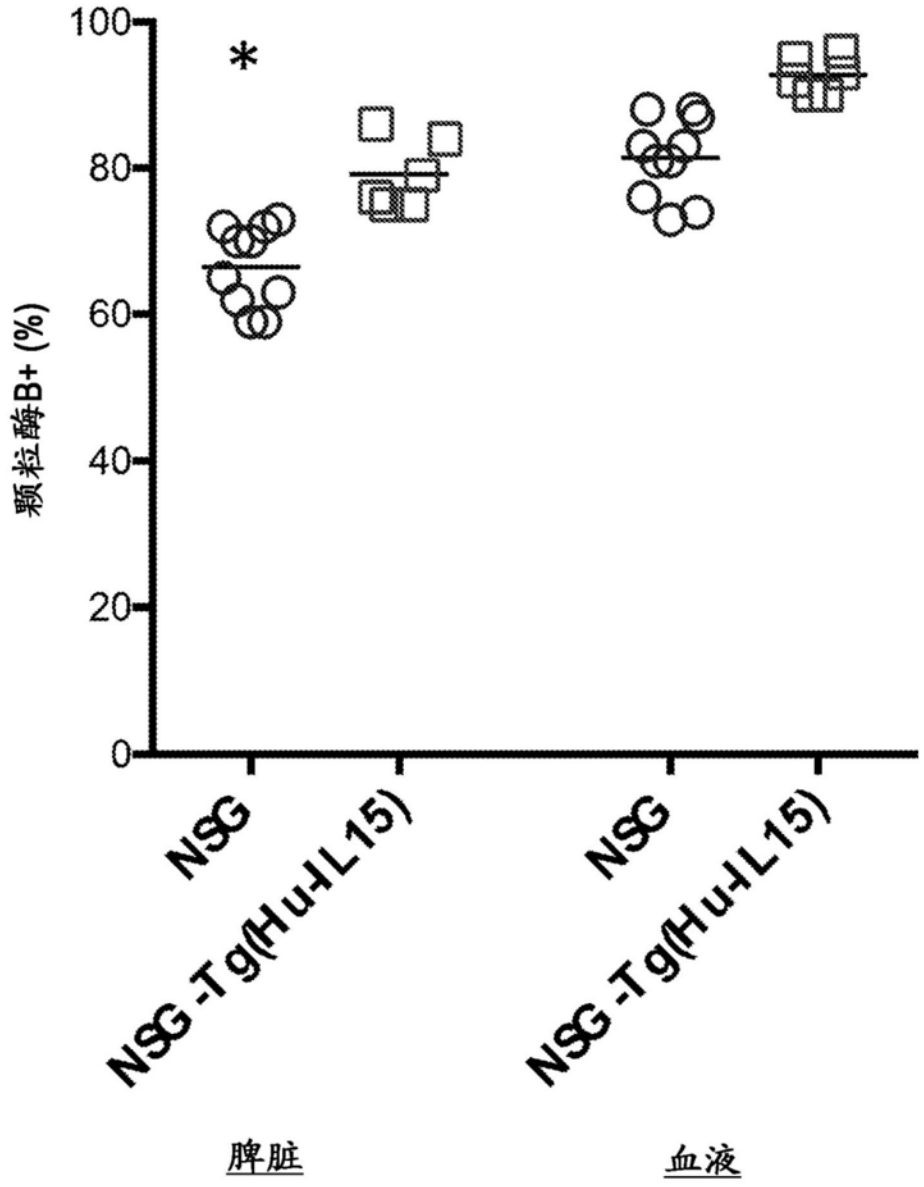


图12B

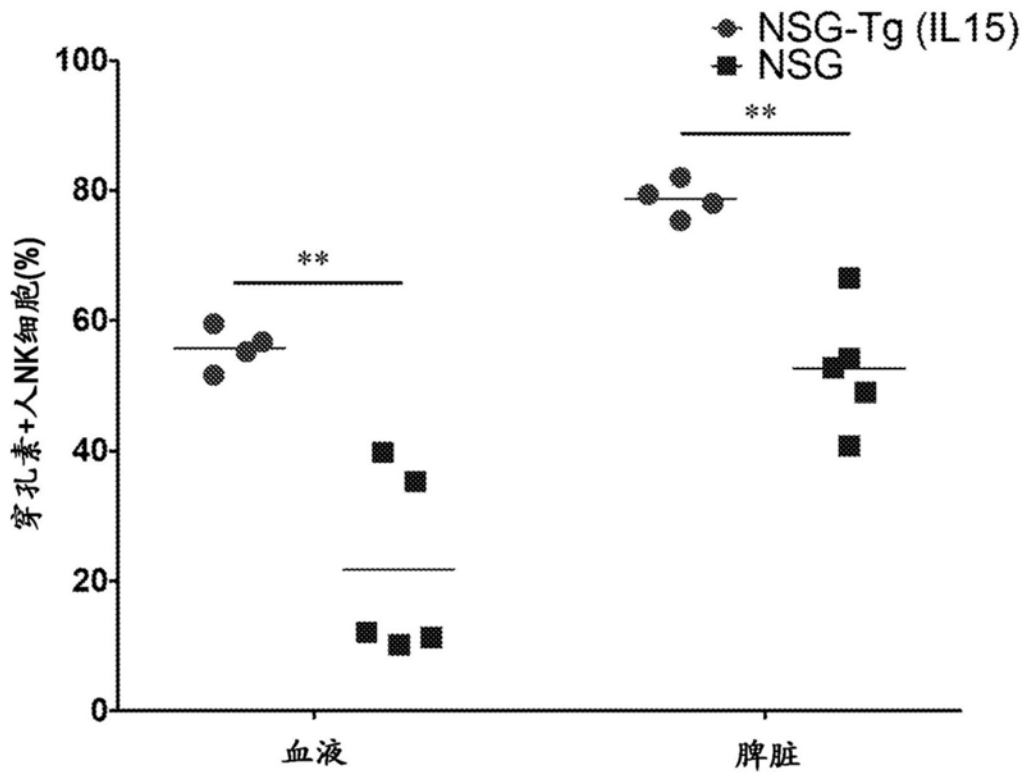


图13A

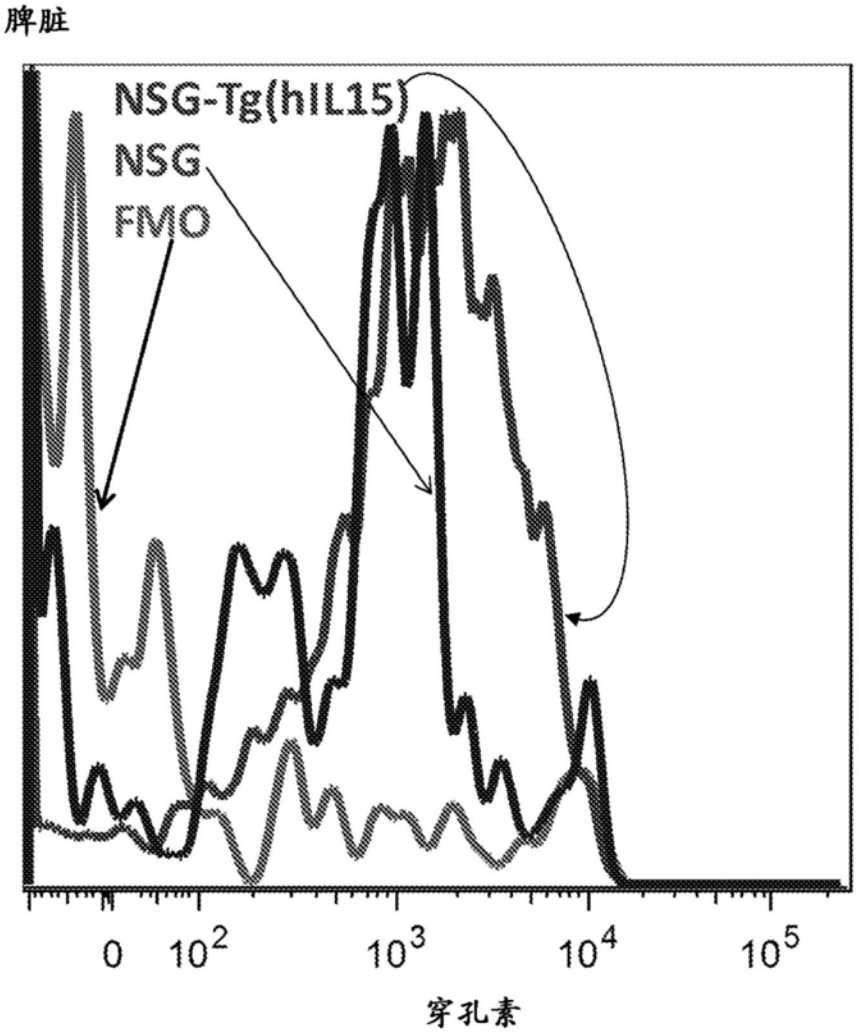


图13B

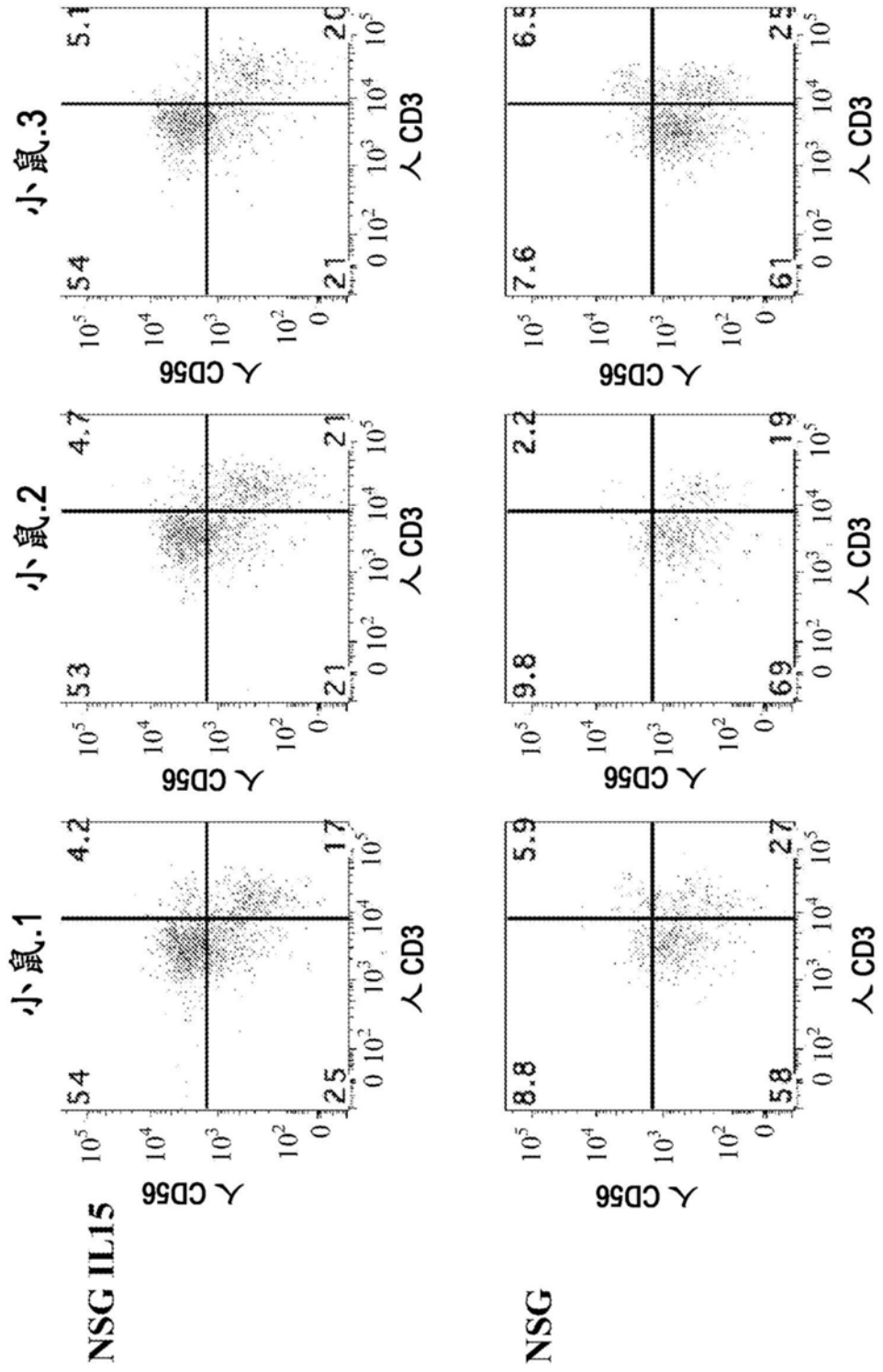

小鼠.3
小鼠.2
小鼠.1
NSG IL15
NSG
人 CD56
人 CD3
5.1
20
54
21
4.7
21
53
21
4.2
17
54
25
6.5
25
7.6
61
2.2
19
9.8
69
5.9
27
8.8
58

图14

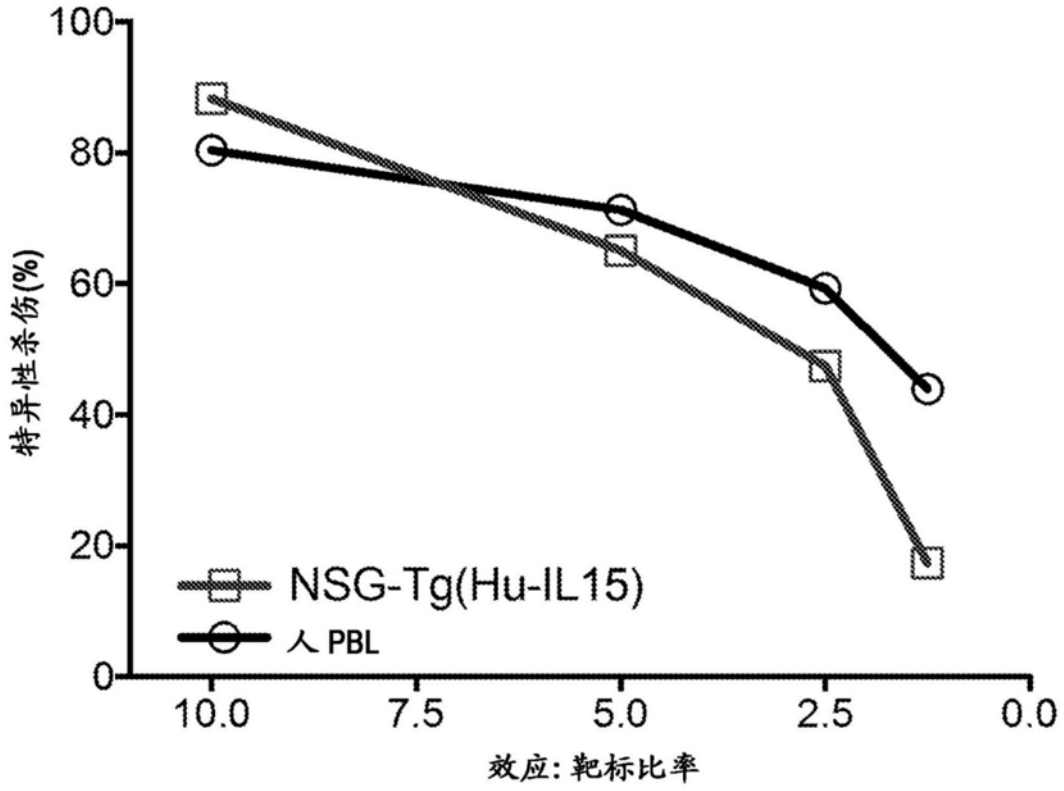


图15