(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년08월13일
(11) 등록번호 10-2693739
(24) 등록일자 2024년08월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A01K 67/027 (2024.01) *C07K 14/54* (2024.01)
(52) CPC특허분류
A01K 67/0275 (2024.01)
C07K 14/5443 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-7006440
(22) 출원일자(국제) 2018년08월09일
심사청구일자 2021년08월04일
(85) 번역문제출일자 2020년03월04일
(65) 공개번호 10-2020-0135274
(43) 공개일자 2020년12월02일
(86) 국제출원번호 PCT/US2018/046021
(87) 국제공개번호 WO 2019/032836
국제공개일자 2019년02월14일
(30) 우선권주장
62/543,218 2017년08월09일 미국(US)
62/554,818 2017년09월06일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
WO2016189799 A1*
(뒷면에 계속)
전체 청구항 수 : 총 18 항

(73) 특허권자
더 잭슨 래보라토리
미국 메인(우편번호 04609) 바 하버 메인 스트리트 600
유니버시티 오브 매사추세츠
미국 매사추세츠주 02108 보스턴 31 플로어 원 비컨 스트리트
(72) 발명자
슐츠, 레오나드, 디.
미국 04609 메인주 바 하버 인디언 포인트 로드 80
브렘, 마이클, 에이.
미국 01571 매사추세츠주 더들리 더들리 옥스포드 로드 101
그라이너, 데일, 엘.
미국 01452 매사추세츠주 허버드스턴 마운트 제퍼슨 로드 98
(74) 대리인
양영준, 김영

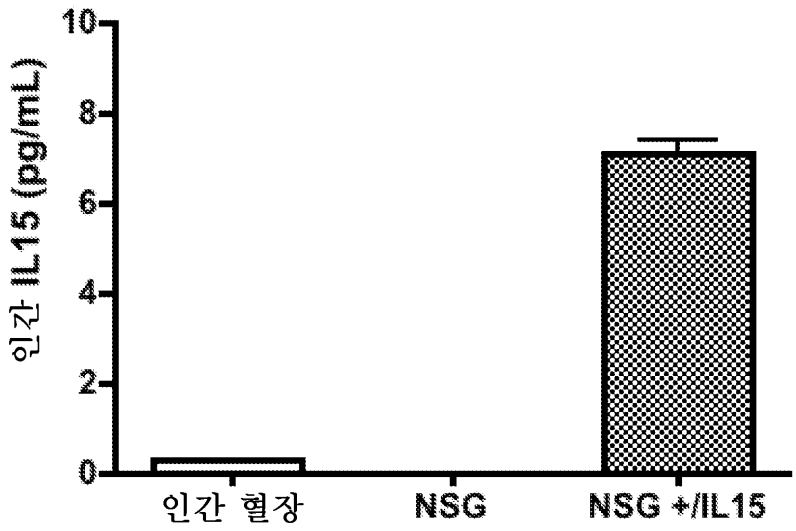
심사관 : 박영관

(54) 발명의 명칭 **인간 인터류킨 15를 발현하는 면역결핍 마우스**

(57) 요 약

인간 면역, 암, 감염성 질환, 및 다른 분야의 연구에 있어서의 인간 자연 살해 (NK) 세포 및 다른 인터류킨 15 (IL-15)-의존성 세포 집단 및 프로세스의 기능 및 조절의 모델로서 유용한 면역결핍 마우스가 제공된다. 구체적 측면에 따르면, 인간 인터류킨 15를 발현하도록 유전자 변형되는 면역결핍 마우스가 제공되며, 여기서 마우스는 기능적 마우스 자연 살해 세포를 갖지 않거나 또는 생산하지 않고, 마우스는 인간 자연 살해 세포를 포함하도록 변형된다. 본 발명의 마우스를 사용하여 시험 물질의 항종양 활성을 확인하는 방법이 마우스를 제조하는 방법과 함께 기재된다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A01K 2207/12 (2013.01)
A01K 2207/15 (2013.01)
A01K 2217/052 (2013.01)
A01K 2217/075 (2013.01)
A01K 2217/15 (2013.01)
A01K 2227/105 (2013.01)
A01K 2267/0331 (2013.01)

(56) 선행기술조사문헌
WO2016209865 A1
WO2016168212 A1
Blood Vol.119 no.12 pp.2778-2788(2012).
Open Immunol J vol.2 pp.79-85(2009)
Annu Rev Pathol vol.12 pp.187-205(2017)
Rettman, et al., AACR Annual Meeting 2022, Abstract nr 4247, Cancer Res 2022
Immunology vol.97(1) pp.159-165(1999)
J Clin Invest. vol.129(5) pp.2094-2106(2019)
Haematologica vol.100(4) pp.489-498(2015)
J Transl Med. vol.9, 113(2011)
J Immunol., vol.197(1) pp.78-84(2016)
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

명 세 서

청구범위

청구항 1

인간 인터류킨-15 (hu-IL-15)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 그의 게놈 내에 포함하도록 유전자 변형된 면역결핍 마우스이며, hu-IL-15를 발현하고, NOD.Cg-*Prkdc*^{scid} *IL-2rg*^{tm1Wjl}/SzJ 배경을 갖는 면역결핍 마우스.

청구항 2

제1항에 있어서, 기능적 내인성 마우스 자연 살해 (NK) 세포가 부재하는 면역결핍 마우스.

청구항 3

제1항에 있어서, 인간 조혈 줄기 세포, 인간 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC), 인간 NK 세포, 인간 NK 세포주 세포, 또는 그의 임의의 둘 이상의 조합을 추가로 포함하는 면역결핍 마우스.

청구항 4

제1항에 있어서, 마우스가 인간 자연 살해 세포를 포함하고, 인간 자연 살해 세포가 마우스에서 인간 조혈 줄기 세포의 분화에 의해 마우스에서 생산되거나 또는 인간 자연 살해 세포가, 인간 자연 살해 세포를 함유하는 PBMC의 투여 후 마우스에서 유지되고/되거나 생산되는 것인 면역결핍 마우스.

청구항 5

제1항에 있어서, 인간 종양 세포를 포함하는 인간 이종이식편을 추가로 포함하는 면역결핍 마우스.

청구항 6

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 따른 면역결핍 마우스를 제공하는 단계;

인간 종양 세포를 면역결핍 마우스에게 투여하는 단계이며, 여기서 인간 종양 세포가 유전자 변형된 면역결핍 마우스에서 고형 또는 비-고형 종양을 형성하는 것인 단계;

시험 물질을 면역결핍 마우스에게 투여하는 단계; 및

시험 물질에 대한 고형 또는 비-고형 종양의 반응을 검정하는 단계이며, 여기서 종양 및/또는 종양 세포에 대한 시험 물질의 억제 효과는 시험 물질을 항종양 활성을 갖는 것으로 확인시켜 주는 것인 단계

를 포함하는, 시험 물질의 항종양 활성을 확인하는 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 표준에 대한 반응을 비교하여 인간 종양 세포에 대한 시험 물질의 효과를 결정하는 것을 추가로 포함하며, 여기서 인간 종양 세포에 대한 시험 물질의 억제 효과는 시험 물질을 항종양 활성을 갖는 것으로 확인시켜 주는 것인 방법.

청구항 8

제6항에 있어서, 시험 물질이 면역요법제를 포함하는 것인 방법.

청구항 9

제6항에 있어서, 시험 물질이 면역 체크포인트 억제제인 방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 면역 체크포인트 억제제가 PD-1 억제제, PD-L1 억제제, 또는 CTLA-4 억제제인 방법.

청구항 11

제9항에 있어서, 면역 체크포인트 억제제가 아테졸리주맙, 아벨루맙, 두르발루맙, 이필리무맙, 니볼루맙, 또는 펨브롤리주맙이거나, 또는 면역 체크포인트 억제제가 전술한 것 중 어느 하나의 항원 결합 단편을 포함하는 것인 방법.

청구항 12

제6항에 있어서, 시험 물질이 항체를 포함하는 것인 방법.

청구항 13

제6항에 있어서, 시험 물질이 항암제를 포함하는 것인 방법.

청구항 14

제1항 또는 제2항에 따른 면역결핍 마우스를 제공하는 단계; 및

인간 조혈 줄기 세포, 인간 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC), 인간 NK 세포, 인간 NK 세포주 세포, 또는 그의 임의의 둘 이상의 조합을 면역결핍 마우스에게 투여하는 단계

를 포함하는, 인간화 면역결핍 마우스 모델을 생산하는 방법.

청구항 15

제14항에 있어서, 인간 조혈 줄기 세포, 인간 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC), 인간 NK 세포, 인간 NK 세포주 세포, 또는 그의 임의의 둘 이상의 조합을 투여하기 전에 마우스의 마우스 조혈 세포를 감소시키도록 면역결핍 마우스를 컨디셔닝하는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 16

제15항에 있어서, 마우스의 마우스 조혈 세포를 감소시키도록 면역결핍 마우스를 컨디셔닝하는 것이, 유전자 변형된 면역결핍 마우스에게 방사선조사하고/하거나 방사선모방 약물을 유전자 변형된 면역결핍 마우스에게 투여하는 것을 포함하는 것인 방법.

청구항 17

제14항에 있어서, 인간 조혈 줄기 세포, 인간 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC), 인간 NK 세포, 인간 NK 세포주 세포, 또는 그의 임의의 둘 이상의 조합을 투여하기 전에 마우스의 마우스 조혈 세포를 감소시키도록 컨디셔닝하는 것이 수행되지 않는 것인 방법.

청구항 18

제14항에 있어서, 인간 종양 세포를 포함하는 인간 이종이식편을 면역결핍 마우스에게 투여하는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] **관련 출원에 대한 참조**

[0002] 본 출원은 2017년 8월 9일에 출원된 미국 가출원 번호 62/543,218 및 2017년 9월 6일에 출원된 미국 가출원 번호 62/554,818을 우선권 주장하며, 이들 가출원의 전체 내용이 본원에 참조로 포함된다.

[0003] **발명의 분야**

[0004] 일반적 측면에 따르면, NK 세포 매개된 항체-의존성 세포 독성 (ADCC)의 평가를 위한 모델 시스템의 모델로서 유용하고, 인간 면역, 암, 감염성 질환, 및 다른 분야의 연구에 있어서의 인간 자연 살해 (NK) 세포 및 다른 인터류킨 15 (IL-15)-의존성 세포 집단 및 프로세스의 기능 및 조절의 모델로서 유용한 면역결핍 마우스가 제공된다. 구체적 측면에 따르면, 인간 인터류킨 15를 발현하도록 유전자 변형되는 면역결핍 마우스가 제공되며, 여기서 이러한 마우스는 기능적 마우스 자연 살해 세포를 갖지 않거나 또는 생산하지 않고, 상기 마우스는 인간 자연 살해 세포를 포함하도록 변형된다.

배 경 기 술

[0005] 인간 면역, 암, 감염성 질환, 및 다른 분야의 연구에 있어서의 인간 자연 살해 (NK) 세포 및 다른 인터류킨 15 (IL-15)-의존성 세포 집단 및 프로세스의 기능 및 조절의 마우스 모델에 대한 필요성이 지속적으로 대두되고 있다. 인간 NK 세포는 생체 내에서 인간 종양에 대항한 항체-의존성 세포-매개된 세포 독성 (ADCC)을 매개한다. 그러나, 인간 IL-15의 결여로 인해 암 면역 요법에서 인간 NK 세포의 생체내 역할을 연구하는 것은 어려웠다. 인간 IL-15는 성숙한 인간 기능적 NK 세포의 생체내 발달 및 생존에 필요하고, 마우스 IL-15는 인간 NK 세포 발달을 지원하지 않을 것이다. IL-15는 골수 간질 세포를 포함한 여러 세포 유형에 의해 생산된다. IL-15 분비 세포가 IL-15 수용체 알파 (IL-15rα)를 발현할 때 IL-15의 활성이 증가되는 것으로 보고되었다. IL-15:IL-15rα 복합체는 NK 세포 및 다른 IL-15 반응성 세포에 트랜스프리젠테이션된다. 본원에 나타낸 바와 같이, 예기치 않게도, 인간 IL-15를 발현하는 면역결핍 마우스는 IL-15rα 또는 임의의 다른 인자를 공급할 필요없이 인간 NK 세포 발달을 지원한다. 본 발명의 인간 IL-15를 발현하는 면역결핍 마우스는 NK 세포 매개된 ADCC 마우스의 평가를 위한 모델 시스템, 및 인간 면역, 암, 감염성 질환, 및 다른 분야의 연구에 있어서의 인간 자연 살해 (NK) 세포 및 다른 인터류킨 15 (IL-15)-의존성 세포 집단 및 프로세스의 기능 및 조절의 모델을 제공한다.

발명의 내용

[0006] 인간 인터류킨-15 (hu-IL-15)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 그의 게놈 내에 포함하도록 유전자 변형된 면역결핍 마우스가 본 발명의 측면에 따라 제공되며, 여기서 상기 마우스는 hu-IL-15를 발현한다. 특별한 측면에 따르면, 인간 인터류킨-15 (hu-IL-15)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 그의 게놈 내에 포함하도록 유전자 변형된 면역결핍 마우스는 기능적 내인성 마우스 NK 세포의 부재를 특징으로 한다. 특별한 측면에 따르면, 인간 인터류킨-15 (hu-IL-15)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 그의 게놈 내에 포함하도록 유전자 변형된 면역결핍 마우스는 IL-2RG 기능없음이며, 이에 따라 기능적 내인성 *IL-2RG* 유전자가 결여되고 기능적 내인성 마우스 NK 세포의 부재를 특징으로 한다. 특별한 측면에 따르면, 인간 인터류킨-15 (hu-IL-15)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 그의 게놈 내에 포함하도록 유전자 변형된 면역결핍 마우스는 인간 종양 세포를 포함한 인간 이종이식편을 추가로 포함한다.

[0007] 인간 인터류킨-15 (hu-IL-15)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 그의 게놈 내에 포함하도록 유전자 변형된 면역결핍 NSG, NRG 또는 NOG 마우스가 본 발명의 측면에 따라 제공되며, 여기서 이러한 NSG, NRG 또는 NOG 마우스는 hu-IL-15를 발현한다. 특별한 측면에 따르면, hu-IL-15를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 그의 게놈 내에 포함하도록 유전자 변형된 면역결핍 NSG, NRG 또는 NOG 마우스는 기능적 내인성 마우스 NK 세포의 부재를 특징으로 한다. 특별한 측면에 따르면, 인간 인터류킨-15 (hu-IL-15)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 그의 게놈 내에 포함하도록 유전자 변형된 면역결핍 NSG, NRG 또는 NOG 마우스는 IL-2RG 기능없음이며, 이에 따라 기능적 내인성 *IL-2RG* 유전자가 결여되고 기능적 내인성 마우스 NK 세포의 부재를 특징으로 한다. 특별한 측면에 따르면,

hu-IL-15를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 그의 게놈 내에 포함하도록 유전자 변형된 면역결핍 NSG, NRG 또는 NOG 마우스는 인간 종양 세포를 포함한 인간 이종이식편을 추가로 포함한다.

[0008] hu-IL-15를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 그의 게놈 내에 포함하도록 유전자 변형된 면역결핍 마우스가 본 발명의 측면에 따라 제공되며, 여기서 상기 마우스는 hu-IL-15를 발현하고, 상기 마우스는 인간 조혈 줄기 세포, 인간 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC), 인간 NK 세포, 인간 NK 세포주 세포, 또는 그의 임의의 둘 이상의 조합을 추가로 포함한다. 특별한 측면에 따르면, hu-IL-15를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 그의 게놈 내에 포함하도록 유전자 변형된 면역결핍 마우스는 기능적 내인성 마우스 NK 세포의 부재를 특징으로 한다. 특별한 측면에 따르면, hu-IL-15를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 그의 게놈 내에 포함하도록 유전자 변형된 면역결핍 마우스는 IL-2RG 기능없음이며, 이에 따라 기능적 내인성 *IL-2RG* 유전자가 결여되고 기능적 내인성 마우스 NK 세포의 부재를 특징으로 한다. 특별한 측면에 따르면, hu-IL-15를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 그의 게놈 내에 포함하도록 유전자 변형된 면역결핍 마우스가 제공되며, 여기서 상기 마우스는 hu-IL-15를 발현하고, 상기 마우스는 인간 조혈 줄기 세포, 인간 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC), 인간 NK 세포, 인간 NK 세포주 세포, 또는 그의 임의의 둘 이상의 조합을 포함하며, 인간 종양 세포를 포함한 인간 이종이식편을 추가로 포함한다.

[0009] hu-IL-15를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 그의 게놈 내에 포함하도록 유전자 변형된 면역결핍 NSG, NRG 또는 NOG 마우스가 본 발명의 측면에 따라 제공되며, 여기서 상기 NSG, NRG 또는 NOG 마우스는 hu-IL-15를 발현하고, 상기 마우스는 인간 조혈 줄기 세포, 인간 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC), 인간 NK 세포, 인간 NK 세포주 세포, 또는 그의 임의의 둘 이상의 조합을 추가로 포함한다. 특별한 측면에 따르면, hu-IL-15를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 그의 게놈 내에 포함하도록 유전자 변형된 면역결핍 NSG, NRG 또는 NOG 마우스는 기능적 내인성 마우스 NK 세포의 부재를 특징으로 한다. 특별한 측면에 따르면, hu-IL-15를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 그의 게놈 내에 포함하도록 유전자 변형된 면역결핍 NSG, NRG 또는 NOG 마우스는 IL-2RG 기능없음이며, 이에 따라 기능적 내인성 *IL-2RG* 유전자가 결여되고 기능적 내인성 마우스 NK 세포의 부재를 특징으로 한다. 특별한 측면에 따르면, hu-IL-15를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 그의 게놈 내에 포함하도록 유전자 변형된 면역결핍 NSG, NRG 또는 NOG 마우스는 hu-IL-15를 발현하며, 여기서 상기 마우스는 인간 조혈 줄기 세포, 인간 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC), 인간 NK 세포, 인간 NK 세포주 세포, 또는 그의 임의의 둘 이상의 조합을 추가로 포함하고, 상기 마우스는 인간 종양 세포를 포함한 인간 이종이식편을 추가로 포함한다.

[0010] 인간 인터류킨-15 (hu-IL-15)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 그의 게놈 내에 포함하도록 유전자 변형된 면역결핍 마우스가 본 발명의 측면에 따라 제공되며, 여기서 상기 마우스는 hu-IL-15를 발현하고, 상기 마우스는 인간 NK 세포주 세포 및/또는 인간 자연 살해 세포를 추가로 포함하고, 인간 자연 살해 세포는 상기 마우스에서의 인간 조혈 줄기 세포의 분화에 의해 및/또는 인간 자연 살해 세포를 포함한 PBMC의 투여에 의해, 및/또는 정제된 인간 NK 세포의 투여에 의해 마우스에서 생산된다. 특별한 측면에 따르면, 인간 인터류킨-15 (hu-IL-15)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 그의 게놈 내에 포함하도록 유전자 변형된 면역결핍 마우스는 기능적 내인성 마우스 NK 세포의 부재를 특징으로 한다. 특별한 측면에 따르면, 인간 인터류킨-15 (hu-IL-15)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 그의 게놈 내에 포함하도록 유전자 변형된 면역결핍 마우스는 IL-2RG 기능없음이며, 이에 따라 기능적 내인성 *IL-2RG* 유전자가 결여되고 기능적 내인성 마우스 NK 세포의 부재를 특징으로 한다. 특별한 측면에 따르면, 인간 인터류킨-15 (hu-IL-15)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 그의 게놈 내에 포함하도록 유전자 변형된 면역결핍 마우스는 hu-IL-15를 발현하며, 여기서 상기 마우스는 인간 NK 세포주 세포 및/또는 인간 자연 살해 세포를 추가로 포함하고, 인간 자연 살해 세포는 상기 마우스에서의 인간 조혈 줄기 세포의 분화에 의해 및/또는 인간 자연 살해 세포를 포함한 PBMC의 투여에 의해, 및/또는 정제된 인간 NK 세포의 투여에 의해 마우스에서 생산되고, 상기 마우스는 인간 종양 세포를 포함한 인간 이종이식편을 추가로 포함한다.

[0011] 인간 인터류킨-15 (hu-IL-15)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 그의 게놈 내에 포함하도록 유전자 변형된 면역결핍 NSG, NRG 또는 NOG 마우스가 본 발명의 측면에 따라 제공되며, 여기서 상기 NSG, NRG 또는 NOG 마우스는 hu-IL-15를 발현하고, 상기 마우스는 인간 NK 세포주 세포 및/또는 인간 자연 살해 세포를 추가로 포함하고, 인간 자연 살해 세포는 상기 마우스에서의 인간 조혈 줄기 세포의 분화에 의해 및/또는 인간 자연 살해 세포를 포함한 PBMC의 투여에 의해, 및/또는 정제된 인간 NK 세포의 투여에 의해 마우스에서 생산된다. 특별한 측면에 따르면, 인간 인터류킨-15 (hu-IL-15)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 그의 게놈 내에 포함하도록 유전자 변형된 면역결핍 NSG, NRG 또는 NOG 마우스는 기능적 내인성 마우스 NK 세포의 부재를 특징으로 한다. 특별한 측면에 따르면, 인간 인터류킨-15 (hu-IL-15)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 그의 게놈 내에 포함하도록 유전자 변형된 면역결핍 NSG, NRG 또는 NOG 마우스는 IL-2RG 기능없음이며, 이에 따라 기능적 내인성 *IL-2RG* 유전자가 결여되고 기능적 내인성 마우스 NK 세포의 부재를 특징으로 한다. 특별한 측면에 따르면, 인간 인터류킨-15

(hu-IL-15)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 그의 게놈 내에 포함하도록 유전자 변형된 면역결핍 NSG, NRG 또는 NOG 마우스는 hu-IL-15를 발현하며, 여기서 상기 마우스는 인간 NK 세포주 세포 및/또는 인간 자연 살해 세포를 추가로 포함하고, 인간 자연 살해 세포는 상기 마우스에서의 인간 조혈 줄기 세포의 분화에 의해 및/또는 인간 자연 살해 세포를 포함한 PBMC의 투여에 의해, 및/또는 정제된 인간 NK 세포의 투여에 의해 마우스에서 생산되고, 상기 마우스는 인간 종양 세포를 포함한 인간 이종이식편을 추가로 포함한다.

[0012] 본 발명의 측면에 따라 제공되는, hu-IL-15를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 그의 게놈 내에 포함하도록 유전자 변형된 면역결핍 마우스를 제공하는 단계이며, 여기서 상기 마우스가 hu-IL-15를 발현하는 것인 단계; 인간 종양 세포를 상기 면역결핍 마우스에게 투여하는 단계이며, 여기서 인간 종양 세포가 상기 유전자 변형된 면역결핍 마우스에서 고형 또는 비-고형 종양을 형성하는 것인 단계; 시험 물질을 상기 면역결핍 마우스에게 투여하는 단계; 및 시험 물질에 대한 고형 또는 비-고형 종양의 반응을 검정하는 단계이며, 여기서 종양 및/또는 종양 세포에 대한 시험 물질의 억제 효과는 시험 물질을 항종양 활성을 갖는 것으로 확인시켜 주는 것인 단계를 포함하는, 시험 물질의 항종양 활성을 확인하는 방법이 본 발명의 측면에 따라 제공된다. 특별한 측면에 따르면, hu-IL-15를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 그의 게놈 내에 포함하도록 유전자 변형된 면역결핍 마우스 (여기서, 이러한 마우스는 hu-IL-15를 발현한다)는 기능적 내인성 마우스 NK 세포의 부재를 특징으로 하고, 상기 방법은 인간 종양 세포를 상기 면역결핍 마우스에게 투여하는 단계이며, 여기서 인간 종양 세포가 상기 유전자 변형된 면역결핍 마우스에서 고형 또는 비-고형 종양을 형성하는 것인 단계; 시험 물질을 상기 면역결핍 마우스에게 투여하는 단계; 및 시험 물질에 대한 고형 또는 비-고형 종양의 반응을 검정하는 단계이며, 여기서 종양 및/또는 종양 세포에 대한 시험 물질의 억제 효과는 시험 물질을 항종양 활성을 갖는 것으로 확인시켜 주는 것인 단계를 포함한다. 특별한 측면에 따르면, hu-IL-15를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 그의 게놈 내에 포함하도록 유전자 변형된 면역결핍 마우스 (여기서, 이러한 마우스는 hu-IL-15를 발현한다)는 IL-2RG 기능없음이며, 이에 따라 기능적 내인성 *IL-2RG* 유전자가 결여되고 기능적 내인성 마우스 NK 세포의 부재를 특징으로 하며, 상기 방법은 인간 종양 세포를 상기 면역결핍 마우스에게 투여하는 단계이며, 여기서 인간 종양 세포가 상기 유전자 변형된 면역결핍 마우스에서 고형 또는 비-고형 종양을 형성하는 것인 단계; 시험 물질을 상기 면역결핍 마우스에게 투여하는 단계; 및 시험 물질에 대한 고형 또는 비-고형 종양의 반응을 검정하는 단계이며, 여기서 종양 및/또는 종양 세포에 대한 시험 물질의 억제 효과는 시험 물질을 항종양 활성을 갖는 것으로 확인시켜 주는 것인 단계를 포함한다. 특별한 측면에 따르면, hu-IL-15를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 그의 게놈 내에 포함하도록 유전자 변형된 면역결핍 마우스 (여기서, 이러한 마우스는 hu-IL-15를 발현한다)는 기능적 내인성 마우스 NK 세포의 부재를 특징으로 하는 유전자 변형된 NSG, NRG 또는 NOG 마우스이고, 상기 마우스는 인간 NK 세포주 세포 및/또는 인간 자연 살해 세포를 추가로 포함하고, 인간 자연 살해 세포는 상기 마우스에서의 인간 조혈 줄기 세포의 분화에 의해 및/또는 인간 자연 살해 세포를 포함한 PBMC의 투여에 의해, 및/또는 정제된 인간 NK 세포의 투여에 의해 마우스에서 생산되며, 상기 방법은 인간 종양 세포를 상기 면역결핍 마우스에게 투여하는 단계이며, 여기서 인간 종양 세포가 상기 유전자 변형된 면역결핍 마우스에서 고형 또는 비-고형 종양을 형성하는 것인 단계; 시험 물질을 상기 면역결핍 마우스에게 투여하는 단계; 및 시험 물질에 대한 고형 또는 비-고형 종양의 반응을 검정하는 단계이며, 여기서 종양 및/또는 종양 세포에 대한 시험 물질의 억제 효과는 시험 물질을 항종양 활성을 갖는 것으로 확인시켜 주는 것인 단계를 포함한다.

[0013] 특별한 측면에 따르면, hu-IL-15를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 그의 게놈 내에 포함하도록 유전자 변형된 면역결핍 마우스 (여기서, 이러한 마우스는 hu-IL-15를 발현한다)는 IL-2RG 기능없음이며, 이에 따라 기능적 내인성 *IL-2RG* 유전자가 결여되고 기능적 내인성 마우스 NK 세포의 부재를 특징으로 하며, 여기서 상기 마우스는 인간 NK 세포주 세포 및/또는 인간 자연 살해 세포를 추가로 포함하고, 인간 자연 살해 세포는 상기 마우스에서의 인간 조혈 줄기 세포의 분화에 의해 및/또는 인간 자연 살해 세포를 포함한 PBMC의 투여에 의해, 및/또는 정제된 인간 NK 세포의 투여에 의해 마우스에서 생산되며, 상기 방법은 인간 종양 세포를 상기 면역결핍 마우스에게 투여하는 단계이며, 여기서 인간 종양 세포가 상기 유전자 변형된 면역결핍 마우스에서 고형 또는 비-고형 종양을 형성하는 것인 단계; 시험 물질을 상기 면역결핍 마우스에게 투여하는 단계; 및 시험 물질에 대한 고형 또는 비-고형 종양의 반응을 검정하는 단계이며, 여기서 종양 및/또는 종양 세포에 대한 시험 물질의 억제 효과는 시험 물질을 항종양 활성을 갖는 것으로 확인시켜 주는 것인 단계를 포함한다.

[0014] 특별한 측면에 따르면, hu-IL-15를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 그의 게놈 내에 포함하도록 유전자 변형된 면역결핍 마우스는 유전자 변형된 NSG, NRG, 또는 NOG 마우스이며, 여기서 이러한 마우스는 hu-IL-15를 발현하고, IL-2RG 기능없음이며, 이에 따라 기능적 내인성 *IL-2RG* 유전자가 결여되고, 기능적 내인성 마우스 NK 세포의 부재를 특징으로 하며, 여기서 상기 마우스는 인간 NK 세포주 세포 및/또는 인간 자연 살해 세포를 추가로 포함하고, 인간 자연 살해 세포는 상기 마우스에서의 인간 조혈 줄기 세포의 분화에 의해 및/또는 인간 자연 살해 세

포를 포함한 PBMC의 투여에 의해, 및/또는 정제된 인간 NK 세포의 투여에 의해 마우스에서 생산되며, 상기 방법은 인간 종양 세포를 상기 면역결핍 마우스에게 투여하는 단계이며, 여기서 인간 종양 세포가 상기 유전자 변형된 면역결핍 마우스에서 고형 또는 비-고형 종양을 형성하는 것인 단계; 시험 물질을 상기 면역결핍 마우스에게 투여하는 단계; 및 시험 물질에 대한 고형 또는 비-고형 종양의 반응을 검정하는 단계이며, 여기서 종양 및/또는 종양 세포에 대한 시험 물질의 억제 효과는 시험 물질을 항종양 활성을 갖는 것으로 확인시켜 주는 것인 단계를 포함한다.

[0015] 특별한 측면에 따르면, 상기 방법은 표준에 대한 반응을 비교하여 인간 종양 세포에 대한 시험 물질의 효과를 결정하는 것을 추가로 포함하며, 여기서 인간 종양 세포에 대한 시험 물질의 억제 효과는 시험 물질을 항종양 활성을 갖는 것으로 확인시켜 준다.

[0016] 특별한 측면에 따르면, 시험 물질은 면역요법제이거나 또는 이를 포함한다.

[0017] 특별한 측면에 따르면, 시험 물질은 면역 체크포인트 억제제이거나 또는 이를 포함한다.

[0018] 특별한 측면에 따르면, 면역 체크포인트 억제제는 PD-1 억제제, PD-L1 억제제, 또는 CTLA-4 억제제이거나 또는 이를 포함한다.

[0019] 특별한 측면에 따르면, 면역 체크포인트 억제제는 아테졸리주맙, 아벨루맙, 두르발루맙, 이필리무맙, 니볼루맙, 또는 펨브롤리주맙이거나 또는 이를 포함하거나, 또는 면역 체크포인트 억제제는 전술한 것 중 어느 하나의 항원 결합 단편을 포함한다.

[0020] 특별한 측면에 따르면, 시험 물질은 항체이거나 또는 이를 포함한다.

[0021] 특별한 측면에 따르면, 시험 물질은 항암제이거나 또는 이를 포함한다.

[0022] 본 발명의 측면에 따라 제공되는, hu-IL-15를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 그의 게놈 내에 포함하도록 유전자 변형된 면역결핍 마우스를 제공하는 단계이며, 여기서 상기 마우스가 hu-IL-15를 발현하는 것인 단계; 및 인간 조혈 줄기 세포, 인간 NK 세포주 세포, 인간 PBMC, 정제된 인간 NK 세포 또는 그의 임의의 둘 이상의 임의의 조합을 상기 면역결핍 마우스에게 투여하는 단계를 포함하는, 유전자 변형된 면역결핍 인간화 마우스 모델을 제조하는 방법이 본 발명의 측면에 따라 제공된다.

[0023] hu-IL-15를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 그의 게놈 내에 포함하도록 유전자 변형된 면역결핍 마우스를 제공하는 단계이며, 여기서 상기 마우스가 hu-IL-15를 발현하고 기능적 내인성 마우스 NK 세포의 부재를 특징으로 하는 것인 단계를 포함하는, 유전자 변형된 면역결핍 인간화 마우스 모델을 제조하는 방법이 본 발명의 측면에 따라 제공되며; 상기 방법은 조혈 줄기 세포, 인간 NK 세포주 세포, 인간 PBMC, 정제된 인간 NK 세포 또는 그의 임의의 둘 이상의 임의의 조합을 상기 면역결핍 마우스에게 투여하는 단계를 포함한다. 특별한 측면에 따르면, 인간 인터류킨-15 (hu-IL-15)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 그의 게놈 내에 포함하도록 유전자 변형된 면역결핍 마우스는 IL-2RG 기능없음이며, 이에 따라 기능적 내인성 *IL-2RG* 유전자가 결여되고, 기능적 내인성 마우스 NK 세포의 부재를 특징으로 하며; 상기 방법은 조혈 줄기 세포, 인간 NK 세포주 세포, 인간 PBMC, 정제된 인간 NK 세포 또는 그의 임의의 둘 이상의 임의의 조합을 상기 면역결핍 마우스에게 투여하는 단계를 포함한다.

[0024] 본 발명의 측면에 따라 제공되는, hu-IL-15를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 그의 게놈 내에 포함하도록 유전자 변형된 NSG, NRG, 또는 NOG 마우스를 제공하는 단계이며, 여기서 상기 마우스가 hu-IL-15를 발현하는 것인 단계; 및 조혈 줄기 세포, 인간 NK 세포주 세포, 인간 PBMC, 정제된 인간 NK 세포 또는 그의 임의의 둘 이상의 임의의 조합을 상기 유전자 변형된 NSG, NRG, 또는 NOG 마우스에게 투여하는 단계를 포함하는, 유전자 변형된 면역결핍 인간화 마우스 모델을 제조하는 방법이 본 발명의 측면에 따라 제공된다. 측면에 따르면, 상기 면역결핍 마우스는 인간 조혈 줄기 세포를 투여하기 전에 마우스의 마우스 조혈 세포를 감소시키도록 컨디셔닝된다. 마우스의 마우스 조혈 세포를 감소시키도록 면역결핍 마우스를 컨디셔닝하는 것은 유전자 변형된 면역결핍 마우스에게 방사선조사하는 것 및/또는 방사선모방 약물을 상기 유전자 변형된 면역결핍 마우스에게 투여하는 것을 포함할 수 있다. 측면에 따르면, 마우스의 마우스 조혈 세포를 감소시키도록 컨디셔닝하는 것은 인간 조혈 줄기 세포를 투여하기 전에 수행되지 않는다. 측면에 따르면, 유전자 변형된 면역결핍 인간화 마우스 모델을 제조하는 방법은 인간 종양 세포를 포함하는 인간 이종이식편을 상기 면역결핍 마우스에게 투여하는 단계를 추가로 포함한다.

[0025] hu-IL-15를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 그의 게놈 내에 포함하도록 유전자 변형된 NSG, NRG, 또는 NOG 마우스를 제공하는 단계이며, 여기서 상기 유전자 변형된 NSG, NRG, 또는 NOG 마우스가 hu-IL-15를 발현하고 기능적

내인성 마우스 NK 세포의 부재를 특징으로 하는 것인 단계를 포함하는, 유전자 변형된 면역결핍 인간화 마우스 모델을 제조하는 방법이 본 발명의 측면에 따라 제공되며; 상기 방법은 인간 조혈 줄기 세포를 상기 유전자 변형된 NSG, NRG, 또는 NOG 마우스에게 투여하는 단계를 포함한다. 특별한 측면에 따르면, 인간 인터류킨-15(hu-IL-15)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 그의 게놈 내에 포함하도록 유전자 변형된 NSG, NRG, 또는 NOG 마우스는 IL-2RG 기능없음이며, 이에 따라 기능적 내인성 *IL-2RG* 유전자가 결여되고, 기능적 내인성 마우스 NK 세포의 부재를 특징으로 하며; 상기 방법은 조혈 줄기 세포, 인간 NK 세포주 세포, 인간 PBMC, 정제된 인간 NK 세포 또는 그의 임의의 둘 이상의 임의의 조합을 상기 면역결핍 마우스에게 투여하는 단계를 포함한다. 측면에 따르면, 상기 면역결핍 마우스는 조혈 줄기 세포, 인간 NK 세포주 세포, 인간 PBMC, 정제된 인간 NK 세포 또는 그의 임의의 둘 이상의 임의의 조합을 면역결핍 마우스에게 투여하기 전에 마우스의 마우스 조혈 세포를 감소시키도록 컨디셔닝된다. 마우스의 마우스 조혈 세포를 감소시키도록 상기 면역결핍 마우스를 컨디셔닝하는 것은 유전자 변형된 면역결핍 마우스에게 방사선조사하는 것 및/또는 방사선모방 약물을 상기 유전자 변형된 면역결핍 마우스에게 투여하는 것을 포함할 수 있다. 측면에 따르면, 마우스의 마우스 조혈 세포를 감소시키도록 컨디셔닝하는 것은 조혈 줄기 세포, 인간 NK 세포주 세포, 인간 PBMC, 정제된 인간 NK 세포 또는 그의 임의의 둘 이상의 임의의 조합을 면역결핍 마우스에게 투여하기 전에 수행되지 않는다. 측면에 따르면, 유전자 변형된 면역결핍 인간화 마우스 모델을 제조하는 방법은 인간 종양 세포를 포함하는 인간 이종이식편을 상기 면역결핍 마우스에게 투여하는 단계를 추가로 포함한다.

도면의 간단한 설명

[0026] 통계적 유의미성에 대해 분석된 본원의 모든 도면에서, *는 P<0.05를 나타내고, **는 P<0.01을 나타내며, ***는 P<0.001을 나타내고, ****는 P<0.0001을 나타낸다.

도 1은 NSG-Tg (Hu-IL15) 반접합체로부터의 혈청에서 인간 IL15 수준을 보여주는 그래프이다.

도 2는 NSG-Tg (Hu-IL15) 동형 접합체로부터의 혈청에서 인간 IL15 수준을 보여주는 그래프이다.

도 3은 HSC-생착된 NSG-Tg (Hu-IL15) 마우스가 HSC-생착된 NSG 마우스와 비교해서 유사한 생존율을 갖는다는 것을 보여주는 그래프이다. 본 연구를 위해, NSG 또는 NSG-Tg (Hu-IL15) 마우스 (6 내지 8주생)에게 방사선 (200 cGy)을 조사하고, 제대혈로부터 유래된 100,000개의 CD34+ HSC를 정맥내로 (IV) 주사하였다. 마우스의 두 군에 대해 생존율을 모니터링하였다.

도 4는 HSC-생착된 NSG-Tg (Hu-IL15) 마우스가 혈액에서 CD45+ 세포의 가속화된 발달을 나타냈다는 것을 보여주는 그래프이다. 본 연구를 위해, NSG 또는 NSG-Tg (Hu-IL15) 마우스 (6 내지 8주생)에게 방사선 (200 cGy)을 조사하고, 제대혈로부터 유래된 100,000개의 CD34+ HSC를 IV 주사하였다. 말초 혈액에서 유동 세포계수법에 의해 인간 CD45+ 세포의 수준을 모니터링하였다.

도 5는 NSG 마우스와 비교해서 NSG-Tg (Hu-IL15) 마우스에서의 % hCD45 생착을 보여주는 그래프이다.

도 6은 HSC-생착된 NSG-Tg (Hu-IL15) 마우스가 혈액에서 인간 T 세포의 유사한 발달을 나타낸다는 것을 보여주는 그래프이다. 본 연구를 위해, NSG 또는 NSG-Tg (Hu-IL15) 마우스 (6 내지 8주생)에게 방사선 (200 cGy)을 조사하고, 제대혈로부터 유래된 100,000개의 CD34+ HSC를 IV 주사하였다. 말초 혈액에서 유동 세포계수법에 의해 인간 CD3+ T 세포의 수준을 모니터링하였다.

도 7은 혈구 하위 유형의 유동 세포계수법 분석 결과를 보여준다.

도 8은 HSC-생착된 NSG-Tg (Hu-IL15) 마우스가 혈액에서 증가된 인간 NK 세포 발달을 나타내는 것을 보여주는 그래프이다. 본 연구를 위해, NSG 또는 NSG-Tg (Hu-IL15) 마우스 (6 내지 8주생)에게 방사선 (200 cGy)을 조사하고, 제대혈로부터 유래된 100,000개의 CD34+ HSC를 IV 주사하였다. 말초 혈액에서 유동 세포계수법에 의해 인간 CD56+/CD16+ NK 세포의 수준을 모니터링하였다.

도 9는 생착된 NSG-Tg (Hu-IL15) 마우스가 혈액에서 인간 B 세포의 더 낮은 비율을 나타내는 것을 보여주는 그래프이다. 본 연구를 위해, NSG 또는 NSG-Tg (Hu-IL15) 마우스 (6 내지 8주생)에게 방사선 (200 cGy)을 조사하고, 제대혈로부터 유래된 100,000개의 CD34+ HSC를 IV 주사하였다. 말초 혈액에서 유동 세포계수법에 의해 인간 CD20+ B 세포의 수준을 모니터링하였다.

도 10은 HSC-생착된 NSG-Tg (Hu-IL15) 마우스가 혈액에서 인간 골수성 세포의 유사한 발달을 나타내는 것을 보여주는 그래프이다. 본 연구를 위해, NSG 또는 NSG-Tg (Hu-IL15) 마우스 (6 내지 8주생)에게 방사선 (200

cGy)을 조사하고, 제대혈로부터 유래된 100,000개의 CD34+ HSC를 IV 주사하였다. 말초 혈액에서 유동 세포계수법에 의해 인간 CD33+ 골수성 세포의 수준을 모니터링하였다.

도 11은 HSC-생착된 NSG-Tg (Hu-IL15) 마우스가 혈액에서 일관된 수의 인간 NK 세포를 나타내는 것을 보여주는 그래프이다. 본 연구를 위해, NSG 또는 NSG-Tg (Hu-IL15) 마우스 (6 내지 8주생)에게 방사선 (200 cGy)을 조사하고, 제대혈로부터 유래된 100,000개의 CD34+ HSC를 IV 주사하였다. 말초 혈액에서 유동 세포계수법에 의해 인간 CD56+/CD16+ NK 세포의 총 세포 수준을 모니터링하였다.

도 12a는 HSC-생착된 NSG-Tg (Hu-IL15) 마우스로부터의 인간 NK 세포가 더 높은 수준의 그랜자임 B를 발현한다는 것을 보여주는 그래프이다. 본 연구를 위해, NSG 또는 NSG-Tg (Hu-IL15) 마우스 (6 내지 8주생)에게 방사선 (200 cGy)을 조사하고, 제대혈로부터 유래된 100,000개의 CD34+ HSC를 IV 주사하였다. 주사 후 16주에, 인간 CD56+/CD16+ NK 세포를 유동 세포계수법에 의해 혈액 및 비장에서의 그랜자임 B의 발현에 관하여 평가하였다.

도 12b는 HSC-생착된 NSG-Tg (Hu-IL15) 마우스로부터의 인간 NK 세포가 더 높은 수준의 그랜자임 B를 발현한다는 것을 보여주는 그래프이다. 본 연구를 위해, NSG 또는 NSG-Tg (Hu-IL15) 마우스 (6 내지 8주생)에게 방사선 (200 cGy)을 조사하고, 제대혈로부터 유래된 100,000개의 CD34+ HSC를 IV 주사하였다. 주사 후 16주에, 인간 CD56+/CD16+ NK 세포를 유동 세포계수법에 의해 혈액 및 비장에서의 그랜자임 B의 발현에 관하여 평가하였다.

도 13a는 NSG 마우스와 비교해서 NSG-Tg (IL15) 마우스의 혈액 및 비장에서의 퍼포린-양성 (퍼포린+) NK 세포의 %를 나타내는 그래프이다.

도 13b는 NSG 마우스와 비교하여 NSG-Tg (IL15) 마우스의 비장에서의 퍼포린의 발현 증가를 나타내는 그래프이다.

도 14는 NSG-Tg (IL15) 마우스 및 NSG 마우스의 세포를 사용한 유동 세포계수법의 결과를 도시한다.

도 15는 HSC-생착된 NSG-Tg (Hu-IL15) 마우스로부터의 인간 NK 세포가 NK 감수성 표적 (K562 세포)을 사멸한다는 것을 보여주는 그래프이다. 본 연구를 위해, 인간 NK 세포를 HSC-생착된 NSG-Tg (Hu-IL15) 마우스의 비장 또는 인간 PBMC로부터 강화시키고, 표준 Cr^{51} 방출 검정을 사용하여 K562 표적 세포를 용해시킬 수 있는 능력에 관하여 평가하였다. NK 세포 및 K562 세포를 20시간 동안 함께 인큐베이션하고 Cr^{51}의 방출을 정량화하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0027] 본원에 사용된 과학적 및 기술적 용어는 관련 기술 분야의 통상의 기술자에 의해 통상적으로 이해되는 의미를 갖는다. 이러한 용어는 하기를 예시적으로 포함한 다양한 표준 참고 문헌에서 문맥상 정의되고 사용된다 [J. Sambrook and D.W. Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press; 3rd Ed., 2001; F.M. Ausubel, Ed., Short Protocols in Molecular Biology, Current Protocols; 5th Ed., 2002; B. Alberts et al., Molecular Biology of the Cell, 4th Ed., Garland, 2002; D.L. Nelson and M.M. Cox, Lehninger Principles of Biochemistry, 4th Ed., W.H. Freeman & Company, 2004; 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. and Devita, V.T., Eds., Physicians' Cancer Chemotherapy Drug Manual, Jones & Bartlett Publishers, 2005; J.M. Kirkwood et al., 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. et al., Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, 8th Ed., Philadelphia, PA: Lippincott, Williams & Wilkins, 2004; and L. Brunton et al., Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, McGraw-Hill Professional, 12th Ed., 2011].

[0028] 단수 형태는 제한하려는 것이 아니며, 달리 명백히 언급되지 않는 한 또는 문맥상 달리 명확히 표시되지 않는 한, 복수의 지시 대상을 포함한다.

[0029] 용어 "포함하는"은 개방 군을 지칭하며, 예를 들어, 구성원 A, B 및 C를 포함하는 군은 부가의 구성원을 포함할

수도 있다. 용어 "이루어지는"은 폐쇄 군을 지칭하며, 예를 들어, 구성원 A, B 및 C로 이루어지는 군은 임의의 부가 구성원을 포함하지 않는다.

[0030] 본 발명의 마우스 모델은 인간 IL-15를 발현하도록 유전자 변형된 면역결핍 마우스이고, 본원에서 "면역결핍 hu-IL-15 마우스"로서 지칭된다. 본원에 기재된 면역결핍 hu-IL-15 마우스 모델은 NK 세포를 인간 IL-15와 함께 시험관내 배양해야 하고 재조합 IL-15의 생체내 주사를 반복해야 하는 요건을 없앰으로써 인간 NK 세포-매개된 면역 요법의 고 처리량 생체내 시험을 위한 플랫폼을 제공한다.

[0031] 면역결핍 Hu-IL-15 마우스

[0032] 본 발명의 측면은 마우스의 게놈이 인간 IL-15를 코딩하는 핵산을 포함하도록 (hu-IL-15 마우스) 유전자 변형된 **면역결핍 마우스**에 관한 것이며, 여기서 면역결핍 hu-IL-15 마우스는 인간 IL-15를 발현하고, 면역결핍 hu-IL-15 마우스는 인간 조혈 줄기 세포를 포함한다. 본 발명의 측면은 마우스의 게놈이 인간 IL-15를 코딩하는 핵산을 포함하도록 (hu-IL-15 마우스) 유전자 변형된 **면역결핍** hu-IL-15 마우스에 관한 것이며, 여기서 면역결핍 hu-IL-15 마우스는 인간 IL-15를 발현하고, 면역결핍 hu-IL-15 마우스는 분화된 인간 조혈 줄기 세포, 특히 인간 NK 세포를 포함한다.

[0033] 특별한 측면에서, 인간 IL-15를 코딩하는 뉴클레오티드 서열이 상기 마우스의 선택된 세포의 게놈 내로 통합된다. 예를 들어, 인간 IL-15를 코딩하는 뉴클레오티드 서열이 상기 마우스의 생식 계열 세포의 게놈 내로 통합됨으로써, 인간 IL-15를 코딩하는 뉴클레오티드 서열이 마우스의 자손에 유전될 수 있게 한다.

[0034] 인간 IL-15는 서열식별번호 (SEQ ID NO): 1로서 본원에 확인되며, 그의 기능적 변이체가 본 발명에 유용하다.

[0035] 인간 IL-15와 관련하여 본원에 사용된 바와 같은 용어 "기능적 변이체"는 인간 IL-15의 생물학적 활성을 보유하는 단백질을 지칭한다. 기능적 변이체는, 예를 들어, 인간 IL-15Rα와 특이적으로 결합할 수 있는 능력을 보유할 뿐만 아니라 인간 NK 세포의 활성화, 증식 및 발달을 조절하는 서열식별번호: 1의 인간 IL-15의 변이체를 포괄한다.

[0036] 본 발명의 특별한 측면은 그의 게놈이, 서열식별번호: 1의 아미노산 서열, 또는 서열식별번호: 1에 제시된 아미노산 서열과의 적어도 약 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.4%, 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 그의 기능적 변이체를 갖는 인간 IL-15를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 면역결핍 hu-IL-15 마우스에 관한 것이다.

[0037] 본 발명의 측면에 따르면, 면역결핍 hu-IL-15 마우스는 서열식별번호: 1의 아미노산 서열, 또는 서열식별번호: 1에 제시된 아미노산 서열과의 적어도 약 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.4%, 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 그의 기능적 변이체를 갖는 인간 IL-15를 코딩하는 mRNA를 발현한다.

[0038] 본 발명의 측면에 따르면, 면역결핍 hu-IL-15 마우스는 서열식별번호: 1의 아미노산 서열, 또는 서열식별번호: 1에 제시된 아미노산 서열과의 적어도 약 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.4%, 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 그의 기능적 변이체를 갖는 인간 단백질 IL-15를 발현한다.

[0039] 본 발명의 측면에 따른 면역결핍 hu-IL-15 마우스는 프로모터와 작동적으로 연결된 인간 IL-15를 코딩하는 핵산을 그의 게놈 내에 포함하고, 여기서 인간 IL-15는 서열식별번호: 1의 아미노산 서열, 또는 고도로 엄격한 혼성화 조건하에 서열식별번호: 2와 혼성화되는 핵산의 보체에 의해 코딩된 아미노산 서열을 포함한다. 관련 기술분야의 통상의 기술자는 유전 코드의 퇴화 성질로 인해, 대체 핵산 서열이 인간 IL-15 및 그의 기능적 변이체를 코딩한다는 것과, 이러한 대체 핵산이 본원에 기재된 조성물 및 방법에 사용될 수 있다는 것을 인지할 것이다.

[0040] 두 아미노산 서열 또는 두 뉴클레오티드 서열의 퍼센트 동일성을 결정하기 위해, 최적의 비교 목적을 위하여 이들 서열을 정렬시킨다 (예를 들어, 정렬 소프트웨어 프로그램의 디폴트 파라미터를 사용하여 제2 아미노산 또는 뉴클레오티드 서열과의 최적의 정렬을 위하여 제1 아미노산 또는 뉴클레오티드 서열 내에 갭을 도입할 수 있다). 이어서, 상응하는 아미노산 위치 또는 뉴클레오티드 위치에서 아미노산 또는 뉴클레오티드를 비교한다. 제1 서열 내의 특정 위치가 제2 서열 내의 상응하는 위치와 동일한 아미노산 또는 뉴클레오티드에 의해 점유되는 경우, 상기 서열들은 그 위치에서 동일하다. 두 서열 간의 퍼센트 동일성은 서열들에 의해 공유된 동일한 위치의 수의 함수이다 (즉, % 동일성 = 동일한 정렬 위치의 수 ÷ 정렬 위치의 총 수 · 100%). 일부 실시양태에서, 두 서열은 동일한 길이를 갖는다.

[0041] 두 서열 간의 퍼센트 동일성의 결정은 수학적 알고리즘을 사용하여 달성될 수 있다. 두 서열의 비교를 위해 활용된 수학적 알고리즘의 비-제한적 예는 문헌 [Karlin and Altschul, 1990, PNAS USA 87:2264-68]의 알고리즘,

예를 들어, 문헌 [Karlin and Altschul, 1993, PNAS USA 90:5873-77]에서 변형된 바와 같은 알고리즘이다. 이러한 알고리즘은 문헌 [Altschul et al., 1990, J. Mol. Biol. 215:403]의 NBLAST 및 XBLAST 프로그램에 혼입된다. BLAST 뉴클레오티드 검색은 본 발명의 뉴클레오티드 서열과 상동인 뉴클레오티드 서열을 수득하기 위해, 예를 들어, 스코어=100, 워드 길이=12에 대한 NBLAST 뉴클레오티드 프로그램 파라미터 세트를 이용하여 수행될 수 있다. BLAST 단백질 검색은 본 발명의 단백질 분자와 상동인 아미노산 서열을 수득하기 위해, 예를 들어, 스코어 50, 워드 길이=3에 대한 XBLAST 프로그램 파라미터 세트를 이용하여 수행될 수 있다. 비교 목적으로 갭이 있는 정렬을 수득하기 위해, 갭이 있는 BLAST를 문헌 [Altschul et al., 1997, Nucleic Acids Res. 25:3389-02]에 기재된 바와 같이 활용할 수 있다. 또 다른 한편으론, PSI BLAST를 사용하여, 분자 간의 먼 관계를 검출하는 반복된 검색을 수행할 수 있다 (상기 문헌 참조). BLAST, 갭이 있는 BLAST, 및 PSI Blast를 활용하는 경우, 각각의 프로그램 (예를 들어, XBLAST 및 NBLAST)의 디폴트 파라미터를 사용한다 (예를 들어, NCBI 웹사이트 참조). 서열을 비교하기 위해 활용된 수학적 알고리즘의 또 다른 바람직한 비-제한적 예는 문헌 [Myers and Miller, 1988, CABIOS 4:11-17]의 알고리즘이다. 이러한 알고리즘은 GCG 서열 정렬 소프트웨어 패키지의 일부인 ALIGN 프로그램 (버전 2.0)에 혼입되어 있다. 아미노산 서열을 비교하기 위해 ALIGN 프로그램을 활용하는 경우, PAM120 중량 잔기 표, 갭 길이 페널티 12, 및 갭 패널티 4가 사용된다. 클러스털(Clustal) 소프트웨어 프로그램 세트는 서열을 정렬하여 퍼센트 서열 동일성을 결정하는 부가의 방법을 제공한다.

[0042] 두 서열 간의 퍼센트 동일성은 갭을 허용하거나 허용하지 않는 상기 언급된 것과 유사한 기술을 사용하여 결정된다. 퍼센트 동일성을 계산하는 데 있어서, 전형적으로 정확한 매치 만을 계수한다.

[0043] 용어 "혼성화" 및 "혼성화한다"는 상보적 핵산의 쌍 형성 및 결합을 지칭한다. 혼성화는 관련 기술 분야에 널리 공지된 바와 같은, 핵산의 상보성 정도, 핵산의 융점 T_m, 및 혼성화 조건의 엄격도와 같은 요인에 따라서 두 핵산 간에 다양한 정도로 발생한다. 용어 "혼성화 조건의 엄격도"는 특별한 통상의 부가제, 예컨대 포름아미드 및 덴하르트(Denhardt) 용액과 관련한 혼성화 배지의 조성, 온도 및 이온 강도의 조건을 지칭한다. 명시된 핵산과 관련된 특별한 혼성화 조건의 결정은 일상적이며 관련 기술 분야에 널리 공지되어 있으며, 예를 들어, 문헌 [J. Sambrook and D.W. Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press; 3rd Ed., 2001; and F.M. Ausubel, Ed., Short Protocols in Molecular Biology, Current Protocols; 5th Ed., 2002]에 기재된 바와 같다. 고도로 엄격한 혼성화 조건은 실질적으로 상보적인 핵산의 혼성화만을 허용하는 것이다. 전형적으로, 약 85 내지 100% 상보성을 갖는 핵산은 고도로 상보적인 것으로 간주되며, 고도로 엄격한 조건하에 혼성화된다. 중간 수준의 엄격한 조건은 중간 수준의 상보성인 약 50 내지 84% 상보성을 갖는 핵산뿐만 아니라 고도의 상보성을 갖는 핵산이 혼성화되는 조건으로써 예시된다. 대조적으로, 낮은 엄격도 혼성화 조건은 낮은 정도의 상보성을 갖는 핵산이 혼성화되는 조건이다.

[0044] 용어 "특이적 혼성화" 및 "특이적으로 혼성화하는"은 표적 핵산에 대한 특별한 핵산의 혼성화를 지칭하며, 샘플 중의 표적 핵산 이외의 핵산과는 실질적으로 혼성화되지 않는다.

[0045] 혼성화의 엄격도 및 세척 조건은 통상의 기술자에게 널리 공지된 바와 같은, 프로브 및 표적의 Tm, 및 혼성화 및 세척 조건의 이온 강도를 포함한 여러 요인에 좌우된다. 혼성화, 및 원하는 혼성화 엄격도를 달성하기 위한 조건은, 예를 들어, 문헌 [Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001; and Ausubel, F. et al., (Eds.), Short Protocols in Molecular Biology, Wiley, 2002]에 기재되어 있다.

[0046] 돌연변이는 표준 분자 생물학 기술, 예컨대 부위 지정 돌연변이유발 및 PCR 매개된 돌연변이유발을 사용하여 도입될 수 있다. 관련 기술 분야의 통상의 기술자는 인간 IL-15의 기능적 특성을 변경시키지 않으면서 하나 이상의 아미노산 돌연변이가 도입될 수 있다는 것을 인식할 것이다. 인간 IL-15를 코딩하는 하나 이상의 뉴클레오티드 서열은, 예를 들어, 특별한 마우스에 대한 코돈 사용빈도를 최적화하기 위해 또는 예컨대, 제한 부위를 부가 또는 결실시키거나 또는 클로닝, 증폭 및/또는 서열 결정하는 데 있어서 문제가 있는 서열을 변형시키기 위해 편의상, 인간 IL-15를 코딩하는 유전자 및/또는 mRNA로부터 변경될 수 있다.

[0047] 보존적 아미노산 치환이 인간 IL-15 단백질 내에서 이루어져서 기능적 인간 IL-15 변이체를 생산할 수 있다. 보존적 아미노산 치환은 하나의 아미노산을 유사한 특징을 갖는 또 다른 아미노산으로 치환시키는 것으로 관련 기술 분야에서 인식된다. 예를 들어, 각각의 아미노산은 하기 특징 중 한 가지 이상을 갖는 것으로서 설명될 수 있다: 전기 양성, 전기 음성, 지방족, 방향족, 극성, 소수성 및 친수성. 보존적 치환은 명시된 구조적 또는 기능적 특징을 갖는 하나의 아미노산을, 동일한 특징을 갖는 또 다른 아미노산으로 치환하는 것이다. 산성 아미노산은 아스파르테이트, 글루타메이트를 포함하고; 염기성 아미노산은 히스티딘, 리신, 아르기닌을 포함하며;

지방족 아미노산은 이소류신, 류신, 및 발린을 포함하고; 방향족 아미노산은 페닐알라닌, 티로신, 및 트립토판을 포함하며; 극성 아미노산은 아스파르테이트, 글루타메이트, 히스티딘, 리신, 아스파라긴, 글루타민, 아르기닌, 세린, 트레오닌, 및 티로신을 포함하고; 소수성 아미노산은 알라닌, 시스테인, 페닐알라닌, 글리신, 이소류신, 류신, 메티오닌, 프롤린, 발린, 및 트립토판을 포함하며; 보존적 치환은 각각의 군 내에서의 아미노산들 간의 치환을 포함한다. 아미노산은 또한, 입체 효과 또는 상대적 크기의 관점에서 설명될 수 있으며, 예를 들어, 알라닌, 시스테인, 아스파르테이트, 글리신, 아스파라긴, 프롤린, 트레오닌, 세린, 및 발린이 모두 전형적으로, 작은 것으로 간주된다.

[0048] 용어 "핵산"은 단일 가닥, 이중 가닥, 올리고뉴클레오티드, 또는 폴리뉴클레오티드를 포함한 임의의 형태의 2개 이상의 뉴클레오티드를 갖는 RNA 또는 DNA 분자를 지칭한다. 용어 "뉴클레오티드 서열"은 핵산 내의 뉴클레오티드의 정리를 지칭한다.

[0049] 인간 IL-15를 코딩하는 핵산 및 그의 변이체는 널리 공지된 방법론을 사용하여 재조합적으로 또는 합성적으로 단리 또는 생성될 수 있다.

[0050] 그의 게놈이, 인간 IL-15 또는 그의 기능적 변이체를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함한 발현 카세트를 포함하는 면역결핍 hu-IL-15 마우스가 본 발명의 측면에 따라 제공되며, 여기서 상기 마우스는 상기와 같이 코딩된 인간 IL-15 또는 그의 기능적 변이체를 발현한다.

[0051] 용어 "발현 구축물" 및 "발현 카세트"는 원하는 코딩 서열 (예를 들어, 인간 IL-15를 코딩하는 뉴클레오티드 서열)을 함유하고, 작동적으로 연결된 코딩 서열의 발현에 필요하거나 또는 이의 발현에 바람직한 하나 이상의 조절 요소를 함유하는 이중 가닥 재조합 뉴클레오티드 서열을 지칭하기 위해 본원에 사용된다. 본원에 사용된 바와 같은 용어 "조절 요소"는 뉴클레오티드 서열의 발현의 일부 측면을 제어하는 뉴클레오티드 서열을 지칭한다. 예시적인 조절 요소는 예시적으로, 뉴클레오티드 서열의 복제, 전사, 및 전사 후 프로세싱에 기여하는, 인핸서, 내부 리보솜 진입 부위 (IRES), 인트론, 복제 기점, 폴리아데닐화 시그널 (pA), 프로모터, 전사 종결 서열, 및 상류 조절 도메인을 포함한다. 관련 기술 분야의 통상의 기술자는 단지 일상적인 실험을 이용하여 발현 구축물에 이들 및 다른 조절 요소를 선택하고 사용할 수 있다. 발현 구축물은 널리 공지된 방법론을 사용하여 재조합적으로 또는 합성적으로 생성될 수 있다.

[0052] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "작동적으로 연결된"은 뉴클레오티드 서열이 제2 뉴클레오티드 서열과 기능적 관계에 있다는 것을 지칭한다.

[0053] 상기 언급된 바와 같이, 발현 카세트 내에 포함된 조절 요소는 프로모터일 수 있다.

[0054] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "프로모터"는 전사될 코딩 뉴클레오티드 서열, 예컨대 원하는 아미노산을 코딩하는 뉴클레오티드 서열과 작동적으로 연결된 조절 뉴클레오티드 서열을 지칭한다. 프로모터는 일반적으로, 전사될 뉴클레오티드 서열의 상류에 위치하고, RNA 폴리머라제에 의한 특이적 결합을 위한 부위 및 다른 전사 인자를 제공한다. 따라서, 본 발명의 특별한 측면에서, 인간 IL-15를 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 프로모터와 작동적으로 연결된다. 본 발명의 특별한 측면에서, 프로모터는 구성적 프로모터 또는 유도성 프로모터이다. 본 발명의 특별한 측면에서, 프로모터는 유비퀴터스, 조직 특이적 또는 세포 유형 특이적 발현을 제공한다.

[0055] 발현 구축물에 포함될 수 있는 유비퀴터스 프로모터는 3-포스포글리세레이트 키나제 (PGK-1) 프로모터, 베타-액틴 프로모터, ROSA26 프로모터, 열 충격 단백질 70 (Hsp70) 프로모터, EF-1 알파 유전자 코딩 신장 인자 1 알파 (EF-1) 프로모터, 진핵 개시 인자 4A (eIF-4A1) 프로모터, 클로람페니콜 아세틸트랜스퍼라제 (CAT) 프로모터, 및 시토메갈로바이러스 (CMV) 프로모터를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0056] 프로모터는, 예를 들어, 구성적 프로모터일 수 있다. 본 발명의 특별한 측면에서, 면역결핍 hu-IL-15 마우스는 구성적 프로모터와 작동적으로 연결되는 인간 IL-15를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 그의 게놈 내에 포함한다. 특별한 측면에서, 프로모터는 숙주 마우스 (예를 들어, 면역결핍 마우스)에서의 유전자 발현을 구동시킬 수 있다. 예를 들어, 프로모터는 CAG 프로모터일 수 있다. CAG 프로모터는 시토메갈로바이러스 초기 인핸서 요소 ("C"), 치킨 베타-액틴 유전자의 제1 엑손 및 제1 인트론 ("A"), 및 토끼 베타-글로불린 유전자의 스플라이스 수용체 ("G")를 포함한다. CAG 프로모터는 널리 공지되어 있고, 마우스 세포에서 강력한 발현을 표시한다 (예를 들어, 문헌 [Jun-ichi et al., 1989, Gene, 79(2):269] 참조). CAG 프로모터는, 예를 들어, 엑손을 제거하도록 변형될 수 있다. 시토메갈로바이러스 (CMV) 즉발형 프로모터 및 원숭이 바이러스 40 (SV40) 초기 프로모터를 포함한 다른 프로모터가 마우스에서의 강력한 유전자 발현을 구동시키는 것으로 공지되어 있다 (그의 각각이 본 발명의 다양한 실시양태에 사용될 수 있다).

[0057] 문헌 [Abboud et al., 2003, J. Histochem & Cytochem., 51(7):941-49; Schorpp et al., 1996, Nucl. Acids Res., 24(9):1787-88; McBurney et al., 1994, Devel. Dynamics, 200:278-93; and Majumder et al., 1996, Blood, 87(8):3203-11]에 예시된 바와 같은 이들 및 다른 프로모터가 관련 기술 분야에 공지되어 있다.

[0058] 프로모터 외에도, 예컨대 시토메갈로바이러스 (CMV) 초기 인핸서 요소 및 SV40 인핸서 요소이지만, 이에 제한되지는 않는 하나 이상의 인핸서 서열이 포함될 수 있다.

[0059] 본 발명의 다양한 측면에서, 부가적으로 포함된 서열은 인트론 서열, 예컨대 베타 글로빈 인트론 또는 제네릭 인트론, 전사 종결 서열, 및 mRNA 폴리아데닐화 (pA) 서열 (예컨대, SV40-pA, 베타-글로빈-pA, 및 AAT-pA이지만, 이에 제한되지는 않는다)을 포함한다.

[0060] 본 발명의 다양한 측면에서, 발현 구축물은 박테리아 세포에서의 증폭을 위해 필요한 서열, 예컨대 선별 마커 (예를 들어, 카나마이신 또는 앰피실린 내성 유전자) 및 복제 기점을 포함한다.

[0061] 트랜스제닉 구축물에서 유전자를 설계하고 프로모터를 위치시키는 방법이 공지되어 있다 (예를 들어, 문헌 [Haruyama et al., 2009, Curr. Protoc. Cell Biol., 19.10] 참조).

[0062] 그의 게놈이, 인간 IL-15 또는 그의 기능적 변이체를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함한 발현 카세트를 포함하는 면역결핍 hu-IL-15 마우스가 본 발명의 측면에 따라 제공되며, 여기서 뉴클레오티드 서열은 프로모터 및 폴리아데닐화 시그널과 작동적으로 연결되고, 상기 마우스는 상기와 같이 코딩된 인간 IL-15 또는 그의 기능적 변이체를 발현한다.

[0063] 발현 구축물은 널리 공지된 방법을 사용하여 유전자 변형된 마우스를 생성하기 위해, 착상 전의 마우스 배아인 수정 마우스 난모세포 내로 도입되거나 또는 마우스 줄기 세포 (배아 줄기 세포 또는 유도 만능 줄기 세포) 내로 도입된다.

[0064] 발현 구축물을 마우스 착상 전의 배아 내로 도입하는 방법의 경우, 이러한 발현 구축물은 상기 배아 내로의 주사 전에 선형화될 수 있다.

[0065] 바람직하게, 발현 구축물은 수정 난모세포 내로 주사된다. 수정 난모세포는 교배 후 일 (교배 후 0.5일)에 과잉 배란된 암컷으로부터 수집하고, 이를 발현 구축물과 함께 주사한다. 이와 같이 주사된 난모세포는 밤새 배양하거나 또는 교배 후 0.5일 거짓 임신 암컷의 난관 내로 직접 옮긴다. 과잉 배란, 난모세포의 수거, 발현 구축물 주사 및 배아 전달을 위한 방법은 관련 기술 분야에 공지되어 있고, 예를 들어, 문헌 [Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual, 3rd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press; December 15, 2002, ISBN-10: 0879695919]에 기재되어 있다. 그 자손은 DNA 분석, 예컨대 PCR, 서던 블롯 또는 뉴클레오티드 시퀀싱에 의해 인간 IL-15 또는 그의 기능적 변이체를 코딩하는 외인성 뉴클레오티드 서열의 존재에 관하여 시험할 수 있다. 이러한 외인성 뉴클레오티드 서열을 보유하는 마우스는, 예컨대 ELISA 또는 웨스턴 블롯 분석에 의해 단백질 발현에 관하여 시험할 수 있다.

[0066] 또 다른 한편으론, 발현 구축물은 기술, 예컨대 전기 천공, 인산칼슘 침전 또는 리포펙션에 의해 도입된다. 이어서, 상기 세포는 DNA 분석, 예컨대 PCR, 서던 블롯 또는 뉴클레오티드 시퀀싱에 의해 트랜스진 통합에 관하여 스크리닝된다. 정확한 통합을 수반한 세포는, 예를 들어, ELISA 또는 웨스턴 블롯 분석을 사용하여 인간 IL-15 또는 그의 기능적 변이체에 대한 단백질 분석에 의해 기능적 발현에 관하여 시험될 수 있다.

[0067] 배아 줄기 세포는 특별한 세포주에 대하여 최적화된 배지에서 성장된다. 전형적으로, 배아 줄기 세포 배지는 둘벡코 변형 이글 배지 (DMEM) 중의 15% 소 태아 혈청 (FBS) 또는 합성 또는 반합성 등가물, 2 mM 글루타민, 1 mM 피루브산 나트륨, 0.1 mM 비필수 아미노산, 50 U/ml 페니실린 및 스트렙토마이신, 0.1 mM 2-메르캅토에탄올 및 1000 U/ml LIF (플러스; 일부 세포주의 경우, 분화의 화학적 억제제)를 함유한다. 상세한 설명이 관련 기술 분야에 공지되어 있다 (Tremml et al., 2008, Current Protocols in Stem Cell Biology, Chapter 1:Unit 1C.4). 배아 줄기 세포 분화의 억제제에 관한 고찰을 위해서는, 문헌 [Buehr et al., 2003, Genesis of embryonic stem cells, Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences 358:1397-1402]을 참조할 수 있다.

[0068] 상기 발현 구축물이 혼입된 것으로 선별된 세포는 착상 전 배아 내로 주사될 수 있다. 미세 주사의 경우, 배아 줄기 세포 또는 유도 만능 줄기 세포는 트립신과 EDTA의 혼합물을 사용한 다음, 배아 줄기 세포 배지에 재현탁시켜 단일 세포가 되게 한다. 단일 세포의 군은 미세하게 인출된 유리 바늘 (20-25 마이크로미터 내경)을 사용하여 선별하고, 미세 조작기가 장착된 도립 현미경을 사용하여 배아의 투명대를 통하여 배반포 강 (포배강) 내

로 도입된다. 줄기 세포는 또한, 초기 단계 배아 (예를 들어, 2-세포, 4-세포, 8-세포, 상실배 전 또는 상실배) 내로 주사될 수 있다. 주사는 투명대를 개방하기 위해 구멍을 뚫는 레이저 또는 피에조 펄스의 도움을 받을 수 있다. 배반포 또는 8-세포 단계 배아당 대략 9 내지 10개의 선별된 줄기 세포 (배아 줄기 세포 또는 유도 만능 줄기 세포), 4-세포 단계 배아당 6 내지 9개의 줄기 세포, 및 2-세포 단계 배아당 약 6개의 줄기 세포가 주사된다. 줄기 세포 도입 후, 배아는 거짓 임신 수용자 암컷 내로 옮기기 전에, 질소 중 5% O_2, 5% CO_2에서 37℃ 하에 여러 시간 동안 회수될 수 있거나 또는 밤새 배양된다. 줄기 세포 주사에 대한 추가의 대안에서는, 줄기 세포가 상실배 단계 배아와 함께 응집될 수 있다. 이들 방법 모두는 널리 확립되어 있고, 이를 사용하여 줄기 세포 키메라를 생산할 수 있다. 보다 상세한 설명에 관해서는, 예를 들어, 문헌 [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]을 참조할 수 있고; 또한, 문헌 [Nagy et al., 1990, Development 110:815-821; Kraus et al., 2010, Genesis 48:394-399]; 및 미국 특허 번호 7,576,259, 7,659,442, 및 7,294,754를 참조할 수 있다.

[0069] 거짓 임신 배아 수용자는 관련 기술 분야에 공지된 방법을 사용하여 제조된다. 간략하게 언급하면, 6 내지 8주생의 가임 암컷 마우스를, 정관 절제 수술을 받았거나 또는 피임 수컷과 교배시켜, 외과적으로 도입된 배아를 지원하는 데 도움이 되는 호르몬 상태를 유도시킨다. 교배 후 2.5일 (2.5 dpc)에, 배반포를 함유하는 15개 이하의 줄기 세포를 자궁-난관 접합부에 매우 가까운 자궁각 내로 도입한다. 초기 단계 배아 및 상실배에 대해서는, 이러한 배아를 시험관 내에서 배반포로 배양하거나, 또는 배아 단계에 따라서 0.5 dpc 또는 1.5 dpc 거짓 임신 암컷의 난관 내로 착상시킨다. 착상된 배아로부터의 키메라 새끼는 착상시 배아 연령에 따라 전달 후 16일 내지 20일에 태어난다. 키메라 수컷이 번식을 위해 선택된다. 자손은, 예를 들어, 피모색(coat color) 및/또는 유전적 분석, 예컨대 PCR, 서던 블롯 또는 뉴클레오티드 시퀀싱에 의해 배아 줄기 세포 게놈의 전달에 관하여 분석될 수 있다. (예를 들어, 인간 IL-15 또는 그의 기능적 변이체의) 단백질 발현은 단백질 분석 (웨스턴 블롯, ELISA) 또는 다른 기능적 검정에 의해 분석될 수 있다. hu-IL-15 또는 그의 기능적 변이체를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 발현하는 자손은 이종 교배시켜, 트랜스진에 대해 동형 접합성인 마우스를 창출시킬 수 있다. 트랜스제닉 마우스를 면역결핍 마우스와 교배시켜, hu-IL-15 또는 그의 기능적 변이체를 발현하는 유사유전자형 면역결핍 계통을 창출시킬 수 있다.

[0070] hu-IL-15 또는 그의 기능적 변이체를 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 또한, Hprt 또는 Rosa26 유전자 자리와 같은 신뢰성 있는 발현을 초래하는 것으로 공지되는 줄기 세포 게놈의 특이적 유전자 자리로 표적화될 수 있다. 표적화된 트랜스제닉을 위하여, 재조합 DNA 기술을 사용하여 표적화 구축물을 제조할 수 있다. 표적화 구축물은 임의로, 내인성 유전자 표적과 상동인 5' 및 3' 서열을 포함할 수 있다. 표적화 구축물은 임의로, 예를 들어, 선별성 마커, 예컨대 네오마이신 포스포트랜스퍼라제, 히그로마이신 또는 푸로마이신, 인간 IL-15를 코딩하는 핵산, 및 폴리아데닐화 시그널을 추가로 포함할 수 있다. 유전자를 코딩하는 뉴클레오티드 서열의 정확한 전사 및 번역을 보장하기 위해, 예를 들어, 이러한 서열은 내인성 유전자 자리와 동일 프레임 내에 있거나, 또는 스플라이스 수용체 부위 및 내부 리보솜 진입 부위 (IRES) 서열이 포함된다. 이러한 표적화 구축물은 줄기 세포 내로 형질감염될 수 있고, 줄기 세포는 PCR, 서던 블롯, 또는 뉴클레오티드 시퀀싱을 이용하여 상동 재조합 현상을 검출하기 위해 스크리닝될 수 있다. 정확한 상동 재조합 현상을 수반하는 세포는 단백질 분석, 예컨대 ELISA 또는 웨스턴 블롯 분석에 의해 트랜스진 발현에 관하여 추가로 분석될 수 있다. 원하는 경우, 선별성 마커는, 예를 들어, 줄기 세포를 Cre 재조합 효소로 처리함으로써 제거될 수 있다. Cre 재조합 효소 처리 후, 상기 세포는 상기 유전자를 코딩하는 뉴클레오티드 서열의 존재에 관하여 분석된다. 정확한 게놈 현상을 수반한 세포를 선별하고, 이를 상기 언급된 바와 같이 착상 전 배아 내로 주사할 수 있다. 키메라 수컷이 번식을 위해 선택된다. 자손은 피모색 및 유전적 분석, 예컨대 PCR, 서던 블롯, 또는 뉴클레오티드 시퀀싱에 의해 배아 줄기 세포 게놈의 전달에 관하여 분석될 수 있고, 이들은, 예컨대 단백질 분석 (웨스턴 블롯, ELISA) 또는 다른 기능적 검정에 의해 단백질 발현에 관하여 시험될 수 있다. 원하는 IL-15 또는 기능적 IL-15 변이체 단백질을 발현하는 자손은 이종 교배시켜, 트랜스진에 대해 동형 접합성인 마우스를 창출시킬 수 있다. 트랜스제닉 마우스를 면역결핍 마우스와 교배시켜, 트랜스진을 수반한 유사유전자형 면역결핍 계통을 창출시킬 수 있다.

[0071] 본 발명의 특별한 실시양태는 실질적으로 모든 자신의 세포에 인간 IL-15 또는 그의 기능적 변이체를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 트랜스제닉 마우스뿐만 아니라 자신의 세포 모두는 아니지만, 일부에 인간 IL-15 또는 그의 기능적 변이체를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 트랜스제닉 마우스를 제공한다. 본 발명의 특별한 측면에서, 인간 IL-15 또는 그의 기능적 변이체를 코딩하는 뉴클레오티드 서열의 하나 또는 다수의 카피 (예컨대 콘카타머)가 상기 트랜스제닉 마우스의 세포의 게놈 내로 통합될 수 있다.

[0072] 다양한 방법 중 임의의 것을 사용하여, 인간 IL-15 또는 그의 기능적 변이체를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 마우스 내로 도입하여 인간 IL-15 또는 그의 기능적 변이체를 발현하는 트랜스제닉 마우스를 생산할 수 있다. 이러한 기술은 관련 기술 분야에 널리 공지되어 있고, 전핵 미세 주사 및 배아 줄기 세포의 형질전환을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 사용될 수 있는 트랜스제닉 마우스를 생성하는 방법은 문헌 [Sundberg and Ichiki, (Eds.), Genetically Engineered Mice Handbook, CRC Press, 2006; Hofker and 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 et al., PNAS USA, 107 (34):15022-26]에 기재된 것을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0073] 상동성 기반 재조합 유전자 변형 전략, 예컨대 귀소 엔도뉴클레아제, 인테그라제, 메가뉴클레아제, 트랜스포손, 징크 핑거 뉴클레아제 (ZFN)를 사용하는 뉴클레아제 매개된 프로세스, 전사 활성화제-유사 (TAL), 클러스터된 규칙적으로 공간을 둔 짧은 팔린드롬성 반복 서열 (CRISPR)-Cas, 또는 드로소필라 재조합 관련 단백질 (DRAP) 접근법을 사용하여, 인간 IL-15 또는 그의 기능적 변이체를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 면역결핍 마우스의 게놈 내로 도입하여 "녹인"시킴으로써 면역결핍 마우스를 유전자 변형시킬 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Cerbini et al., PLoS One. 2015; 10(1): e0116032; Shen et al., PLoS ONE 8(10): e77696; and Wang et al., Protein & Cell, February 2016, Volume 7, Issue 2, pp 152-156]을 참조할 수 있다.

[0074] 면역 결핍

[0075] 용어 "면역결핍 마우스"는 하기 중 하나 이상을 특징으로 하는 마우스를 지칭한다: 기능적 면역 세포, 예컨대 T 세포 및 B 세포의 결여; DNA 복구 결함; 림프구 상의 항원 특이적 수용체를 코딩하는 유전자의 재배열에 있어서의 결함; 및 면역 기능적 분자, 예컨대 IgM, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 및 IgA의 결여. 면역결핍 마우스는 면역 기능에 관여하는 유전자, 예컨대 *Rag1* 및 *Rag2*에 있어서의 하나 이상의 결핍을 특징으로 할 수 있다 (Oettinger, M.A et al., Science, 248:1517-1523, 1990; and Schatz, D. G. et al., Cell, 59:1035-1048, 1989). 면역결핍 마우스는 이러한 마우스에서의 비정상적인 면역 기능을 초래하는 이들 또는 다른 결함 중 임의의 것을 가질 수 있다.

[0076] 특별한 측면에 따르면, 면역결핍 hu-IL-15 마우스는 이러한 마우스가 결함있는 내인성 인터류킨-2 수용체 γ 서브유닛 및/또는 감소된 양의 내인성 인터류킨-2 수용체 γ 서브유닛을 발현하도록 해주는 인터류킨-2 수용체 γ 서브유닛 (IL-2RG)을 코딩하는 그의 내인성 유전자에 있어서의 결함을 갖거나, 또는 상기 마우스는 내인성 인터류킨-2 수용체 γ 서브유닛을 전혀 발현하지 않을 수 있다. I12rg 결핍의 주요 결과는 기능적 내인성 마우스 NK 세포의 부재이다. 따라서, 본 발명의 특별한 측면에 따르면, 면역결핍 hu-IL-15 마우스는 I12rg 결핍을 가지므로, 상기 마우스는 기능적 내인성 마우스 NK 세포가 없다. 특별한 추가 측면에 따르면, 본 발명의 면역결핍 hu-IL-15 마우스는 IL-2RG 기능없음이며, 이에 따라 기능적 내인성 *IL-2RG* 유전자가 결여되고 기능적 내인성 마우스 NK 세포가 결여된다.

[0077] 추가 측면에서, 면역결핍 hu-IL-15 마우스는 이러한 마우스가 결함있는 내인성 DNA-의존성 단백질 키나제, 촉매 서브유닛 및/또는 감소된 양의 내인성 DNA-의존성 단백질 키나제, 촉매 서브유닛을 발현하도록 해주는 DNA-의존성 단백질 키나제, 촉매 서브유닛 (Prkdc)을 코딩하는 그의 내인성 유전자에 있어서의 결함을 갖거나, 또는 상기 마우스는 내인성 DNA-의존성 단백질 키나제, 촉매 서브유닛을 전혀 발현하지 않을 수 있다. 본 발명의 면역결핍 hu-IL-15 마우스는 임의로, Prkdc 기능없음일 수 있으므로, 기능적 내인성 Prkdc 유전자가 결여된다.

[0078] 유전자 및 이들이 코딩하는 단백질과 관련하여 본원에 사용된 바와 같은 "내인성"은 그들의 천연 유전자 자리에서 마우스의 게놈에 존재하는 유전자를 지칭한다.

[0079] 본 발명의 다양한 측면에서, 면역결핍 hu-IL-15 마우스는 기능적 내인성 *IL-2RG* 및 *Prkdc* 유전자가 결여되는, *IL-2RG* 기능없음 및/또는 *Prkdc* 기능없음이다. 본 발명의 면역결핍 hu-IL-15 마우스는 임의로, Prkdc 녹아웃 및/또는 IL-2rg 녹아웃을 포함할 수 있다. 본 발명의 다양한 측면에서, 면역결핍 hu-IL-15 마우스는 IL-2rg를 발현하지 않거나, Prkdc를 발현하지 않거나, 또는 IL-2rg와 Prkdc 중 하나를 발현하지 않는다.

[0080] 본 발명의 다양한 측면에서, 면역결핍 hu-IL-15 마우스는 중증 복합 면역 결핍증을 갖고 있다. 용어 "중증 복합 면역 결핍증" 또는 "SCID"는 T 세포의 부재 및 B 세포 기능의 결여를 특징으로 하는 병태를 지칭한다.

[0081] 통상적인 형태의 SCID는 *IL-2RG* 유전자에 있어서의 감마 쇄 유전자 돌연변이 및 림프구 표현형 T(-) B(+) NK(-)를 특징으로 하는 X 연관 SCID; 및 상염색체 열성 SCID를 포함한다. 상염색체 열성 SCID는 Jak3 유전자 돌연변이 및 림프구 표현형 T(-) B(+) NK(-), ADA 유전자 돌연변이 및 림프구 표현형 T(-) B(-) NK(-), IL-7R 알파-쇄 돌연변이 및 림프구 표현형 T(-) B(+) NK(+), CD3 델타 또는 엡실론 돌연변이 및 림프구 표현형 T(-) B(+) NK(+), RAG1/RAG2 돌연변이 및 림프구 표현형 T(-) B(-) NK(+), 아르테미스(Artemis) 유전자 돌연변이 및 림프구 표현형 T(-) B(-) NK(+), 및 CD45 유전자 돌연변이 및 림프구 표현형 T(-) B(+) NK(+)를 특징으로 할 수 있다.

[0082] 본 발명의 측면에 따르면, 면역결핍 hu-IL-15 마우스는 *scid* 돌연변이로서 통상적으로 지칭되는, 중증 복합 면역 결핍증 돌연변이 (*Prkdc*^{scid})를 갖는다. *scid* 돌연변이는 널리 공지되어 있고, 문헌 [Bosma et al., 1989, Immunogenetics 29:54-56]에 기재된 바와 같이 마우스 염색체 16 상에 위치한다. *scid* 돌연변이에 대해 동형접합성인 마우스는 기능적 T 세포 및 B 세포의 부재, 림프구 감소증, 저글로불린혈증 및 정상 조혈 미세 환경을 특징으로 한다. *scid* 돌연변이는, 예를 들어, 널리 공지된 방법, 예컨대 PCR 또는 유동 세포계수법을 사용하여 *scid* 돌연변이에 대한 마커를 검출함으로써 검출될 수 있다.

[0083] 본 발명의 측면에 따른 면역결핍 hu-IL-15 마우스는 IL2 수용체 감마 쇄 결핍증을 갖는다. 용어 "IL2 수용체 감마 쇄 결핍증"은 감소된 IL2 수용체 감마 쇄를 지칭한다. 감소된 IL2 수용체 감마 쇄는 유전자 결실 또는 돌연변이에 기인할 수 있다. 감소된 IL2 수용체 감마 쇄는, 예를 들어, 널리 공지된 방법을 사용하여 IL2 수용체 감마 쇄 유전자 결실 또는 돌연변이를 검출하고/하거나 감소된 IL2 수용체 감마 쇄 발현을 검출함으로써 검출될 수 있다.

[0084] 본 발명의 측면에 따른 면역결핍 hu-IL-15 마우스는 중증 복합 면역 결핍증을 갖거나, 또는 중증 복합 면역 결핍증과 조합하여 IL2 수용체 감마 쇄 결핍증을 가지며, 여기서 상기 마우스의 게놈은 인간 IL-15 또는 그의 기능적 변이체를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0085] 본 발명의 측면에 따른 면역결핍 hu-IL-15 마우스는 *scid* 돌연변이를 갖거나, 또는 *scid* 돌연변이와 조합하여 IL2 수용체 감마 쇄 결핍증을 가지며, 여기서 상기 마우스의 게놈은 인간 IL-15 또는 그의 기능적 변이체를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0086] 본 발명의 다양한 측면에서, 면역결핍 hu-IL-15 마우스는 유전자 변형된 NSG 마우스, 유전자 변형된 NRG 마우스 또는 유전자 변형된 NOG 마우스이며, 여기서 유전자 변형된 NSG, NRG 또는 NOG 마우스의 게놈은 인간 IL-15 또는 그의 기능적 변이체를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0087] 용어 "NOD scid 감마", "NOD-*scid* IL2Rg^{기능없음}" 및 "NSG"는 문헌 [Shultz LD et al., 2005, J. Immunol, 174:6477-89]에 상세히 기재된, 널리 공지된 면역결핍 마우스 계통 NOD.Cg-*Prkdc*^{scid} *IL-2rg*^{tm1Wjl}/SzJ를 지칭하기 위해 본원에서 상호 교환적으로 사용된다. NSG 마우스는 NOD/ShiLtJ 배경으로부터의 다중 면역 결핍, 중증 복합 면역 결핍증 (*scid*) 돌연변이, 및 인터류킨-2 수용체 감마 쇄의 완전 녹아웃을 조합한다. 그 결과로서, NSG 마우스에는 성숙한 마우스 T, B, 및 NK 세포가 결여되고, 이들은 마우스 시토카인 시그널링 경로에 있어서 결핍성이다. NSG 마우스는 마우스 IL-2R-γ (감마 c) 발현의 결여, 검출 가능한 마우스 혈청 이뮤노글로불린의 부재, 마우스 용혈성 보체의 부재, 성숙한 마우스 T 림프구의 부재, 및 성숙한 마우스 자연 살해 세포의 부재를 특징으로 한다.

[0088] 인간 IL-15 또는 그의 기능적 변이체를 발현하는 NSG 마우스는 또 다른 한편으론, "NSG-hu-IL-15" 마우스 또는 "NSG-Tg (Hu-IL15)" 마우스로서 지칭되며, 이는 유전자 변형된 NSG 마우스의 게놈이 NOD.Cg-*Prkdc*^{scid} *IL-2rg*^{tm1Wjl}/SzJ 배경 상에 인간 IL-15 또는 그의 기능적 변이체를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하고 상기 마우스가 인간 IL-15 또는 그의 기능적 변이체를 발현한다는 것을 표시한다.

[0089] NRG 마우스는 문헌 [Shultz LD et al., 2008 Clin Exp Immunol 154(2):270-84]에 상세히 기재된, NOD.Cg-*Rag1*^{tm1Mom} *Il2rg*^{tm1Wjl}/SzJ로서 널리 공지되어 있다. 인간 IL-15 또는 그의 기능적 변이체를 발현하는 NRG 마우스는 "NRG-hu-IL-15" 마우스로서 지칭되며, 이는 유전자 변형된 NRG 마우스의 게놈이 NOD.Cg-*Rag1*^{tm1Mom} *Il2rg*^{tm1Wjl}/SzJ 배경 상에 인간 IL-15 또는 그의 기능적 변이체를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하고 상기 마우스가 인간 IL-15 또는 그의 기능적 변이체를 발현한다는 것을 표시한다. NRG 마우스는 마우스 자연 살해

(NK) 세포의 결여를 특징으로 한다.

[0090] NOG 마우스는 문헌 [Ito, M. et al., Blood 100, 3175-3182 (2002)]에 상세히 기재된, NOD.Cg-*Prkdc*^{scid} *Il2rg*^{tm1Sug}/JicTac로서 널리 공지되어 있다. 인간 IL-15 또는 그의 기능적 변이체를 발현하는 NOG 마우스는 "NOG-hu-IL-15" 마우스로서 지칭되며, 이는 유전자 변형된 NOG 마우스의 계놈이 NOD.Cg-*Prkdc*^{scid} *Il2rg*^{tm1Sug}/JicTac 배경 상에 인간 IL-15 또는 그의 기능적 변이체를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하고 상기 마우스가 인간 IL-15 또는 그의 기능적 변이체를 발현한다는 것을 표시한다. NOG 마우스는 마우스 자연 살해 (NK) 세포의 결여를 특징으로 한다.

[0091] 이종이식편

[0092] 이종 NK 세포, 이종 NK 세포를 포함한 세포 집단, 또는 이종 NK 세포의 정제된 집단으로 분화되는 이종 세포가 면역결핍 hu-IL-15 마우스에게 투여되어, 마우스에서 이종 세포의 분화에 의해 마우스에서 생산된 자연 살해 세포를 갖는 면역결핍 hu-IL-15 마우스를 생산한다. 마우스에서 NK 세포로 분화되는 이종 세포는 이종 조혈 줄기 세포를 포함한다. 이종 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)가 이종 NK 세포를 포함한 세포 집단이다.

[0093] 조혈 줄기 세포 이종이식편

[0094] 본 발명의 다양한 측면은 이종 조혈 줄기 세포 (HSC)를 면역결핍 hu-IL-15 마우스에게 투여하여, 생착된 HSC를 갖는 면역결핍 hu-IL-15 마우스를 생산하는 것에 관한 것이다.

[0095] 이종 HSC는 본 발명의 측면에 따른 인간 HSC이다.

[0096] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "이종 HSC"는 c-Kit 수용체를 발현하는 다분화능 줄기 세포를 지칭한다. c-Kit 수용체를 발현하는 다분화능 줄기 세포의 예는 혈구모세포로서 공지되기도 한 조혈 줄기 세포를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. c-Kit 수용체는, 예를 들어 문헌 [Vandenbark GR et al., 1992, Cloning and structural analysis of the human c-kit gene, Oncogene 7(7): 1259-66; and Edling CE, Hallberg B, 2007, c-Kit--a hematopoietic cell essential receptor tyrosine kinase, Int. J. Biochem. Cell Biol. 39(11):1995-8]에 기재된 바와 같이, 관련 기술 분야에 널리 공지되어 있다.

[0097] 이종 HSC의 단리, 숙주 마우스 내로의 이종 HSC의 투여, 및 그의 숙주 마우스 내에서의 생착을 평가하는 방법은 관련 기술 분야에 널리 공지되어 있다.

[0098] 면역결핍 hu-IL-15 마우스에게 투여하기 위한 조혈 줄기 세포는, 예컨대 제대혈, 골수, GM-CSF-동원된 말초 혈액 및 태아 간이나, 이에 제한되지는 않는, HSC를 함유하는 임의의 조직으로부터 수득될 수 있다.

[0099] 이종 HSC는, 예컨대 심장, 간 및/또는 안면 정맥 내로의 경로이나, 이에 제한되지는 않는 다양한 경로를 통한 투여에 의해 갓 태어난 마우스 내로 투여될 수 있다. 이종 HSC는, 예컨대 꼬리 정맥, 대퇴골 골수강 또는 비장 내로의 투여이나, 이에 제한되지는 않는 다양한 경로에 의해 다 자란 마우스 내로 투여될 수 있다. 추가 예에서, 이종 HSC를 함유하는 태아 간은 신 피막 아래에 생착될 수 있다.

[0100] 이종 HSC를 면역결핍 hu-IL-15 마우스에게 투여하는 것은 이종 HSC를 포함하는 조성물을 상기 면역결핍 hu-IL-15 마우스에게 투여하는 것을 포함할 수 있다. 이러한 조성물은, 예를 들어, 물, 등장성 조정제 (예를 들어, 염, 예컨대 염화나트륨), pH 완충제 (예를 들어, 시트레이트), 및/또는 당 (예를 들어, 글루코스)을 추가로 포함할 수 있다.

[0101] 이종 조혈 줄기 세포가 면역결핍 hu-IL-15 마우스 내에 생착된다는 것은 면역결핍 hu-IL-15 마우스 내에 분화된 이종 조혈 세포가 존재한다는 것을 특징으로 한다. 이종 HSC의 생착은, 예컨대 HSC의 투여 후 이종 HSC가 하나 이상의 시점에서 투여되는 동물 내에서의 세포의 유동 세포계수 분석이나, 이에 제한되지는 않는 다양한 방법 중 임의의 것에 의해 평가될 수 있다.

[0102] 이종 HSC의 단리를 위한 예시적인 방법, 숙주 마우스 내로의 이종 HSC의 투여, 및 그의 생착을 평가하는 방법은 본원 및 문헌 [T. Pearson et al., Curr. Protoc. Immunol. 81:15.21.1-15.21.21, 2008; Ito, M. et al., Blood 100: 3175-3182; Traggiai, E. et al., Science 304: 104-107; Ishikawa, F. et al., Blood 106: 1565-1573; Shultz, L. D. et al., J. Immunol. 174: 6477-6489; Holyoake TL et al., Exp Hematol., 1999, 27(9):1418-27]에 기재되어 있다.

[0103] 본 발명의 측면에 따르면, 면역결핍 hu-IL-15 마우스에게 투여된 이종 HSC는 원래의 공급원 물질로부터 단리되어, HSC가 강화된 세포 집단이 수득된다. 이와 같이 단리된 이종 HSC는 순수할 수 있거나 또는 순수하지 않을 수 있다. 측면에 따르면, 이종 HSC는 세포 마커, 예컨대 CD34에 대하여 선별함으로써 정제된다. 측면에 따르면, 투여된 이종 HSC는 CD34+ 세포가 총 세포의 약 1 내지 100%를 차지하는 세포 집단이지만, CD34+ 세포가 총 세포의 1% 미만을 차지하는 세포 집단이 사용될 수도 있다. 실시양태에 따르면, 투여된 이종 HSC는 CD34+ 세포가 총 세포의 약 1 내지 3%를 구성하는 T 세포 고갈된 제대혈 세포, CD34+ 세포가 총 세포의 약 50%를 구성하는 계통 고갈된 제대혈 세포, 또는 CD34+ 세포가 총 세포의 약 90%를 구성하는 CD34+ 양성적으로 선별된 세포이다.

[0104] 투여된 이종 HSC의 수는 면역결핍 hu-IL-15 마우스에서의 이종 조혈 및 면역 체계의 생성과 관련하여 제한되는 것으로 간주되지 않는다. 단일 이종 HSC가 숙주 면역결핍 hu-IL-15 마우스에서 조혈 및 면역 체계를 생성시킬 수 있다. 따라서, 투여된 이종 HSC의 수는 일반적으로, $1x10^3$ 내지 $1x10^6$ (1,000 내지 1,000,000)개의 범위의 CD34+ 세포 (여기서, 수용자는 마우스이다)이지만, 더 많거나 더 적은 수가 사용될 수 있다.

[0105] 따라서, 본 발명의 측면에 따른 방법은 약 10^3 (1000) 내지 약 10^6 (1,000,000), 약 10^3 내지 약 10^5, 약 10^4 내지 약 10^6, 약 10^5 내지 약 10^7, 약 1 x 10^3 내지 약 1 x 10^4, 약 5 x 10^3 내지 약 5 x 10^4, 약 1 x 10^4 내지 약 1 x 10^5, 약 5 x 10^4 내지 약 5 x 10^5, 약 1 x 10^5 내지 약 1 x 10^6, 약 5 x 10^5 내지 약 5 x 10^6, 약 1 x 10^6 내지 약 1 x 10^7, 약 2 x 10^4 내지 약 5 x 10^5, 또는 약 5 x 10^4 내지 약 2 x 10^5개의 이종 HSC, 예컨대 인간 조혈 줄기 세포를 면역결핍 hu-IL-15 마우스에게 투여하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 적어도 약 1 x 10^2, 약 2 x 10^2, 약 3 x 10^2, 약 4 x 10^2, 약 5 x 10^2, 약 6 x 10^2, 약 7 x 10^2, 약 8 x 10^2, 약 9 x 10^2, 약 1 x 10^3, 약 2 x 10^3, 약 3 x 10^3, 약 4 x 10^3, 약 5 x 10^3, 약 6 x 10^3, 약 7 x 10^3, 약 8 x 10^3, 약 9 x 10^3, 약 1 x 10^4, 약 2 x 10^4, 약 3 x 10^4, 약 4 x 10^4, 약 5 x 10^4, 약 6 x 10^4, 약 7 x 10^4, 약 8 x 10^4, 약 9 x 10^4, 약 1 x 10^5, 약 2 x 10^5, 약 3 x 10^5, 약 4 x 10^5, 약 5 x 10^5, 약 6 x 10^5, 약 7 x 10^5, 약 8 x 10^5, 약 9 x 10^5, 약 1 x 10^6, 약 2 x 10^6, 약 3 x 10^6, 약 4 x 10^6, 약 5 x 10^6, 약 6 x 10^6, 약 7 x 10^6, 약 8 x 10^6, 약 9 x 10^6, 또는 약 1 x 10^7개의 이종 HSC, 예컨대 인간 조혈 줄기 세포를 면역결핍 hu-IL-15 마우스에게 투여하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 약 1 x 10^2, 약 2 x 10^2, 약 3 x 10^2, 약 4 x 10^2, 약 5 x 10^2, 약 6 x 10^2, 약 7 x 10^2, 약 8 x 10^2, 약 9 x 10^2, 약 1 x 10^3, 약 2 x 10^3, 약 3 x 10^3, 약 4 x 10^3, 약 5 x 10^3, 약 6 x 10^3, 약 7 x 10^3, 약 8 x 10^3, 약 9 x 10^3, 약 1 x 10^4, 약 2 x 10^4, 약 3 x 10^4, 약 4 x 10^4, 약 5 x 10^4, 약 6 x 10^4, 약 7 x 10^4, 약 8 x 10^4, 약 9 x 10^4, 약 1 x 10^5, 약 2 x 10^5, 약 3 x 10^5, 약 4 x 10^5, 약 5 x 10^5, 약 6 x 10^5, 약 7 x 10^5, 약 8 x 10^5, 약 9 x 10^5, 약 1 x 10^6, 약 2 x 10^6, 약 3 x 10^6, 약 4 x 10^6, 약 5 x 10^6, 약 6 x 10^6, 약 7 x 10^6, 약 8 x 10^6, 약 9 x 10^6, 또는 약 1 x 10^7개의 이종 HSC, 예컨대 인간 HSC를 면역결핍 hu-IL-15 마우스에게 투여하는 것을 포함할 수 있다. 통상의 기술자는 단지 일상적인 실험을 사용하여 특이적 마우스에게 투여되어야 하는 이종 HSC의 수를 결정할 수 있을 것이다.

[0106] 수용자 면역결핍 hu-IL-15 마우스에서 이종 HSC로부터 분화된 세포 및/또는 이종 HSC가, 대다수의 임의의 투여된 비-HSC가 변성되는 시점에 검출되는 경우에, 생착은 성공적이다. 분화된 이종 HSC 세포의 검출은, 예를 들어, 수용자 면역결핍 hu-IL-15 마우스에서 이종 DNA의 검출 또는 무손상 이종 HSC 및 이종 HSC로부터 분화된 세포의 검출에 의해 달성될 수 있다. CD34+ 세포의 2차 수용자 내로의 직렬 전달 및 이종 조혈 시스템의 생착은 1차 수용자에서의 HSC 생착의 추가 시험이다. 생착은 이종 HSC의 투여 후 10 내지 12주에 수용자 면역결핍 hu-IL-15 마우스의 혈액, 비장 또는 골수에서 0.05% 이상의 이종 CD45+ 세포로서 유동 세포계수법에 의해 검출될 수 있다.

[0107] 본 발명의 측면에 따른 면역결핍 hu-IL-15 마우스에서의 이종 조혈 줄기 세포 (HSC)의 생착은, 예를 들어 수용자 동물에게, 일반적으로 감마선을 사용하여 고주파 전자기 방사선을 치사량 이하로 조사하거나, 또는 방사선모방 약물, 예컨대 부술판 또는 질소 머스터드로 처리함으로써, 이종 HSC의 투여 이전에 면역결핍 hu-IL-15 마우스를 "컨디셔닝"하는 것을 포함한다. 컨디셔닝은 숙주 조혈 세포의 수를 감소시키고/시키거나, 이종 HSC의 생착에 적절한 미세 환경 요인을 창출시키고/시키거나 이종 HSC의 생착을 위한 미세 환경 니치(niche)를 창출시키

는 것으로 여겨진다. 컨디셔닝을 위한 표준 방법은 관련 기술 분야에에 공지되어 있고, 예컨대 본원 및 문헌 [J. Hayakawa et al., 2009, Stem Cells, 27(1):175-182]에 기재되어 있다.

[0108] 이종 HSC의 투여 이전에 면역결핍 hu-IL-15 마우스를 "컨디셔닝"하지 않으면서, 이종 HSC를 면역결핍 hu-IL-15 마우스에게 투여하는 것을 포함하는 방법이 본 발명의 측면에 따라 제공된다. 이종 HSC의 투여 이전에 면역결핍 hu-IL-15 마우스를 방사선 또는 방사선모방 약물에 의해 "컨디셔닝"하지 않으면서, 이종 HSC를 면역결핍 hu-IL-15 마우스에게 투여하는 것을 포함하는 방법이 본 발명의 측면에 따라 제공된다.

[0109] 본 발명의 다양한 측면은 이종 조혈 줄기 세포 (HSC)를 면역결핍 hu-IL-15 마우스에게 투여하여, 생착된 HSC를 갖는 면역결핍 hu-IL-15 마우스를 생산하는 것에 관한 것이다. 생착된 이종 HSC는 이종 면역 체계 또는 그의 성분을 수반한 면역결핍 hu-IL-15 마우스를 생산하도록 분화된다.

[0110] 이종 HSC를 면역결핍 hu-IL-15 마우스에게 투여하면, 마우스에서 조혈 계통의 분화된 이종 세포가 생산된다. 예를 들어, 이종 HSC를 면역결핍 hu-IL-15 마우스에게 투여하면, 이러한 마우스에 의해 이종 골수성 계통 및 이종 림프계 계통 세포, 예컨대 이종 CD33+ 골수성 세포, 이종성 골수성 전구 세포, 이종 비만 세포, 이종 골수성 수지상 세포, 이종 B 세포, 이종 T 세포, 이종 T 헬퍼 세포, 이종 세포 독성 T 세포, 및/또는 이종 T_{reg} 세포가 생산된다. 본 발명의 측면에 따르면, 인간 HSC는 면역결핍 hu-IL-15 마우스에게 투여되어, 마우스가 하기 중 하나 이상을 포함하도록 분화된다: 인간 CD33+ 골수성 세포, 인간 골수성 전구 세포, 인간 비만 세포, 인간 골수성 수지상 세포, 인간 B 세포, 인간 T 세포, 인간 T 헬퍼 세포, 인간 세포 독성 T 세포, 및/또는 인간 T_{reg} 세포.

[0111] 이종 HSC를 면역결핍 hu-IL-15 마우스에게 투여하면, 유동 세포계수법으로써 특징지을 수 있는 조혈 계통의 분화된 이종 세포가 생산된다. 예를 들어, 인간 HSC를 면역결핍 hu-IL-15 마우스에게 투여하면, $CD45^+$, $CD20^+$, $CD20^+CD45^+$, $CD3^+$, $CD3^+CD45^+$, $CD33^+$, $CD33^+CD45^+$, $CD14^+$, $CD14^+CD45^+$, $CD56^+$, 및 $CD56^+CD45^+$ 인간 백혈구 중 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개, 또는 모두로부터 선택된 인간 백혈구를 포함한, 유동 세포계수법으로써 특징지을 수 있는 조혈 계통의 분화된 인간 세포가 생산된다.

[0112] 인간 HSC를 면역결핍 hu-IL-15 마우스에게 투여하면, 인간 NK 세포를 포함한 조혈 계통의 분화된 인간 세포가 생산된다.

[0113] 말초 혈액 단핵 세포 이종이식편

[0114] 본 발명의 다양한 측면은 이종 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)를 면역결핍 hu-IL-15 마우스에게 투여하여, 이종 NK 세포를 갖는 면역결핍 hu-IL-15 마우스를 생산하는 것에 관한 것이다.

[0115] 이종 PBMC는 본 발명의 측면에 따른 인간 PBMC이다.

[0116] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "이종 PBMC"는 자연적으로 NK 세포를 포함하는 말초 혈액으로부터 수득된 세포 집단을 지칭하며, 전형적으로 1 내지 10%의 범위이지만, 더 높거나 더 낮을 수 있다.

[0117] 이종 PBMC의 단리, 및 숙주 마우스 내로의 이종 PBMC의 투여는 관련 기술 분야에 널리 공지되어 있다.

[0118] 면역결핍 hu-IL-15 마우스에게 투여하기 위한 이종 PBMC는 말초 혈액으로부터 수득될 수 있다.

[0119] 이종 PBMC는, 예컨대 심장, 간 및/또는 안면 정맥 내로의 경로이나, 이에 제한되지는 않는 다양한 경로를 통한 투여에 의해 갓 태어난 마우스 내로 투여될 수 있다. 이종 PBMC는, 예컨대 꼬리 정맥, 대퇴골 골수강 또는 비장 내로의 투여이나, 이에 제한되지는 않는 다양한 경로에 의해 다 자란 마우스 내로 투여될 수 있다. 추가 예에서, 이종 PBMC를 함유하는 태아 간은 신 피막 아래에 생착될 수 있다.

[0120] 이종 PBMC를 면역결핍 hu-IL-15 마우스에게 투여하는 것은 이종 PBMC를 포함하는 조성물을 상기 면역결핍 hu-IL-15 마우스에게 투여하는 것을 포함할 수 있다. 이러한 조성물은, 예를 들어, 물, 등장성 조정제 (예를 들어, 염, 예컨대 염화나트륨), pH 완충제 (예를 들어, 시트레이트), 및/또는 당 (예를 들어, 글루코스)을 추가로 포함할 수 있다.

[0121] 이종 PBMC가 면역결핍 hu-IL-15 마우스 내에 생착된다는 것은 면역결핍 hu-IL-15 마우스 내에 이종 자연 살해 세포가 존재한다는 것을 특징으로 한다. 이종 자연 살해 세포의 존재는, 예컨대 PBMC의 투여 후 이종 PBMC가 하나 이상의 시점에서 투여되는 동물 내에서의 세포의 유동 세포계수 분석이나, 이에 제한되지는 않는 다양한

방법 중 임의의 것에 의해 평가될 수 있다.

[0122] 본 발명의 측면에 따르면, 면역결핍 hu-IL-15 마우스에게 투여된 이종 PBMC는 원래의 공급원 물질로부터 단리되어, PBMC 및/또는 NK 세포가 강화된 세포 집단이 수득된다. 이와 같이 단리된 이종 PBMC 및/또는 NK 세포는 순수할 수 있거나 또는 순수하지 않을 수 있다. 측면에 따르면, 이종 PBMC 및/또는 NK 세포는 세포 마커, 예컨대 CD16 또는 CD56에 대하여 선별함으로써 정제된다. 측면에 따르면, 투여된 이종 PBMC는 CD16+ 및/또는 CD56+ 세포가 총 세포의 약 1 내지 100%를 차지하는 세포 집단이지만, CD16+ 및/또는 CD56 세포가 총 세포의 1% 미만을 차지하는 세포 집단이 사용될 수도 있다. 실시양태에 따르면, 투여된 이종 PBMC는 CD16+ 및/또는 CD56+ 세포가 총 세포의 약 1 내지 3%를 구성하는 T 세포 고갈된 세포, 또는 CD16+ 및/또는 CD56+ 세포가 총 세포의 약 90%를 구성하는 양성적으로 선별된 세포이다.

[0123] 투여된 이종 PBMC의 수는 면역결핍 hu-IL-15 마우스에서의 NK 세포의 모델의 생성과 관련하여 제한되는 것으로 간주되지 않는다. 따라서, 투여된 이종 PBMC의 수는 일반적으로, $1x10^5$ 내지 $1x10^8$ (100,000 내지 100,000,000)개의 범위의 PBMC (여기서, 수용자는 마우스이다)이지만, 더 많거나 더 적은 수가 사용될 수 있다.

[0124] 따라서, 본 발명의 측면에 따른 방법은 약 $1x10^5$ 내지 $1x10^8$ (100,000 내지 100,000,000) PBMC, 10^5 (100,000) 내지 약 10^7 (10,000,000), 약 1 x 10^5 내지 약 1 x 10^6, 약 5 x 10^5 내지 약 5 x 10^6, 또는 약 1 x 10^6 내지 약 1 x 10^7개의 이종 PBMC, 예컨대 인간 PBMC를 면역결핍 hu-IL-15 마우스에게 투여하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 적어도 약 1 x 10^5, 약 2 x 10^5, 약 3 x 10^5, 약 4 x 10^5, 약 5 x 10^5, 약 6 x 10^5, 약 7 x 10^5, 약 8 x 10^5, 약 9 x 10^5, 약 1 x 10^6, 약 2 x 10^6, 약 3 x 10^6, 약 4 x 10^6, 약 5 x 10^6, 약 6 x 10^6, 약 7 x 10^6, 약 8 x 10^6, 약 9 x 10^6, 약 1 x 10^7, 약 2 x 10^7, 약 3 x 10^7, 약 4 x 10^7, 약 5 x 10^7, 약 6 x 10^7, 약 7 x 10^7, 약 8 x 10^7, 약 9 x 10^7, 또는 약 1 x 10^8개의 이종 PBMC, 예컨대 인간 PBMC를 면역결핍 hu-IL-15 마우스에게 투여하는 것을 포함할 수 있다. 통상의 기술자는 단지 일상적인 실험을 사용하여 특이적 마우스에게 투여되어야 하는 이종 PBMC의 수를 결정할 수 있을 것이다.

[0125] 수용자 면역결핍 hu-IL-15 마우스에서 이종 NK 세포가, 대다수의 임의의 투여된 비-PBMC가 변성되는 시점에 검출되는 경우에, 생착은 성공적이다. 생착은 이종 PBMC의 투여 후 10 내지 12주에 수용자 면역결핍 hu-IL-15 마우스의 혈액 또는 비장에서 0.05% 이상의 이종 CD16+ 및/또는 CD56+ 세포로서 유동 세포계수법에 의해 검출될 수 있다.

[0126] 본 발명의 측면에 따른 면역결핍 hu-IL-15 마우스에서의 이종 PBMC의 생착은, 예를 들어 수용자 동물에게, 일반적으로 감마선을 사용하여 고주파 전자기 방사선을 치사량 이하로 조사하거나, 또는 방사선모방 약물, 예컨대 부술판 또는 질소 머스터드로 처리함으로써, 이종 PBMC의 투여 이전에 면역결핍 hu-IL-15 마우스를 "컨디셔닝"하는 것을 포함한다. 컨디셔닝은 숙주 조혈 세포의 수를 감소시키고/시키거나, NK 세포의 유지 및/또는 생산에 적절한 미세 환경 요인을 창출시키고/시키거나 NK 세포의 유지 및/또는 생산을 위한 미세 환경 니치를 창출시키는 것으로 여겨진다. 컨디셔닝을 위한 표준 방법은 관련 기술 분야에에 공지되어 있고, 예컨대 본원 및 문헌 [J. Hayakawa et al., 2009, Stem Cells, 27(1):175-182]에 기재되어 있다.

[0127] 이종 PBMC의 투여 이전에 면역결핍 hu-IL-15 마우스를 "컨디셔닝"하지 않으면서, 이종 PBMC를 면역결핍 hu-IL-15 마우스에게 투여하는 것을 포함하는 방법이 본 발명의 측면에 따라 제공된다. 이종 PBMC의 투여 이전에 면역결핍 hu-IL-15 마우스를 방사선 또는 방사선모방 약물에 의해 "컨디셔닝"하지 않으면서, 이종 PBMC를 면역결핍 hu-IL-15 마우스에게 투여하는 것을 포함하는 방법이 본 발명의 측면에 따라 제공된다.

[0128] 본 발명의 다양한 측면은 이종 PBMC를 면역결핍 hu-IL-15 마우스에게 투여하여, 이종 NK 세포를 갖는 면역결핍 hu-IL-15 마우스를 생산하는 것에 관한 것이다.

[0129] 이종 PBMC를 면역결핍 hu-IL-15 마우스에게 투여하면, 마우스에서 이종 자연 살해 세포의 유지 및/또는 생산이 초래된다.

[0130] 이종 PBMC를 면역결핍 hu-IL-15 마우스에게 투여하면, 마우스에서 이종 PBMC의 유지 및/또는 생산이 초래되며, 이는 유동 세포계수법으로써 특징지을 수 있다. 예를 들어, 인간 PBMC를 면역결핍 hu-IL-15 마우스에게 투여하면, 인간 CD16+ 및/또는 CD56+ 인간 NK 세포를 포함한, 유동 세포계수법으로써 특징지을 수 있는 마우스에서 자연 살해 세포의 유지 및/또는 생산이 초래된다.

[0131] NK 세포 이종이식편

[0132] 본 발명의 다양한 측면은 정제된 이종 자연 살해 세포 (NK 세포)를 면역결핍 hu-IL-15 마우스에게 투여하여, 이종 NK 세포를 갖는 면역결핍 hu-IL-15 마우스를 생산하는 것에 관한 것이다.

[0133] 이종 NK 세포는 본 발명의 측면에 따른 인간 NK 세포이다.

[0134] 이종 NK 세포의 정제, 및 숙주 마우스 내로의 이종 NK 세포의 투여는 관련 기술 분야에 널리 공지되어 있다.

[0135] 면역결핍 hu-IL-15 마우스에게 투여하기 위한 이종 NK 세포는 말초 혈액으로부터 수득될 수 있다.

[0136] 이종 NK 세포는, 예컨대 심장, 간 및/또는 안면 정맥 내로의 경로이나, 이에 제한되지는 않는 다양한 경로를 통한 투여에 의해 갓 태어난 마우스 내로 투여될 수 있다. 이종 NK 세포는, 예컨대 꼬리 정맥, 대퇴골 골수강 또는 비장 내로의 투여이나, 이에 제한되지는 않는 다양한 경로에 의해 다 자란 마우스 내로 투여될 수 있다. 추가 예에서, 이종 NK 세포를 함유하는 태아 간은 신 피막 아래에 생착될 수 있다.

[0137] 이종 NK 세포를 면역결핍 hu-IL-15 마우스에게 투여하는 것은 이종 NK 세포를 포함하는 조성물을 상기 면역결핍 hu-IL-15 마우스에게 투여하는 것을 포함할 수 있다. 이러한 조성물은, 예를 들어, 물, 등장성 조정제 (예를 들어, 염, 예컨대 염화나트륨), pH 완충제 (예를 들어, 시트레이트), 및/또는 당 (예를 들어, 글루코스)을 추가로 포함할 수 있다.

[0138] 이종 NK 세포가 면역결핍 hu-IL-15 마우스 내에 생착된다는 것은 면역결핍 hu-IL-15 마우스 내에 이종 자연 살해 세포가 존재한다는 것을 특징으로 한다. 이종 자연 살해 세포의 존재는, 예컨대 NK 세포의 투여 후 이종 NK 세포가 하나 이상의 시점에서 투여되는 동물 내에서의 세포의 유동 세포계수 분석이나, 이에 제한되지는 않는 다양한 방법 중 임의의 것에 의해 평가될 수 있다.

[0139] 본 발명의 측면에 따르면, 면역결핍 hu-IL-15 마우스에게 투여된 정제된 이종 NK 세포는 원래의 공급원 물질로부터 단리되어, NK 세포가 강화된 세포 집단이 수득된다. 이와 같이 정제된 이종 NK 세포는 순수할 수 있거나 또는 순수하지 않을 수 있다. 측면에 따르면, 이종 NK 세포는 세포 마커, 예컨대 CD16 또는 CD56에 대한 선별에 의해, 및/또는 비-NK 세포의 고갈, 예컨대 CD3+ 세포의 제거에 의한 T 세포의 고갈에 의해 정제된다. 측면에 따르면, 투여된 정제된 이종 NK 세포는 CD16+ 및/또는 CD56+ 세포가 총 세포의 약 25 내지 100%를 차지하는 세포 집단이다. 실시양태에 따르면, 투여된 정제된 이종 NK 세포는 CD16+ 및/또는 CD56+ 세포가 총 세포의 약 25 내지 100%를 구성하는 T 세포 고갈된 세포, 또는 CD16+ 및/또는 CD56+ NK 세포가 총 세포의 약 90% 이상을 구성하는 양성적으로 선별된 세포이다.

[0140] 투여된 정제된 이종 NK 세포의 수는 일반적으로, $1x10^5$ 내지 $1x10^8$ (100,000 내지 100,000,000)개의 범위의 정제된 이종 NK 세포 (여기서, 수용자는 마우스이다)이지만, 더 많거나 더 적은 수가 사용될 수 있다.

[0141] 따라서, 본 발명의 측면에 따른 방법은 약 $1x10^5$ 내지 $1x10^8$ (100,000 내지 100,000,000)개의 정제된 이종 NK 세포, 10^5 (100,000) 내지 약 10^7 (10,000,000), 약 1×10^5 내지 약 1×10^6, 약 5×10^5 내지 약 5×10^6, 또는 약 1×10^6 내지 약 1×10^7개의 정제된 이종 NK 세포, 예컨대 정제된 인간 NK 세포를 면역결핍 hu-IL-15 마우스에게 투여하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 적어도 약 1×10^5, 약 2×10^5, 약 3×10^5, 약 4×10^5, 약 5×10^5, 약 6×10^5, 약 7×10^5, 약 8×10^5, 약 9×10^5, 약 1×10^6, 약 2×10^6, 약 3×10^6, 약 4×10^6, 약 5×10^6, 약 6×10^6, 약 7×10^6, 약 8×10^6, 약 9×10^6, 약 1×10^7, 약 2×10^7, 약 3×10^7, 약 4×10^7, 약 5×10^7, 약 6×10^7, 약 7×10^7, 약 8×10^7, 약 9×10^7, 또는 약 1×10^8개의 정제된 이종 NK 세포, 예컨대 정제된 인간 NK 세포를 면역결핍 hu-IL-15 마우스에게 투여하는 것을 포함할 수 있다. 통상의 기술자는 단지 일상적인 실험을 사용하여 특이적 마우스에게 투여되어야 하는 정제된 이종 NK 세포의 수를 결정할 수 있을 것이다.

[0142] 성공적인 생착은 이종 PBMC의 투여 후 10 내지 12주에 수용자 면역결핍 hu-IL-15 마우스의 혈액 또는 비장에서 0.05% 이상의 이종 CD16+ 및/또는 CD56+ 세포로서 유동 세포계수법에 의해 검출될 수 있다.

[0143] 본 발명의 측면에 따른 면역결핍 hu-IL-15 마우스에서의 정제된 이종 NK 세포의 생착은, 예를 들어 수용자 동물에게, 일반적으로 감마선을 사용하여 고주파 전자기 방사선을 치사량 이하로 조사하거나, 또는 방사선모방 약물, 예컨대 부술판 또는 질소 머스터드로 처리함으로써, 정제된 이종 NK 세포의 투여 이전에 면역결핍 hu-IL-

15 마우스를 "컨디셔닝"하는 것을 포함한다. 컨디셔닝은 숙주 조혈 세포의 수를 감소시키고/시키거나, NK 세포의 유지 및/또는 생산에 적절한 미세 환경 요인을 창출시키고/시키거나, NK 세포의 유지 및/또는 생산을 위한 미세 환경 니치를 창출시키는 것으로 여겨진다. 컨디셔닝을 위한 표준 방법은 관련 기술 분야에에 공지되어 있고, 예컨대 본원 및 문헌 [J. Hayakawa et al., 2009, Stem Cells, 27(1):175-182]에 기재되어 있다.

[0144] 정제된 이종 NK 세포의 투여 이전에 면역결핍 hu-IL-15 마우스를 "컨디셔닝"하지 않으면서, 정제된 이종 NK 세포를 면역결핍 hu-IL-15 마우스에게 투여하는 것을 포함하는 방법이 본 발명의 측면에 따라 제공된다. 정제된 이종 NK 세포의 투여 이전에 면역결핍 hu-IL-15 마우스를 방사선 또는 방사선모방 약물에 의해 "컨디셔닝"하지 않으면서, 정제된 이종 NK 세포를 면역결핍 hu-IL-15 마우스에게 투여하는 것을 포함하는 방법이 본 발명의 측면에 따라 제공된다.

[0145] 본 발명의 다양한 측면은 정제된 이종 NK 세포를 면역결핍 hu-IL-15 마우스에게 투여하여, 이종 NK 세포를 갖는 면역결핍 hu-IL-15 마우스를 생산하는 것에 관한 것이다. 본 발명의 다양한 측면은 정제된 인간 NK 세포를 면역결핍 hu-IL-15 마우스에게 투여하여, 인간 NK 세포를 갖는 면역결핍 hu-IL-15 마우스를 생산하는 것에 관한 것이다.

[0146] 정제된 이종 NK 세포를 면역결핍 hu-IL-15 마우스에게 투여하면, 마우스에서 이종 자연 살해 세포의 유지 및/또는 생산이 초래된다. 정제된 인간 NK 세포를 면역결핍 hu-IL-15 마우스에게 투여하면, 마우스에서 인간 자연 살해 세포의 유지 및/또는 생산이 초래된다.

[0147] 정제된 이종 NK 세포를 면역결핍 hu-IL-15 마우스에게 투여하면, 마우스에서 이종 NK 세포의 유지 및/또는 생산이 초래되며, 이는 유동 세포계수법으로써 특징지을 수 있다. 예를 들어, 인간 NK 세포를 면역결핍 hu-IL-15 마우스에게 투여하면, 인간 CD16+ 및/또는 CD56+ 인간 NK 세포를 포함한, 유동 세포계수법으로써 특징지을 수 있는 마우스에서 자연 살해 세포의 유지 및/또는 생산이 초래된다.

[0148] NK 세포주 이종이식편

[0149] 본 발명의 다양한 측면은 이종 불멸화 자연 살해 세포 (NK 세포주 세포)를 면역결핍 hu-IL-15 마우스에게 투여하여, 이종 NK 세포주 세포를 갖는 면역결핍 hu-IL-15 마우스를 생산하는 것에 관한 것이다. 용어 "불멸화 NK 세포주 세포"는 NK 세포가 헤이플릭 한계 (Hayflick limit)로서 공지된, 그의 증식 능력을 제한하는 세포성 제어를 벗어나게 한 하나 이상의 돌연변이로 인해 무기한으로 증식하는 NK 세포를 지칭한다.

[0150] 이종 NK 세포주 세포는 본 발명의 측면에 따른 인간 NK 세포주 세포이다.

[0151] NK 세포주 세포는 유전적으로 조작된 세포주의 세포일 수 있다. NK 세포주 세포는 키메라 항원 수용체 (CAR)를 포함할 수 있다. NK 세포주 세포는 NK-92를 포함하나 이에 제한되지는 않는 치료적 NK 세포주의 세포일 수 있다. NK 세포주 세포는 NK 세포주 NK-92, NK-YS, KHYG-1, NKL, NKG, SNK-6 또는 IMC-1의 세포를 포함하나 이에 제한되지는 않는 다양한 NK 세포주 세포 중 임의의 것일 수 있으며, 이들 모두는 상용 및/또는 공용 세포 저장소 공급원 (예컨대 ATCC®)으로부터 수득될 수 있다 (문헌 [Chen IM, et al., Leuk Res (2004) 28:275-84; Cheng M et al., Cell Transplant (2011) 20:1731-46; Gong JH, et al., Leukemia (1994) 8:652-8; Nagata H et al., Blood (2001) 97:708-13; Robertson MJ, et al., . Exp Hematol (1996) 24:406-15; Tsuchiyama J et al., Blood (1998) 92:1374-83; and Yagita M, et al., Leukemia (2000) 14:922-30] 참조).

[0152] 이종 NK 세포주 세포는, 예컨대 심장, 간 및/또는 안면 정맥 내로의 경로이나, 이에 제한되지는 않는 다양한 경로를 통한 투여에 의해 갓 태어난 마우스 내로 투여될 수 있다. 이종 NK 세포주 세포는, 예컨대 꼬리 정맥, 대퇴골 골수강 또는 비장 내로의 투여이나, 이에 제한되지는 않는 다양한 경로에 의해 다 자란 마우스 내로 투여될 수 있다. 추가 예에서, 이종 NK 세포주 세포를 함유하는 태아 간은 신 피막 아래에 생착될 수 있다.

[0153] 이종 NK 세포주 세포를 면역결핍 hu-IL-15 마우스에게 투여하는 것은 이종 NK 세포주 세포를 포함하는 조성물을 상기 면역결핍 hu-IL-15 마우스에게 투여하는 것을 포함할 수 있다. 이러한 조성물은, 예를 들어, 물, 등장성 조정제 (예를 들어, 염, 예컨대 염화나트륨), pH 완충제 (예를 들어, 시트레이트), 및/또는 당 (예를 들어, 글루코스)을 추가로 포함할 수 있다.

[0154] 이종 NK 세포주 세포의 존재는, 예컨대 NK 세포주 세포의 투여 후 이종 NK 세포주 세포가 하나 이상의 시점에서 투여되는 동물 내에서의 세포의 유동 세포계수 분석이나, 이에 제한되지는 않는 다양한 방법 중 임의의 것에 의해 평가될 수 있다.

[0155] 이종 NK 세포주 세포는 순수할 수 있거나 또는 순수하지 않을 수 있다. 실시양태에 따르면, 투여된 NK 세포주

세포는 투여된 총 세포의 약 90% 이상, 95% 이상, 99% 이상, 또는 100%를 구성한다.

[0156] 투여된 이종 NK 세포주 세포의 수는 제한되는 것으로 간주되지 않는다. 단일 이종 NK 세포주 세포가 기능의 검출을 위해 충분한 NK 세포주 세포를 증식하고 생성할 수 있다. 따라서, 투여된 이종 NK 세포주 세포의 수는 일반적으로, $1x10^3$ 내지 $1x10^6$ (1,000 내지 1,000,000)개의 범위의 이종 NK 세포주 세포 (여기서, 수용자는 마우스이다)이지만, 더 많거나 더 적은 수가 사용될 수 있다.

[0157] 따라서, 본 발명의 측면에 따른 방법은 약 10^3 (1000) 내지 약 10^6 (1,000,000), 약 10^3 내지 약 10^5, 약 10^4 내지 약 10^6, 약 10^5 내지 약 10^7, 약 1×10^3 내지 약 1×10^4, 약 5×10^3 내지 약 5×10^4, 약 1×10^4 내지 약 1×10^5, 약 5×10^4 내지 약 5×10^5, 약 1×10^5 내지 약 1×10^6, 약 5×10^5 내지 약 5×10^6, 약 1×10^6 내지 약 1×10^7, 약 2×10^4 내지 약 5×10^5, 또는 약 5×10^4 내지 약 2×10^5개의 이종 NK 세포주 세포, 예컨대 인간 NK 세포주 세포를 면역결핍 hu-IL-15 마우스에게 투여하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 적어도 약 1×10^2, 약 2×10^2, 약 3×10^2, 약 4×10^2, 약 5×10^2, 약 6×10^2, 약 7×10^2, 약 8×10^2, 약 9×10^2, 약 1×10^3, 약 2×10^3, 약 3×10^3, 약 4×10^3, 약 5×10^3, 약 6×10^3, 약 7×10^3, 약 8×10^3, 약 9×10^3, 약 1×10^4, 약 2×10^4, 약 3×10^4, 약 4×10^4, 약 5×10^4, 약 6×10^4, 약 7×10^4, 약 8×10^4, 약 9×10^4, 약 1×10^5, 약 2×10^5, 약 3×10^5, 약 4×10^5, 약 5×10^5, 약 6×10^5, 약 7×10^5, 약 8×10^5, 약 9×10^5, 약 1×10^6, 약 2×10^6, 약 3×10^6, 약 4×10^6, 약 5×10^6, 약 6×10^6, 약 7×10^6, 약 8×10^6, 약 9×10^6, 또는 약 1×10^7개의 이종 NK 세포주 세포, 예컨대 인간 NK 세포주 세포를 면역결핍 hu-IL-15 마우스에게 투여하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 약 1×10^2, 약 2×10^2, 약 3×10^2, 약 4×10^2, 약 5×10^2, 약 6×10^2, 약 7×10^2, 약 8×10^2, 약 9×10^2, 약 1×10^3, 약 2×10^3, 약 3×10^3, 약 4×10^3, 약 5×10^3, 약 6×10^3, 약 7×10^3, 약 8×10^3, 약 9×10^3, 약 1×10^4, 약 2×10^4, 약 3×10^4, 약 4×10^4, 약 5×10^4, 약 6×10^4, 약 7×10^4, 약 8×10^4, 약 9×10^4, 약 1×10^5, 약 2×10^5, 약 3×10^5, 약 4×10^5, 약 5×10^5, 약 6×10^5, 약 7×10^5, 약 8×10^5, 약 9×10^5, 약 1×10^6, 약 2×10^6, 약 3×10^6, 약 4×10^6, 약 5×10^6, 약 6×10^6, 약 7×10^6, 약 8×10^6, 약 9×10^6, 또는 약 1×10^7개의 이종 NK 세포주 세포, 예컨대 인간 NK 세포주 세포를 면역결핍 hu-IL-15 마우스에게 투여하는 것을 포함할 수 있다. 통상의 기술자는 단지 일상적인 실험을 사용하여 특이적 마우스에게 투여되어야 하는 이종 HSC의 수를 결정할 수 있을 것이다.

[0158] 성공적인 생착은 이종 NK 세포주 세포의 투여 후 10 내지 12주에 수용자 면역결핍 hu-IL-15 마우스의 혈액 또는 비장에서 0.05% 이상의 이종 NK 세포주 세포로서 유동 세포계수법에 의해 검출될 수 있다.

[0159] 본 발명의 측면에 따른 면역결핍 hu-IL-15 마우스에서의 이종 NK 세포주 세포의 생착은, 예를 들어 수용자 동물에게, 일반적으로 감마선을 사용하여 고주파 전자기 방사선을 치사량 이하로 조사하거나, 또는 방사선모방 약물, 예컨대 부술판 또는 질소 머스터드로 처리함으로써, 이종 NK 세포주 세포의 투여 이전에 면역결핍 hu-IL-15 마우스를 "컨디셔닝"하는 것을 포함한다. 컨디셔닝은 숙주 조혈 세포의 수를 감소시키고/시키거나, 이종 NK 세포주 세포의 유지 및/또는 생산에 적절한 미세 환경 요인을 창출시키고/시키거나, 이종 NK 세포주 세포의 유지 및/또는 생산을 위한 미세 환경 니치를 창출시키는 것으로 여겨진다. 컨디셔닝을 위한 표준 방법은 관련 기술 분야에에 공지되어 있고, 예컨대 본원 및 문헌 [J. Hayakawa et al., 2009, Stem Cells, 27(1):175-182]에 기재되어 있다.

[0160] 이종 NK 세포주 세포의 투여 이전에 면역결핍 hu-IL-15 마우스를 "컨디셔닝"하지 않으면서, 이종 NK 세포주 세포를 면역결핍 hu-IL-15 마우스에게 투여하는 것을 포함하는 방법이 본 발명의 측면에 따라 제공된다. 이종 NK 세포주 세포의 투여 이전에 면역결핍 hu-IL-15 마우스를 방사선 또는 방사선모방 약물에 의해 "컨디셔닝"하지 않으면서, 이종 NK 세포주 세포를 면역결핍 hu-IL-15 마우스에게 투여하는 것을 포함하는 방법이 본 발명의 측면에 따라 제공된다.

[0161] 본 발명의 다양한 측면은 이종 NK 세포주 세포를 면역결핍 hu-IL-15 마우스에게 투여하여, 이종 NK 세포주 세포를 갖는 면역결핍 hu-IL-15 마우스를 생산하는 것에 관한 것이다. 본 발명의 다양한 측면은 인간 NK 세포주 세

포를 면역결핍 hu-IL-15 마우스에게 투여하여, 인간 NK 세포주 세포를 갖는 면역결핍 hu-IL-15 마우스를 생산하는 것에 관한 것이다.

[0162] 이종 NK 세포주 세포를 면역결핍 hu-IL-15 마우스에게 투여하면, 마우스에서 이종 NK 세포주 세포의 유지 및/또는 생산이 초래된다. 인간 NK 세포주 세포를 면역결핍 hu-IL-15 마우스에게 투여하면, 마우스에서 인간 NK 세포주 세포의 유지 및/또는 생산이 초래된다.

[0163] 이종 NK 세포주 세포를 면역결핍 hu-IL-15 마우스에게 투여하면, 마우스에서 이종 NK 세포주 세포의 유지 및/또는 생산이 초래되며, 이는 유동 세포계수법으로써 특징지을 수 있다. 예를 들어, 인간 NK 세포주 세포를 면역결핍 hu-IL-15 마우스에게 투여하면, 마우스에서 이종 NK 세포주 세포의 유지 및/또는 생산이 초래되며, 이는 유동 세포계수법으로써 특징지을 수 있다.

[0164] 종양 이종이식편

[0165] 본 발명의 다양한 측면은 이종 종양 세포를 면역결핍 hu-IL-15 마우스에게 투여하는 것에 관한 것이다.

[0166] 본 발명의 면역결핍 hu-IL-15 마우스에게 투여된 이종 종양 세포는 종양 세포주 세포 및 1차 종양 세포를 포함하나 이에 제한되지는 않는 다양한 종양 세포 중 임의의 것일 수 있다. 이종 종양 세포는 다양한 유기체, 바람직하게 인간, 비-인간 영장류, 래트, 기니아 피그, 토끼, 고양이, 개, 말, 소, 염소, 돼지 및 양을 포함한 포유동물 중 임의의 것으로부터 유래될 수 있다.

[0167] 본 발명의 구체적 측면에 따르면, 이종 종양 세포는 인간 종양 세포이다. 본 발명의 구체적 측면에 따르면, 인간 종양 세포는, 예컨대 혈액 샘플, 조직 샘플 또는 인간 종양의 생검에 의해 수득된 샘플이나, 이에 제한되지는 않는, 인간으로부터 수득된 샘플에 존재한다.

[0168] 인간으로부터 수득된 종양 세포는 본 발명의 면역결핍 hu-IL-15 마우스에게 직접적으로 투여될 수 있거나 또는 면역결핍 hu-IL-15 마우스에게 투여되기 전에 시험관 내에서 배양될 수 있다.

[0169] 본원에 사용된 바와 같은, 용어 "종양"은 신생물 전 과다 증식, 계내 암, 신 생물, 전이 및 고형 및 비-고형 종양을 포함하나 이에 제한되지 않는, 조절되지 않은 성장을 특징으로 하는 세포를 지칭한다. 종양의 예는 림프종, 백혈병, 편평 세포 암, 소세포 폐암, 비소세포 폐암, 폐의 선암종, 폐의 편평 암종, 복막암, 부신암, 항문암, 담관암, 방광암, 뇌암, 유방암, 삼중 음성 유방암, 중추 또는 말초 신경계 암, 자궁 경부암, 결장암, 결장직장암, 자궁내막암, 식도암, 담낭암, 위장암, 교모세포종, 두경부암, 신장암, 간암, 비인두암, 비강암, 인두암, 구강암, 골육종, 난소암, 췌장암, 부갑상선암, 뇌하수체암, 전립선암, 망막모세포종, 육종, 침샘암, 피부암, 소장암, 위암, 고환암, 흉선암, 갑상선암, 자궁암, 질암 및 외음부암을 포함하나 이에 제한되지는 않는 암으로 인한 것이다.

[0170] 종양 세포를 면역결핍 hu-IL-15 마우스에게 투여하는 것은 관련 기술 분야에 인식된 바와 같은 적합한 임의의 방법일 수 있다. 예를 들어, 투여는, 예컨대 주사 또는 체내 이식에 의해, 예컨대 피하 및/또는 복강내 체내 이식에 의해 기관, 체강 또는 혈관 내로 세포를 투여하는 것을 포함할 수 있다. 종양 세포는 종양 덩어리, 종양 세포 덩어리 또는 해리된 세포로서 투여될 수 있다.

[0171] 종양 세포는, 예컨대 피하 주사, 복강내 주사 또는 꼬리 정맥 내로의 주사이나, 이에 제한되지는 않는 다양한 경로에 의해 투여될 수 있다.

[0172] 이종 종양 세포의 생착은, 예컨대 종양 형성의 징후에 대한 마우스의 육안 검사이나, 이에 제한되지는 않는 다양한 방법 중 임의의 것에 의해 평가될 수 있다.

[0173] 살아있는 마우스에서의 측정, 살아있는 마우스로부터 절제된 종양의 측정, 또는 죽은 마우스로부터 절제되거나 또는 계내에서의 종양의 측정을 포함하나 이에 제한되지는 않는, 이종 종양의 성장을 측정하기 위한 다양한 방법 중 임의의 것이 사용될 수 있다. 측정 기기, 예컨대 캘리퍼, 하나 이상의 영상화 기술, 예컨대 초음파 촬영, 컴퓨터 단층 촬영, 양전자 방출 단층 촬영, 형광 영상화, 생물 발광 영상화, 자기 공명 영상화 및 이들 중 임의의 둘 이상의 조합을 사용한 측정, 또는 다른 종양 측정 방법을 사용하여 측정치를 수득할 수 있다. 이종 종양 세포를 보유하는 마우스로부터 수득된 샘플 중의 종양 세포의 수는, 특히 비-고형 종양에 대한 종양 성장을 측정하기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 혈액 샘플 중의 비-고형 종양 세포의 수는 마우스에서 비-고형 종양의 성장 측정치를 수득하기 위해 평가될 수 있다.

[0174] 투여되는 종양 세포의 수는 제한적인 것으로 간주되지 않는다. 단일 종양 세포는 본원에 기재된 유전자 변형된

면역결핍 동물에서 검출 가능한 종양으로 확장될 수 있다. 투여된 종양 세포의 수는 일반적으로, 1000 내지 1,000,000개의 종양 세포의 범위지만, 더 많거나 적은 수가 투여될 수 있다.

[0175] 따라서, 본 발명의 측면에 따른 방법은 약 10^2 (100) 내지 약 10^7 (10,000,000), 약 10^3 내지 약 10^5, 약 10^4 내지 약 10^6, 약 10^5 내지 약 10^7, 약 1 x 10^3 내지 약 1 x 10^4, 약 5 x 10^3 내지 약 5 x 10^4, 약 1 x 10^4 내지 약 1 x 10^5, 약 5 x 10^4 내지 약 5 x 10^5, 약 1 x 10^5 내지 약 1 x 10^6, 약 5 x 10^5 내지 약 5 x 10^6, 약 1 x 10^6 내지 약 1 x 10^7, 약 2 x 10^4 내지 약 5 x 10^5, 또는 약 5 x 10^4 내지 약 2 x 10^5개의 이종 종양 세포, 예컨대 인간 종양 세포를 면역결핍 hu-IL-15 마우스에게 투여하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 적어도 약 1 x 10^2, 약 2 x 10^2, 약 3 x 10^2, 약 4 x 10^2, 약 5 x 10^2, 약 6 x 10^2, 약 7 x 10^2, 약 8 x 10^2, 약 9 x 10^2, 약 1 x 10^3, 약 2 x 10^3, 약 3 x 10^3, 약 4 x 10^3, 약 5 x 10^3, 약 6 x 10^3, 약 7 x 10^3, 약 8 x 10^3, 약 9 x 10^3, 약 1 x 10^4, 약 2 x 10^4, 약 3 x 10^4, 약 4 x 10^4, 약 5 x 10^4, 약 6 x 10^4, 약 7 x 10^4, 약 8 x 10^4, 약 9 x 10^4, 약 1 x 10^5, 약 2 x 10^5, 약 3 x 10^5, 약 4 x 10^5, 약 5 x 10^5, 약 6 x 10^5, 약 7 x 10^5, 약 8 x 10^5, 약 9 x 10^5, 약 1 x 10^6, 약 2 x 10^6, 약 3 x 10^6, 약 4 x 10^6, 약 5 x 10^6, 약 6 x 10^6, 약 7 x 10^6, 약 8 x 10^6, 약 9 x 10^6, 또는 약 1 x 10^7개의 이종 종양 세포, 예컨대 인간 종양 세포를 면역결핍 hu-IL-15 마우스에게 투여하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 약 1 x 10^2, 약 2 x 10^2, 약 3 x 10^2, 약 4 x 10^2, 약 5 x 10^2, 약 6 x 10^2, 약 7 x 10^2, 약 8 x 10^2, 약 9 x 10^2, 약 1 x 10^3, 약 2 x 10^3, 약 3 x 10^3, 약 4 x 10^3, 약 5 x 10^3, 약 6 x 10^3, 약 7 x 10^3, 약 8 x 10^3, 약 9 x 10^3, 약 1 x 10^4, 약 2 x 10^4, 약 3 x 10^4, 약 4 x 10^4, 약 5 x 10^4, 약 6 x 10^4, 약 7 x 10^4, 약 8 x 10^4, 약 9 x 10^4, 약 1 x 10^5, 약 2 x 10^5, 약 3 x 10^5, 약 4 x 10^5, 약 5 x 10^5, 약 6 x 10^5, 약 7 x 10^5, 약 8 x 10^5, 약 9 x 10^5, 약 1 x 10^6, 약 2 x 10^6, 약 3 x 10^6, 약 4 x 10^6, 약 5 x 10^6, 약 6 x 10^6, 약 7 x 10^6, 약 8 x 10^6, 약 9 x 10^6, 또는 약 1 x 10^7개의 이종 종양 세포, 예컨대 인간 종양 세포를 면역결핍 hu-IL-15 마우스에게 투여하는 것을 포함할 수 있다. 통상의 기술자는 단지 일상적인 실험을 사용하여 특이적 마우스에게 투여되어야 하는 이종 종양 세포의 수를 결정할 수 있을 것이다.

[0176] 본 발명의 측면에 따르면, 이종 종양 세포, 및 이종 HSC 및/또는 이종 PBMC가 면역결핍 hu-IL-15 마우스에게 투여된다. 이종 종양 세포, 및 이종 HSC 및/또는 이종 PBMC는 동일한 시간에 또는 상이한 시간에 투여될 수 있다.

[0177] 본 발명의 측면에 따르면, 이종 종양 세포는 투여된 HSC 및/또는 이종 PBMC와 동일한 종으로부터 유래된다. 측면에 따르면, 면역결핍 hu-IL-15 마우스에게 투여된 종양 세포 및 HSC 및/또는 이종 PBMC는 인간 세포이다.

[0178] 본 발명의 측면에 따르면, 투여된 HSC 및/또는 이종 PBMC 및 종양 세포는 인간 백혈구 항원 (HLA) 매칭된다 (예를 들어, MHC 클래스 I 매칭되고/되거나 MHC 클래스 II 매칭된다). HLA-매칭은 HLA 세포 표면 단백질에 대항한 이식편 대 이식편 면역 반응의 가능성을 감소시킬 수 있다. HLA에 대항한 면역 반응은 이종 면역 세포가 이종 암 세포를 성공적으로 표적으로 한다는 것을 잘못 암시할 수 있다.

[0179] 투여된 HSC 및/또는 이종 PBMC, 및 투여된 종양 세포는 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20개의 매칭되는 HLA 대립 유전자를 포함할 수 있다. 투여된 HSC 및/또는 이종 PBMC, 및 종양 세포는 HLA-A, HLA-B, HLA-C, 및 HLA-DRB1에 대한 대립 유전자로부터 선택된 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8개의 매칭되는 HLA 대립 유전자를 포함할 수 있다. 유전 공학 없이는 완벽한 HLA 매칭이 거의 불가능하며, 완벽한 HLA 매칭은 불필요할 수 있다. 예를 들어, 대조군 실험은 임의의 HLA-매개된 이식편 대 이식편 면역 반응을 설명할 수 있다.

[0180] 검정 방법

[0181] 본 발명의 측면에 따라 제공된 방법 및 면역결핍 hu-IL-15 마우스는 인간 암에 대항하여 유도된 물질의 생체내 시험과 같은 다양한 유용성을 갖는다.

[0182] 본 발명의 측면에 따라 시험 물질의 항종양 활성을 확인하는 방법은 면역결핍 hu-IL-15 마우스를 제공하는 단계; 이종 종양 세포를 상기 면역결핍 hu-IL-15 마우스에게 투여하는 단계이며, 여기서 이종 종양 세포가 면역결핍 hu-IL-15 마우스에서 고형 또는 비-고형 종양을 형성하는 것인 단계; 시험 물질을 면역결핍 hu-IL-15 마우

스에게 투여하는 단계; 시험 물질에 대한 이종 종양 및/또는 종양 세포의 반응을 검정하는 단계이며, 여기서 종양 및/또는 종양 세포에 대한 시험 물질의 억제 효과는 시험 물질을 항종양 활성을 갖는 것으로 확인시켜 주는 것인 단계를 포함한다.

[0183] 본 발명의 측면에 따라 시험 물질의 항종양 활성을 확인하는 방법은 면역결핍 hu-IL-15 마우스를 제공하는 단계이며, 여기서 이러한 면역결핍 hu-IL-15 마우스가 생착된 이종 HSC를 갖는 것인 단계; 이종 종양 세포를 상기 면역결핍 hu-IL-15 마우스에게 투여하는 단계이며, 여기서 이종 종양 세포가 면역결핍 hu-IL-15 마우스에서 고형 또는 비-고형 종양을 형성하는 것인 단계; 시험 물질을 면역결핍 hu-IL-15 마우스에게 투여하는 단계; 시험 물질에 대한 이종 종양 및/또는 종양 세포의 반응을 검정하는 단계이며, 여기서 종양 및/또는 종양 세포에 대한 시험 물질의 억제 효과는 시험 물질을 항종양 활성을 갖는 것으로 확인시켜 주는 것인 단계를 포함한다.

[0184] 본 발명의 측면에 따라 시험 물질의 항종양 활성을 확인하는 방법은 면역결핍 hu-IL-15 마우스를 제공하는 단계이며, 여기서 이러한 면역결핍 hu-IL-15 마우스가 생착된 인간 HSC를 갖는 것인 단계; 인간 종양 세포를 상기 면역결핍 hu-IL-15 마우스에게 투여하는 단계이며, 여기서 인간 종양 세포가 면역결핍 hu-IL-15 마우스에서 고형 또는 비-고형 종양을 형성하는 것인 단계; 시험 물질을 면역결핍 hu-IL-15 마우스에게 투여하는 단계; 시험 물질에 대한 인간 종양 및/또는 종양 세포의 반응을 검정하는 단계이며, 여기서 종양 및/또는 종양 세포에 대한 시험 물질의 억제 효과는 시험 물질을 항종양 활성을 갖는 것으로 확인시켜 주는 것인 단계를 포함한다.

[0185] 본 발명의 측면에 따라 시험 물질의 항종양 활성을 확인하기 위한 검정에 사용되는 면역결핍 hu-IL-15 마우스는 NSG-hu-IL-15 마우스, NRG-hu-IL-15 마우스 또는 NOG-hu-IL-15 마우스이다.

[0186] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "억제 효과"는 종양 성장, 종양 세포 대사 및 종양 세포 분열 중 하나 이상을 억제하기 위한 시험 물질의 효과를 지칭한다.

[0187] 시험 물질에 대한 이종 종양 및/또는 종양 세포의 반응을 검정하는 것은 본 발명의 방법의 측면에 따라 표준에 대한 반응을 비교하여 이종 종양 세포에 대한 시험 물질의 효과를 결정하는 것을 포함하며, 여기서 이종 종양 세포에 대한 시험 물질의 억제 효과는 시험 물질을 항종양 조성물로서 확인시켜 준다. 표준은 관련 기술 분야에 널리 공지되어 있으며, 사용된 표준은 임의의 적절한 표준일 수 있다. 한 예에서, 표준은 항종양 효과를 갖는 것으로 공지된 화합물이다. 추가 예에서, 비교 가능한 이종 종양의 비-처리는 시험 물질의 효과의 비교를 위한 처리없이 종양 성장의 기본 수준 지표를 제공한다. 표준은 개별 비교 가능한 마우스에서 또는 비교 가능한 마우스 집단에서 이전에 결정되고 검정 결과와의 비교 및 회수를 위해 인쇄 또는 전자 매체에 저장되는 예상된 종양 성장의 참조 수준일 수 있다.

[0188] 검정 결과는 파라메트릭 또는 비-파라메트릭 시험, 분산 분석, 공분산 분석, 다변량 분석을 위한 로지스틱 회귀, 피셔의 직접 확률 시험, 카이 제곱 시험, 스튜던츠 T-시험, 만 휘트니(Mann-Whitney) 시험, 윌콕슨(Wilcoxon) 부호 순위 시험, 맥네마(McNemar) 시험, 프리드만(Friedman) 시험 및 페이지(Page)의 L 추세 시험으로써 예시된, 시험 물질이 종양에 대한 억제 효과를 갖는지의 여부를 결정하기 위한 다양한 방법 중 임의의 것에 의한 통계적 분석을 사용하여 분석될 수 있다. 이들 및 다른 통계적 시험은 문헌 [Hicks, CM, Research Methods for Clinical Therapists: Applied Project Design and Analysis, Churchill Livingstone (publisher); 5th Ed., 2009; and Freund, RJ et al., Statistical Methods, Academic Press; 3rd Ed., 2010]에 기재된 바와 같이 관련 기술 분야에 널리 공지되어 있다.

[0189] 본 발명의 방법에 사용된 시험 물질은, 합성 또는 자연적으로 발생하는 화합물 또는 합성 또는 자연적으로 발생하는 화합물의 조합, 작은 유기 또는 무기 분자, 단백질, 펩티드, 핵산, 탄수화물, 올리고사카라이드, 지질 또는 이들 중 임의의 것의 조합을 예시적으로 포함한, 임의의 화학적 실체일 수 있다. 본 발명의 측면에 따르면, 시험 물질은 면역요법제이다.

[0190] 본 발명의 측면에 따르면, 시험 물질은 항암제이다. 본 발명의 측면에 따르면, 시험 물질은 항암 면역요법제, 예컨대 항암 항체 또는 그의 항원 결합 단편이다.

[0191] 항암제는, 예를 들어, 문헌 [Brunton et al. (eds.), Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 12th Ed., Macmillan Publishing Co., 2011]에 기재되어 있다.

[0192] 항암제는 예시적으로, 아시비신, 아클라루비신, 아코다졸, 아크로닌, 아도젤레신, 알데스류킨, 알리트레티노인, 알로푸리놀, 알트레타민, 암보마이신, 아메탄트론, 아미포스틴, 아미노글루테티미드, 암사크린, 아나스트로졸, 안트라마이신, 삼산화 비소, 아스파라기나제, 아스퍼린, 아자시티딘, 아제테파, 아조토마이신, 바티마스타트, 벤조데파, 비칼루타미드, 비산트렌, 비스나피드 디메실레이트, 비젤레신, 블레오마이신, 브레퀴나르, 브로피리

민, 부술판, 칵티노마이신, 칼루스테론, 카페시타빈, 카라세미드, 카르베티머, 카르보플라틴, 카르무스틴, 카루비신, 카르젤레신, 세데핀골, 셀레콕십, 클로람부실, 시롤레마이신, 시스플라틴, 클라드리빈, 코비메티닙, 크리스나톨 메실레이트, 시클로포스파미드, 시타라빈, 다카르바진, 닥티노마이신, 다우노루비신, 데시타빈, 덱소르마플라틴, 데자구아닌, 데자구아닌 메실레이트, 디아지쿠온, 도세탁셀, 독소루비신, 드롤록시펜, 드로모스타놀론, 두아조마이신, 에다트렉세이트, 에플로미틴, 엘사미트루신, 엔로플라틴, 엔프로메이트, 에피프로피딘, 에피루비신, 에르불로졸, 에소루비신, 에스트라무스틴, 에타니다졸, 에토포시드, 에토프린, 파드로졸, 파자라빈, 펜레티니드, 플록수리딘, 플루다라빈, 플루오로우라실, 플루로시타빈, 포스퀴돈, 포스트리에신, 풀베스트란트, 젬시타빈, 히드록시우레아, 이다루비신, 이포스파미드, 일모포신, 인터류킨 II (IL-2, 재조합 인터류킨 II 또는 rIL2 포함), 인터페론 알파-2a, 인터페론 알파-2b, 인터페론 알파-n1, 인터페론 알파-n3, 인터페론 베타-Ia, 인터페론 감마-Ib, 이프로플라틴, 이리노테칸, 란레오티드, 레트로졸, 류플로리드, 리아로졸, 로메트렉솔, 로무스틴, 로속산트론, 마소프로콜, 마이탄신, 메클로르에타민 히드로클로라이드, 메게스트롤, 멜렌게스트롤 아세테이트, 멜팔란, 메노가릴, 메르캅토푸린, 메토트렉세이트, 메토프린, 메투레데파, 미틴도미드, 미토카르신, 미토크로민, 미토길린, 미토말신, 미토마이신, 미토스페르, 미토탄, 미톡산트론, 미코페놀산, 넬라라빈, 노코다졸, 노갈라마이신, 오름나플라틴, 옥시수란, 파클리탁셀, 페가스파르가세, 펠리오마이신, 펜타무스틴, 폭로마이신, 페르포스파미드, 피포브로만, 피포술판, 피록산트론 히드로클로라이드, 플리카마이신, 플로메스탄, 포르피머, 포르피로마이신, 프레드니무스틴, 프로카르바진, 푸로마이신, 피라조푸린, 리보프린, 로글레티미드, 사핀골, 세무스틴, 심트라젠, 스파르포세이트, 스파르소마이신, 스피로게르마늄, 스피로무스틴, 스피로플라틴, 스트렙토니그린, 스트렙토조신, 술로페누르, 탈리소마이신, 타목시펜, 테코갈란, 테가푸르, 텔록산트론, 테모포르핀, 테니포시드, 테록시론, 테스토락톤, 티아미프린, 티오구아닌, 티오테파, 티아조푸린, 티라파자민, 토포테칸, 토레미펜, 트레스톨론, 트리시리빈, 트리메트렉세이트, 트립토렐린, 투불로졸, 우라실 머스타드, 우레데파, 바프레오티드, 베무라페닙, 베르테포르핀, 빈블라스틴, 빈크리스틴 술페이트, 빈데신, 비네피딘, 빈글리시네이트, 빈류로신, 비노렐빈, 빈로시딘, 빈졸리딘, 보로졸, 제니플라틴, 지노스타틴, 졸레드로네이트, 및 조루비신을 포함한다.

[0193] 본 발명의 측면에 따르면, 항암제는 항암 항체이다. 사용된 항암 항체는 적어도 한 가지 유형의 종양, 특히 인간 종양을 억제하는 데 유효한 임의의 항체일 수 있다. 항암 항체는 3F8, 8H9, 아바고보맙, 아비투주맙, 아달리무맙, 아데카투무맙, 아두카누맙, 아푸투주맙, 알라시주맙 페골, 알렘투주맙, 아마툭시맙, 아나투모맙 마페나톡스, 아네투맙 라브탄신, 아폴리주맙, 아르시투모맙, 아스크린바쿠맙, 아테졸리주맙, 바비툭시맙, 벨리무맙, 베바시주맙, 비바투주맙 메르탄신, 브렌툭시맙 베도틴, 브론틱투주맙, 칸투주맙 메르탄신, 칸투주맙 라브탄신, 카프로맙 펜데티드, 카투막소맙, 세툭시맙, 시타투주맙 보가톡스, 식수투무맙, 클리바투주맙 테트락세탄, 콜툭시맙 라브탄신, 코나투무맙, 다세투주맙, 달로투주맙, 뎀시주맙, 데닌투주맙 마포도틴, 데파툭시주맙 마포도틴, 두르발루맙, 두시기투맙, 에드레콜로맙, 엘로투주맙, 에막투주맙, 에미베투주맙, 에노블리투주맙, 엔포르투맙 베도틴, 에나바투주맙, 에프라투주맙, 에르투막소맙, 에타라시주맙, 파를레투주맙, 피클라투주맙, 피기투무맙, 플란보투맙, 푸툭시맙, 갈릭시맙, 가니투맙, 젬투주맙, 기렌툭시맙, 글렘바투무맙 베도틴, 이브리투모맙 티욱세탄, 이고보맙, 이맙362, 이말루맙, 임가투주맙, 인다툭시맙 라브탄신, 인두사투맙 베도틴, 이네빌리주맙, 이노투주맙 오조가미신, 인테투무맙, 이필리무맙, 이라투무맙, 이사툭시맙, 라베투주맙, 렉사투무맙, 리파스투주맙 베도틴, 린투주맙, 리릴루맙, 로르보투주맙 메르탄신, 루카투무맙, 루밀릭시맙, 룸레투주맙, 마파투무맙, 마르게툭시맙, 마투주맙, 밀라투주맙, 미르베툭시맙 소라브탄신, 미투모맙, 모가물리주맙, 목세투모맙 파수도톡스, 나콜로맙 타페나톡스, 납투모맙 에스타페나톡스, 나르나투맙, 네시투무맙, 네스바쿠맙, 니모투주맙, 니볼루맙, 오카라투주맙, 오파투무맙, 올라라투맙, 오나르투주맙, 온툭시주맙, 오레고보맙, 오포르투주맙 모나톡스, 오틀레르투주맙, 파니투무맙, 판코맙, 파르사투주맙, 파트리투맙, 펨브롤리주맙, 펨투모맙, 페르투주맙, 피딜리주맙, 피나투주맙 베도틴, 폴라투주맙 베도틴, 프리투무맙, 라코투모맙, 라드레투맙, 라무시루맙, 릴로투무맙, 리툭시맙, 로바투무맙, 사시투주맙 고비테칸, 사말리주맙, 세리반투맙, 시브로투주맙, 실툭시맙, 소피투주맙 베도틴, 타카투주맙 테트락세탄, 타렉스투맙, 테나투모맙, 테프로투무맙, 테툴로맙, 티가투주맙, 토시투모맙, 토베투맙, 트라스투주맙, 트레멜리무맙, 투코투주맙 셀모류킨, 우블리툭시맙, 우토밀루맙, 반도르투주맙 베도틴, 반틱투맙, 바누시주맙, 바를리루맙, 베센쿠맙, 볼로식시맙, 보르세투주맙 마포도틴, 보투무맙, 잘루투무맙 및 자툭시맙을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0194] 본 발명의 측면에 따르면, 시험 물질은 시험 물질은 1) 세포 표면 단백질, 예컨대 분화 클러스터 (CD) 세포 표면 분자; 2) 세포내 단백질, 예컨대 키나제; 및 3) 세포외 단백질, 예컨대 유출된 세포 표면 수용체 또는 세포 표면 수용체의 가용성 리간드 중 하나 이상과 특이적으로 결합하는 것이다.

[0195] 본 발명의 측면에 따르면, 시험 물질은 백혈구 (예를 들어, 림프구 또는 골수 계통 백혈구)에 의해 발현되는 단

백질과 특이적으로 결합하는 것이다. 추가 옵션에서, 시험 물질은 백혈구의 리간드와 특이적으로 결합하는 것이다. 또 다른 옵션에서, 시험 물질은 암 세포에 의해 발현되는 분자와 특이적으로 결합하는 것이다.

[0196] 본 발명의 측면에 따르면, 시험 물질은 화학 요법제 또는 면역요법제이다. 본 발명의 측면에 따르면, 시험 물질은 PD-1, PD-L1, 또는 CTLA-4와 특이적으로 결합할 수 있다. 본 발명의 측면에 따르면, 시험 물질은 면역 체크포인트 억제제, 예컨대 PD-1 억제제, PD-L1 억제제, 또는 CTLA-4 억제제일 수 있다. 본 발명의 측면에 따르면, 시험 물질은 아테졸리주맙, 아벨루맙, 두르발루맙, 이필리무맙, 니볼루맙, 펨브롤리주맙, 및 전술한 것 중 어느 하나의 항원 결합 단편으로부터 선택된 면역 체크포인트 억제제이다.

[0197] 시험 물질은, 예컨대 경구, 직장, 협측, 코, 근육내, 질, 안구, 귀, 피하, 경피, 종양내, 정맥내 및 복강내이지만, 이에 제한되지는 않는 임의의 적합한 투여 경로에 의해 투여될 수 있다.

[0198] 본 발명의 조성물 및 방법의 실시양태는 하기 실시예에 예시되어 있다. 이들 실시예는 예시적인 목적으로 제공되며 본 발명의 조성물 및 방법의 범위에 대한 제한으로 간주되지 않는다.

[0199] **실시예**

[0200] 인간 IL-15 트랜스제닉 NSG 마우스의 창출

[0201] 인간 *IL15* 유전자를 함유하는 RP11-620F3으로 지명된 약 200 Kbp BAC를 초리(Chori) BACPAC로부터 구입하였다. NSG 배아의 전핵 주사는 인간 *IL15* 유전자를 그의 자손에게 전달하는 트랜스제닉 수컷 창시자를 산출하였다. NSG-Tg (Hu-IL15) 반접합성 자손은 폴리머라제 연쇄 반응 (PCR)에 의해 확인되었고 집락이 확장되었다. 인간 IL-15 수준은 먼저, NSG-Tg (Hu-IL15) 반접합체 상에서 확실히 하였다. 인간 IL-15 트랜스진에 대한 3마리의 암컷 마우스 반접합체 및 55일생의 3마리의 암컷 NSG 비-트랜스제닉 마우스로부터 혈장을 수집하였다. ELISA 검정은 콴티카인(Quantikine) 인간 IL-15 ELISA 키트 [알앤디 시스템즈 (R&D Systems; 미국 미네소타주 미니애폴리스)]를 사용하였다. NSG-Tg (Hu-IL15) 반접합체는 인간 IL-15의 생리학적 수준 (7.1 +/- 0.3 pg/ml)을 가지고 있는 반면, 비-트랜스제닉 NSG 마우스는 예상대로 인간 IL-15가 결여되어, 트랜스제닉 동물에서의 인간 IL-15 단백질의 생산을 서류로 입증하였다 (도 1).

[0202] 후속 교배 및 시험 교배는 부가의 NSG-Tg (Hu-IL15) 자손을 생산하였다. 인간 IL-15 트랜스진을 동형 접합성으로 고정시키기 위해 유전적 교배를 수행하였고, 그 결과 Hu-IL15 트랜스제닉 동형 접합체가 잘 생존하였으며 동형 접합체의 교배에서 새끼를 낳은 것으로 밝혀졌다. NSG-Tg (Hu-IL15) 집락은 형제자매 교배에 의해 고 장벽 마우스 룸에서 유지된다. 인간 IL15 트랜스진의 동형 접합성 발현은 NSG-Tg (Hu-IL15) 반접합체와 비교해서 2배 더 높은 수준의 인간 IL-15를 초래한다 (도 2). 뮤린 IL-15를 트랜스제닉 방식으로 과다 발현하는 면역 적격 마우스가 문헌 [T. A. Fehniger et al., Fatal leukemia in interleukin-15 transgenic mice, Blood cells, molecules & diseases 27, 223-230 (2001)]에 기재되어 있고, 이들 마우스 IL-15 트랜스제닉 동물에게는 6주생부터 T-NK 세포 표현형을 갖는 치명적인 림프구성 백혈병이 발생한다. 대조적으로, NSG-Tg (Hu-IL15) 마우스에게는 내인성 뮤린 T 및 NK 세포가 결여되고 마우스 백혈병이 발생하지 않는다. NSG-Tg (Hu-IL15) 동형 접합 육종 쌍은 육종 효율의 감소로 인해 이들이 중도에 탈락하기 전 6 내지 9개월 동안 육종 콜로니에서 일상적으로 유지되며, 백혈병의 증거는 발견되지 않았다.

[0203] NSG-Tg (Hu-IL15) 마우스는 인간 NK 세포 발달을 지원한다

[0204] NSG-Tg (Hu-IL15) 마우스가 인간 조혈 줄기 세포 (HSC)로의 생착 후 인간 NK 세포의 발달을 지원할 것인지의 여부를 결정하기 위해, 연령 및 성별 매칭된 NSG 대조군과 함께, 8 내지 12주생 NSG-Tg (HuIL15) 마우스 군에 인간 HSC를 생착시켰다. 간략하게 언급하면, 수용자 마우스에게 200 cGy 방사선조사한 다음, 제대혈로부터 강화된 $1x10^5$개의 인간 CD34+ HSC를 정맥내로 주사하였다. 유동 세포계수법을 사용하여 인간 NK 세포 발달 및 표현형을 모니터링하였다. 인간 HSC 생착된 NSG 및 NSG-Tg (Hu-IL15) 마우스는 실험 과정에 걸쳐 유사한 수준의 생존율을 갖는다 (도 3). 말초 혈액에서 유동 세포계수법에 의해 인간 CD45+ 세포의 수준을 모니터링하였다. NSG-Tg (Hu-IL15) 마우스는 도 4에 도시된 바와 같이, NSG 마우스와 비교해서 혈액에서의 CD45+ 세포의 발달이 가속화되었다. 인간 CD45+ 세포의 수준에 의해 결정된 바와 같이, 인간 백혈구 발달은 시험된 모든 시점에서 NSG 및 NSG-Tg (Hu-IL15) 마우스의 말초 혈액에서 유사하며, HSC 주사 후 12주에서의 대표적인 데이터가 도 5에 도시된다.

[0205] 말초 혈액에서 유동 세포계수법에 의해 인간 CD3+ T 세포의 수준을 모니터링하였다. HSC-생착된 NSG-Tg (Hu-IL15) 마우스는 NSG 마우스와 비교해서 혈액에서 인간 T 세포의 유사한 발달을 보여준다 (도 6 참조).

[0206] 인간 NK 세포 발달은 HSC-생착된 NSG 마우스와 비교해서 HSC-생착된 NSG-Tg (Hu-IL15) 마우스에서 상당히 증강된다. HSC-생착된 마우스로부터의 말초 혈액을 표시된 시점에서 회수하고, 인간 NK 세포를 도 7에 기재된 바와 같이 검출하였다. 인간 NK 세포는 NSG 마우스와 비교해서 NSG-Tg (Hu-IL15) 마우스에서 시험된 모든 시점에서 상당히 더 높은 수준으로 발견되었다 (도 8).

[0207] 말초 혈액에서 유동 세포계수법에 의해 인간 CD20+ B 세포의 수준을 모니터링하였다. 생착된 NSG-Tg (Hu-IL15) 마우스는 NSG 마우스와 비교해서 혈액에서 인간 B 세포의 비율이 더 낮다 (도 9 참조).

[0208] 말초 혈액에서 유동 세포계수법에 의해 인간 CD33+ 골수성 세포의 수준을 모니터링하였다. HSC-생착된 NSG-Tg (Hu-IL15) 마우스는 NSG 마우스와 비교해서 혈액에서 인간 골수성 세포의 유사한 발달을 갖는다 (도 10 참조).

[0209] 말초 혈액에서 유동 세포계수법에 의해 인간 CD56+/CD16+ NK 세포의 총 세포 수준을 모니터링하였다. HSC-생착된 NSG-Tg (Hu-IL15) 마우스는 NSG 마우스와 비교해서 혈액에서 일관된 수의 인간 NK 세포를 나타낸다 (도 11 참조).

[0210] NSG-Tg (HuIL15) 마우스로부터 회수된 인간 NK 세포는 또한, 기능적 표현형을 나타낸다. 도 12a 및 12b 및 도 13a 및 13b에 도시된 바와 같이, NSG-Tg (HuIL15) 마우스의 혈액 및 비장에서의 인간 NK 세포의 상당히 더 높은 비율은, NK 세포의 과립에서 발견되는 세린 프로테아제인 세포내 그랜자임 B, 및 세포막 내에서의 기공 형성에 대해 책임이 있는 당단백질인 세포내 퍼포린의 높은 수준을 발현한다. 도 12a에서의 점선은 "이소형 대조군" 또는 "FMO"("형광 마이너스 원" 대조군)의 곡선이며, 이는 실선에서 양성 염색을 위한 컷오프에 대한 배경 수준이 어디에 있는지를 나타낸다. 이는 도 13b에서 "FMO" 표지된 선과 유사하다.

[0211] NSG-Tg (Hu-IL15) 마우스는 생착된 인간 NK 세포를 유지한다

[0212] 인간 HSC 생착 후 인간 NK 세포 발달을 지원하는 데 있어서 인간 IL-15에 대한 요건 외에도, 인간 NK 세포는 생체내 및 시험관내 생존을 위해 인간 IL-15를 필요로 한다. NSG-Tg (Hu-IL15) 마우스가 인간 말초 혈액으로의 생착 후 인간 NK 세포의 유지를 지원할 것인지의 여부를 결정하기 위해, 8 내지 12주생의 NSG-Tg (Hu-IL15) 마우스 군, 및 연령 및 성별 매칭된 NSG 대조군에게 인간 말초 혈액 단핵 세포 ($1x10^7$개의 PBMC)를 IV로 주사하여 생착시켰다. CD56+ 인간 NK 세포의 수준을 제5일에 주사된 마우스의 말초 혈액에서 결정하였다. NSG-Tg (Hu-IL15) 마우스는 NSG 마우스와 비교해서 인간 PBMC로부터의 인간 NK 세포의 증강된 생착 및 생존을 지원한다. 도 14는 총 인간 CD45+ 백혈구의 비율로서 인간 CD56+ CD3- 세포의 백분율을 보여준다. NSG-Tg (Hu-IL15) 마우스는 NSG 대조군에서의 10% 미만과 비교해서 50% 초과의 NK 세포를 갖고 있었다.

[0213] HSC-생착된 NSG-Tg (Hu-IL15) 마우스로부터의 인간 NK 세포가 NK 감수성 표적 (K562 세포)을 사멸시키는지의 여부를 결정하기 위해, 인간 NK 세포를 HSC-생착된 NSG-Tg (Hu-IL15) 마우스의 비장 또는 인간 PBMC로부터 강화시키고, 표준 Cr^{51} 방출 검정을 사용하여 K562 표적 세포를 용해시킬 수 있는 능력에 관하여 평가하였다. NK 세포 및 K562 세포를 20시간 동안 함께 인큐베이션하고 Cr^{51}의 방출을 정량화하였다. 도 15는 HSC-생착된 NSG-Tg (Hu-IL15) 마우스로부터의 인간 NK 세포가 NK 감수성 표적 (K562 세포)을 사멸시킨다는 것을 보여주는 그래프이다.

[0214] 생체내 ADCC (항체 의존성 세포 매개된 세포 독성) 검정

[0215] NSG-IL15 마우스에 인간 CD34+ HSC를 생착시켰다. 발달하는 인간 NK 세포의 ADCC 활성을 평가하기 위해, 생착된 마우스 및 생착되지 않은 대조군 마우스에게 NK 세포 감수성 B 세포 종양 세포주 [CD20+, 다우디(Daudi) 또는 라지(Raji) 세포]을 피하로 주사하였다 (5백만개 세포). 종양이 만져서 알 수 있게 되었을 때, 마우스를 100 ug의 항-CD20 항체 (리툭시맙)로 1주에 3회 처리하거나 또는 처리하지 않은 채로 두었다. 종양 크기가 2000 mm^3에 도달할 때까지 종양 성장을 1주에 2회 모니터링하였다.

[0216] 항목

[0217] 항목 1. 인간 인터류킨-15 (hu-IL-15)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 그의 게놈 내에 포함하도록 유전자 변형된 면역결핍 마우스이며, 여기서 상기 마우스는 hu-IL-15를 발현한다.

[0218] 항목 2. 마우스에게 기능적 내인성 마우스 NK 세포가 부재하는, 항목 1의 면역결핍 마우스.

[0219] 항목 3. 마우스가 IL-2RG 기능없음이며, 이에 따라 기능적 내인성 IL-2RG 유전자가 결여되고 기능적 내인성 마

우스 NK 세포가 결여되는, 항목 1 또는 2의 면역결핍 마우스.

[0220] 항목 4. 면역결핍 마우스가 유전자 변형된 NSG, NRG 또는 NOG 마우스인, 전술한 항목 중 어느 하나의 면역결핍 마우스.

[0221] 항목 5. 인간 조혈 줄기 세포, 인간 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC), 인간 NK 세포, 인간 NK 세포주 세포, 또는 그의 임의의 둘 이상의 조합을 추가로 포함하는, 전술한 항목 중 어느 하나의 면역결핍 마우스.

[0222] 항목 6. 마우스가 인간 자연 살해 세포를 포함하고, 인간 자연 살해 세포가 마우스에서 인간 조혈 줄기 세포의 분화에 의해 마우스에서 생산되거나 또는 인간 자연 살해 세포가, 인간 자연 살해 세포를 함유하는 PBMC의 투여 후 마우스에서 유지되고/되거나 생산되는 것인, 전술한 항목 중 어느 하나의 면역결핍 마우스.

[0223] 항목 7. 인간 종양 세포를 포함하는 인간 이종이식편을 추가로 포함하는, 전술한 항목 중 어느 하나의 면역결핍 마우스.

[0224] 항목 8. 항목 1 내지 6 중 어느 하나에 따른 면역결핍 마우스를 제공하는 단계; 인간 종양 세포를 상기 면역결핍 마우스에게 투여하는 단계이며, 여기서 인간 종양 세포가 유전자 변형된 면역결핍 마우스에서 고형 또는 비-고형 종양을 형성하는 것인 단계; 시험 물질을 상기 면역결핍 마우스에게 투여하는 단계; 및 시험 물질에 대한 고형 또는 비-고형 종양의 반응을 검정하는 단계이며, 여기서 종양 및/또는 종양 세포에 대한 시험 물질의 억제 효과는 시험 물질을 항종양 활성을 갖는 것으로 확인시켜 주는 것인 단계를 포함하는, 시험 물질의 항종양 활성을 확인하는 방법.

[0225] 항목 9. 표준에 대한 반응을 비교하여 인간 종양 세포에 대한 시험 물질의 효과를 결정하는 것을 추가로 포함하며, 여기서 인간 종양 세포에 대한 시험 물질의 억제 효과는 시험 물질을 항종양 활성을 갖는 것으로 확인시켜 주는 것인, 항목 8의 방법.

[0226] 항목 10. 시험 물질이 면역요법제를 포함하는 것인, 항목 8 또는 9의 방법.

[0227] 항목 11. 시험 물질이 면역 체크포인트 억제제인 것인, 항목 8 내지 10 중 어느 하나의 방법.

[0228] 항목 12. 면역 체크포인트 억제제가 PD-1 억제제, PD-L1 억제제, 또는 CTLA-4 억제제인 것인, 항목 11의 방법.

[0229] 항목 13. 면역 체크포인트 억제제가 아테졸리주맙, 아벨루맙, 두르발루맙, 이필리무맙, 니볼루맙, 또는 펨브롤리주맙이거나, 또는 면역 체크포인트 억제제가 전술한 것 중 어느 하나의 항원 결합 단편을 포함하는 것인, 항목 11 또는 12의 방법.

[0230] 항목 14. 시험 물질이 항체를 포함하는 것인, 항목 8 내지 13 중 어느 하나의 방법.

[0231] 항목 15. 시험 물질이 항암제를 포함하는 것인, 항목 8 내지 14 중 어느 하나의 방법.

[0232] 항목 16. 항목 1 내지 4 중 어느 하나에 따른 면역결핍 마우스를 제공하는 단계; 및 인간 조혈 줄기 세포, 인간 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC), 인간 NK 세포, 인간 NK 세포주 세포, 또는 그의 임의의 둘 이상의 조합을 상기 면역결핍 마우스에게 투여하는 단계를 포함하는, 유전자 변형된 면역결핍 인간화 마우스 모델을 제조하는 방법.

[0233] 항목 17. 인간 조혈 줄기 세포, 인간 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC), 인간 NK 세포, 인간 NK 세포주 세포, 또는 그의 임의의 둘 이상의 조합을 투여하기 전에 마우스의 마우스 조혈 세포를 감소시키도록 면역결핍 마우스를 컨디셔닝하는 것을 추가로 포함하는, 항목 16의 방법.

[0234] 항목 18. 마우스의 마우스 조혈 세포를 감소시키도록 면역결핍 마우스를 컨디셔닝하는 것이, 유전자 변형된 면역결핍 마우스에게 방사선조사하고/하거나 방사선모방 약물을 유전자 변형된 면역결핍 마우스에게 투여하는 것을 포함하는 것인, 항목 17의 방법.

[0235] 항목 19. 마우스의 마우스 조혈 세포를 감소시키도록 컨디셔닝하는 것이, 인간 조혈 줄기 세포를 투여하기 전에 수행되지 않는 것인, 항목 18의 방법.

[0236] 항목 20. 인간 종양 세포를 포함하는 인간 이종이식편을 면역결핍 마우스에게 투여하는 것을 추가로 포함하는, 항목 16 내지 19 중 어느 하나의 방법.

[0237] 항목 21. 실질적으로 본원에 기재되거나 또는 제시된 바와 같은, 유전자 변형된 면역결핍 마우스.

[0238] 항목 22. 실질적으로 본원에 기재되거나 또는 제시된 바와 같은, 유전자 변형된 면역결핍 인간화 마우스 모델을 제조하는 방법.

[0239] 항목 23. 실질적으로 본원에 기재되거나 또는 제시된 바와 같은, 시험 물질의 항종양 활성을 확인하는 방법.

[0240] 서열

[0241] 서열식별번호: 1 인간 인터류킨 15

[0242]
```
MRISKPHLRSISIQCYLCLLLNSHFLTEAGIHVFILGCFSAGLPKTEANWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDA
TLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEK
NIKEFLQSFVHIVQMFINTS
```

[0243] 인간 인터류킨 15를 코딩하는 서열식별번호: 2

[0244]
```
atgagaatttcgaaaccacatttgagaagtatttccatccagtgctacttgtgtttacttctaaacagtca
ttttctaactgaagctggcattcatgtcttcattttgggctgtttcagtgcagggcttcctaaaacagaag
ccaactgggtgaatgtaataagtgatttgaaaaaaattgaagatcttattcaatctatgcatattgatgct
actttatatacggaaagtgatgttcaccccagttgcaaagtaacagcaatgaagtgctttctcttggagtt
acaagttatttcacttgagtccggagatgcaagtattcatgatacagtagaaaatctgatcatcctagcaa
acaacagtttgtcttctaatgggaatgtaacagaatctggatgcaaagaatgtgaggaactggaggaaaaa
aatattaaagaatttttgcagagttttgtacatattgtccaaatgttcatcaacacttct
```

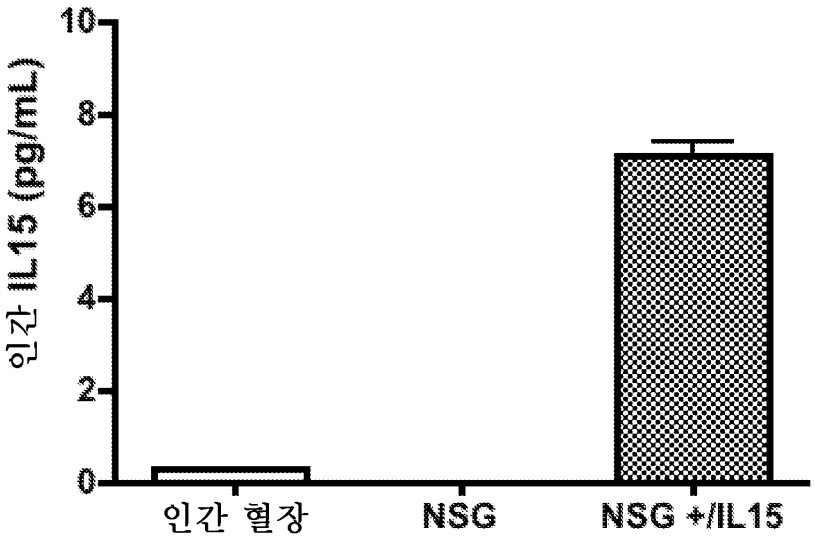
[0245] 명확한 설명을 위해 별도의 실시양태와 관련하여 기재된 본 발명의 특정의 특색이 또한, 단일 실시양태에서 조합하여 제공될 수 있는 것으로 인지된다. 반대로, 간략한 설명을 위해 단일 실시양태와 관련하여 기재된 본 발명의 다양한 특색이 또한, 별도로 또는 임의의 적합한 서브 조합으로 제공될 수 있다.

[0246] 본 명세서에 언급된 임의의 특허 및 간행물은 각각의 개별 간행물이 구체적으로 및 개별적으로 참조로 포함되도록 표시된 것과 동일한 정도로 본원에 참조로 포함된다.

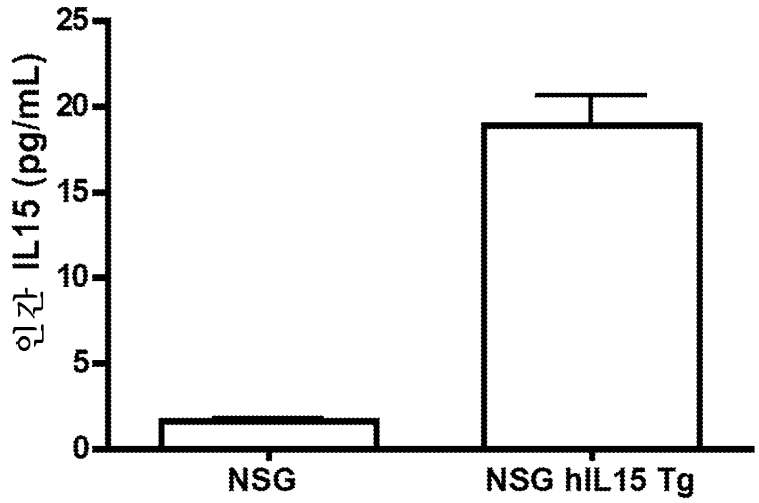
[0247] 본원에 기재된 조성물 및 방법은 현재, 바람직한 실시양태를 대표하며, 예시적이고, 본 발명의 범위를 제한하려는 것이 아니다. 그 내에서의 변화 및 다른 용도가 관련 기술 분야의 통상의 기술자에게 일어날 것이다. 이러한 변화 및 다른 용도는 청구범위에 제시된 바와 같은 본 발명의 범위로부터 벗어나지 않고서도 이루어질 수 있다.

도면

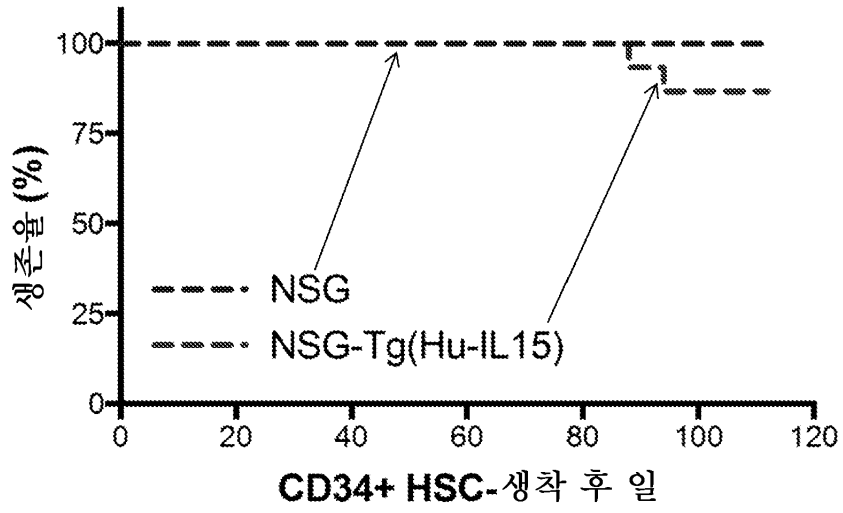
도면1



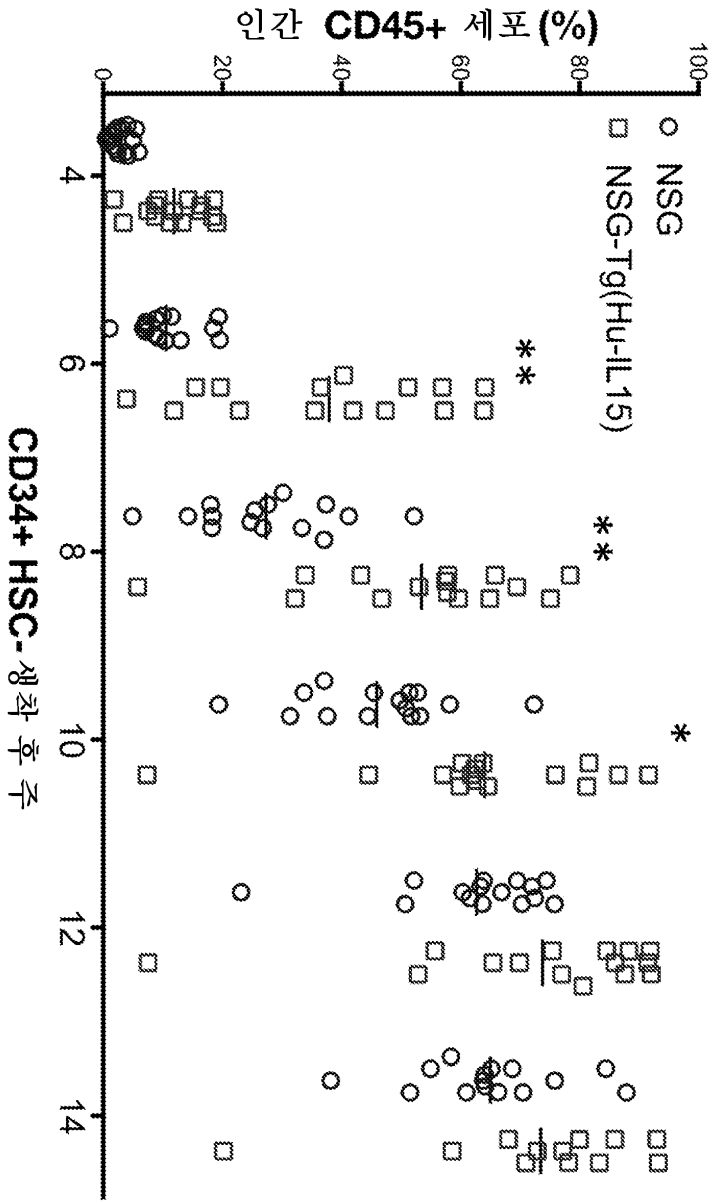
도면2


25
20
15
10
5
0
인간 IL15 (pg/mL)
NSG
NSG hIL15 Tg

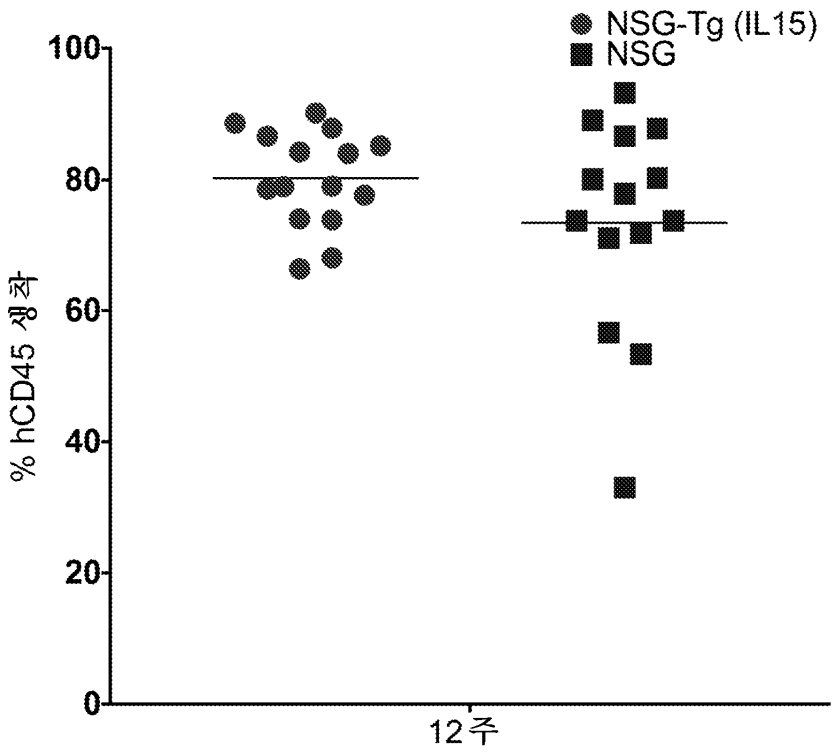
도면3


100
75
50
25
0
생존율 (%)
NSG
NSG-Tg(Hu-IL15)
0
20
40
60
80
100
120
CD34+ HSC-생착 후 일

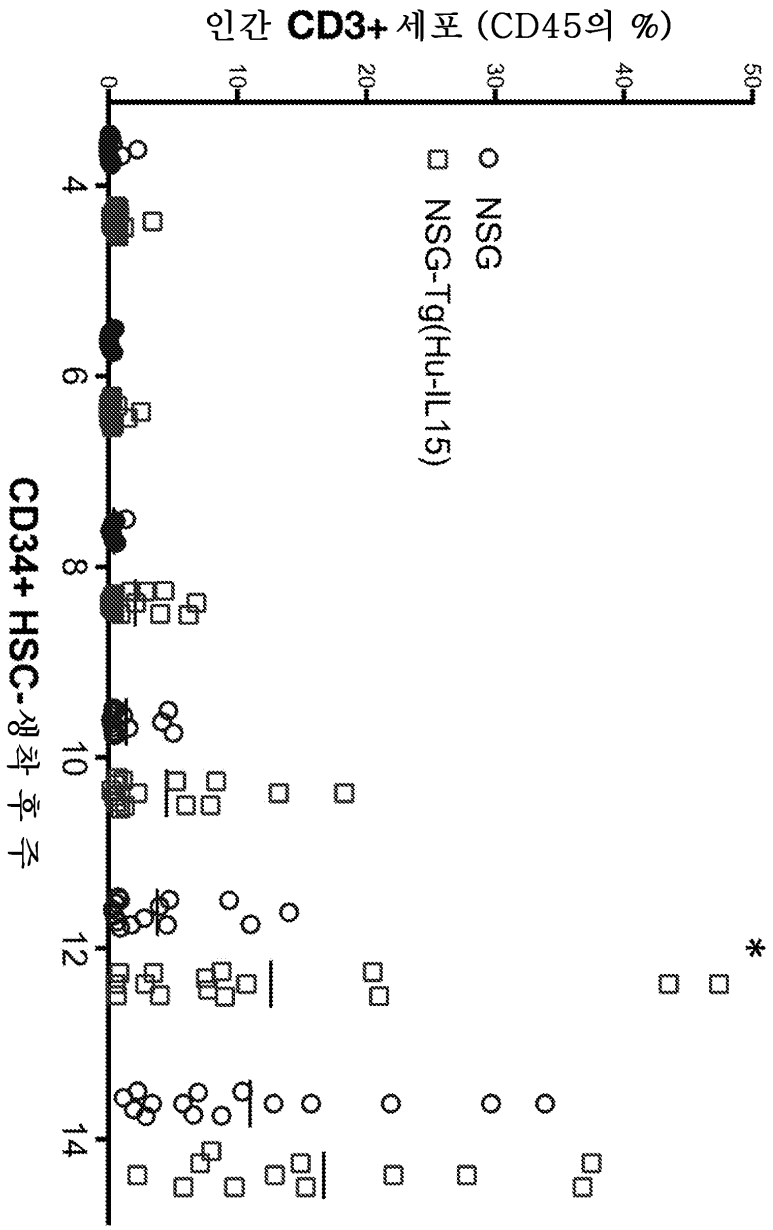
도면4


인간 CD45+ 세포(%)
0
20
40
60
80
100
NSG
NSG-Tg(Hu-IL15)
CD34+ HSC-생착 후 주
4
6
8
10
12
14
**
**
*

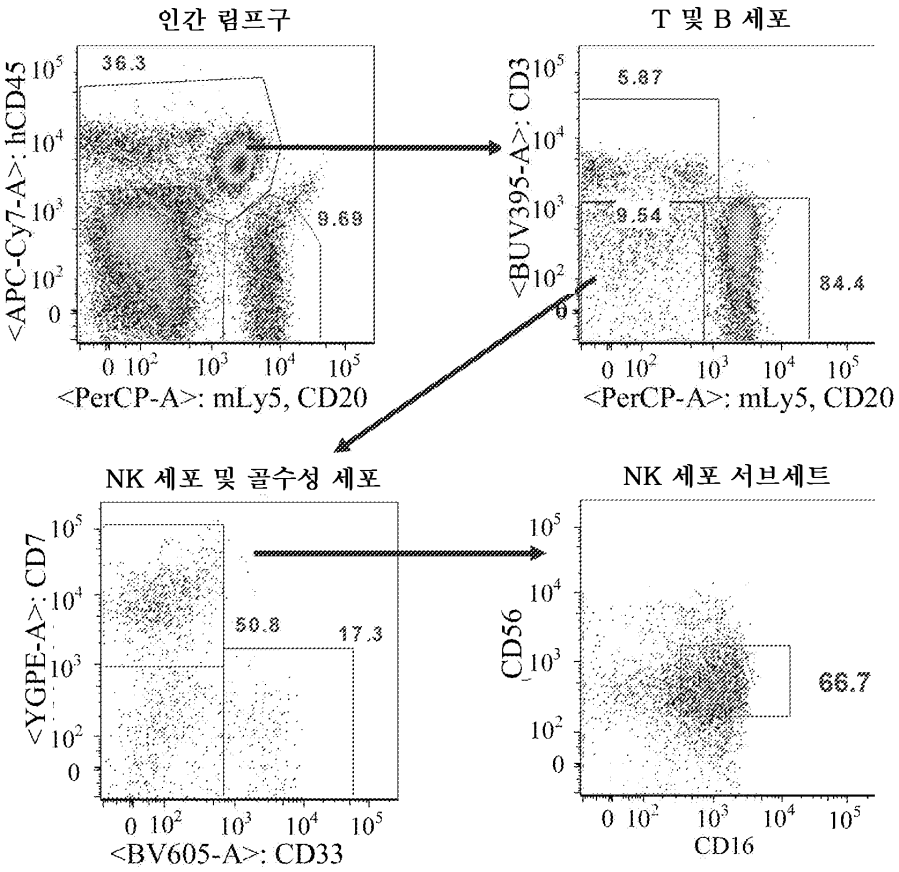
도면5



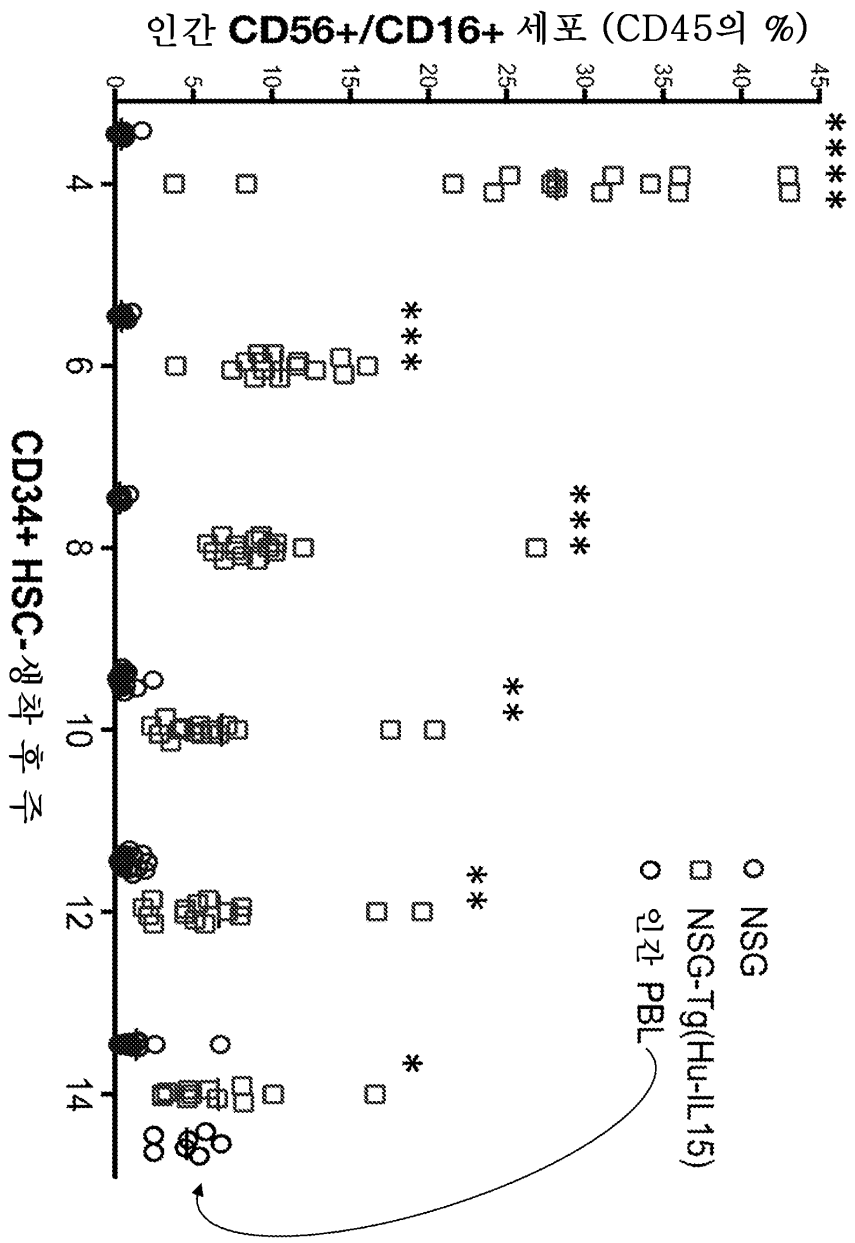
도면6


인간 CD3+ 세포 (CD45의 %)
0
10
20
30
40
50
NSG
NSG-Tg(Hu-IL15)
CD34+ HSC-생착 후 주
4
6
8
10
12
14
*

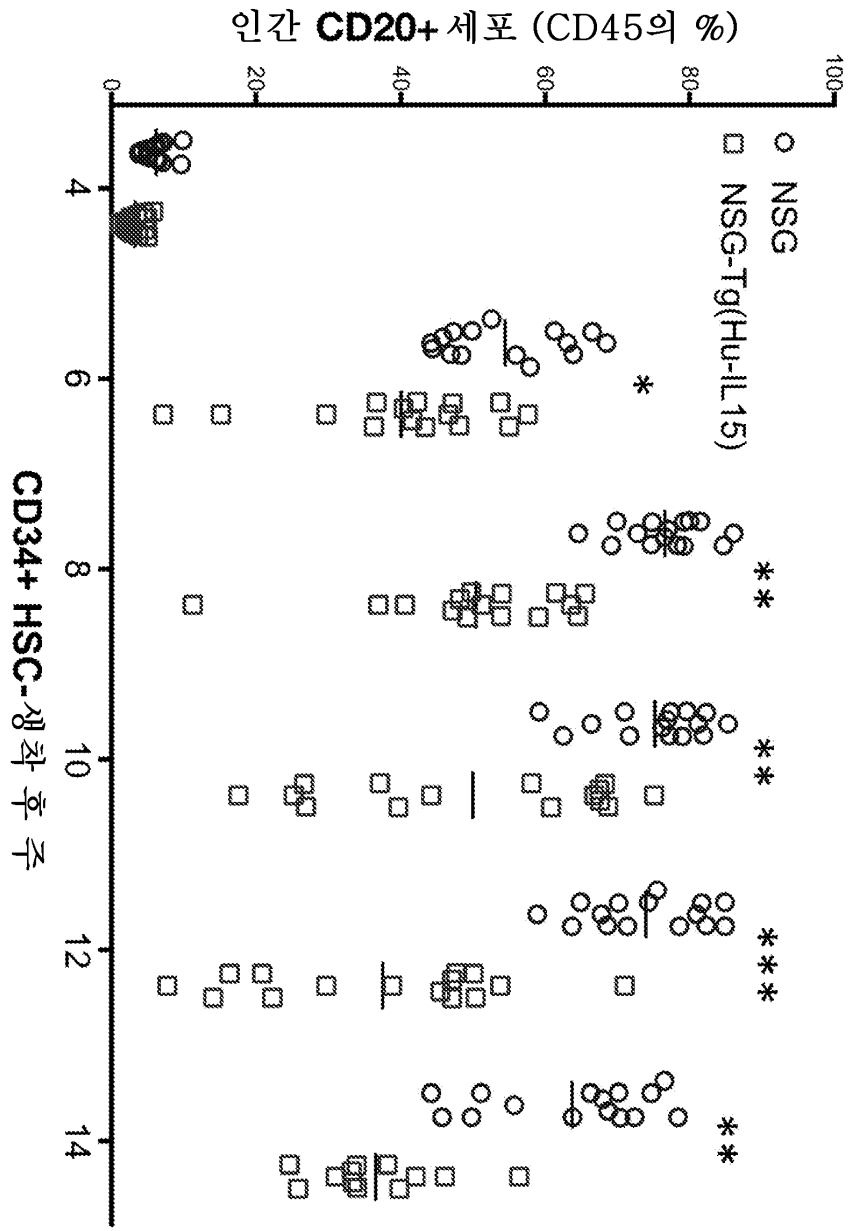
도면7


인간 림프구
<APC-Cy7-A>: hCD45
<PerCP-A>: mLy5, CD20
36.3
9.69
T 및 B 세포
<BUV395-A>: CD3
<PerCP-A>: mLy5, CD20
5.87
9.54
84.4
NK 세포 및 골수성 세포
<YGPE-A>: CD7
<BV605-A>: CD33
50.8
17.3
NK 세포 서브세트
CD56
CD16
66.7

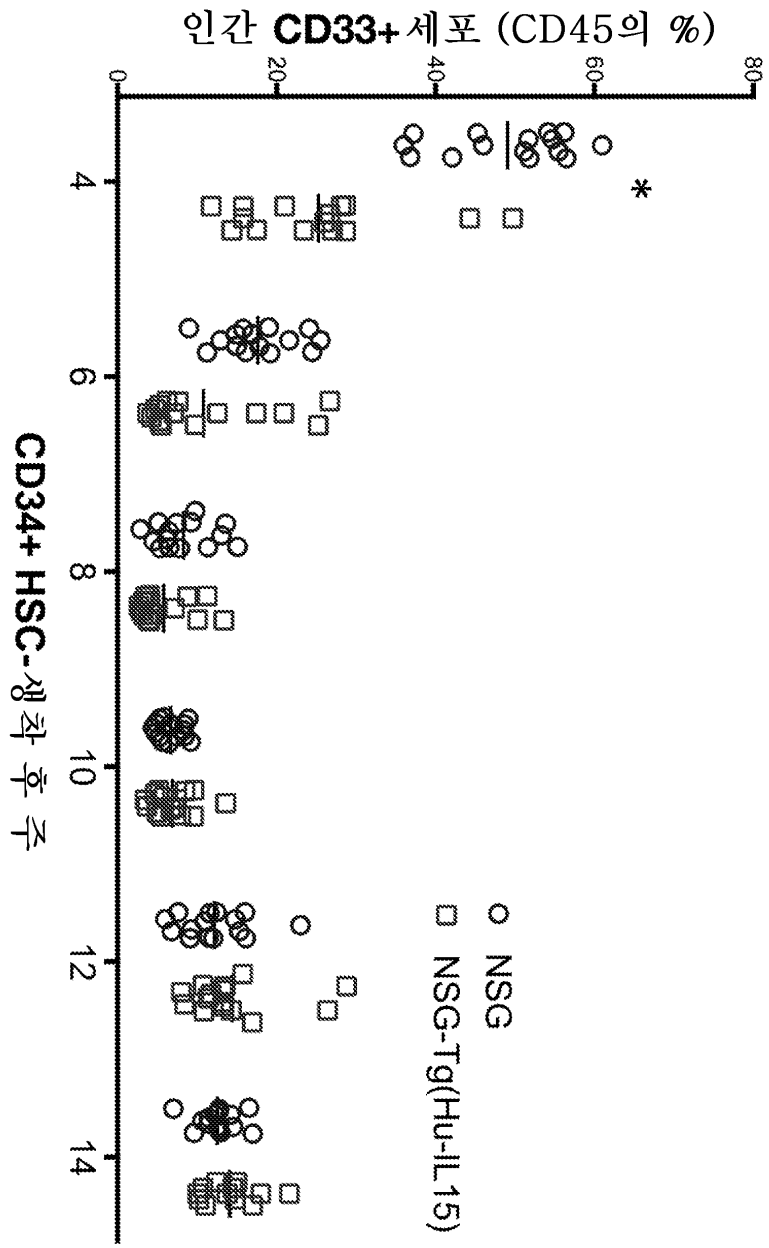
도면8


인간 CD56+/CD16+ 세포 (CD45의 %)
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
4
6
8
10
12
14
CD34+ HSC-생착 후 주
NSG
NSG-Tg(Hu-IL15)
인간 PBL

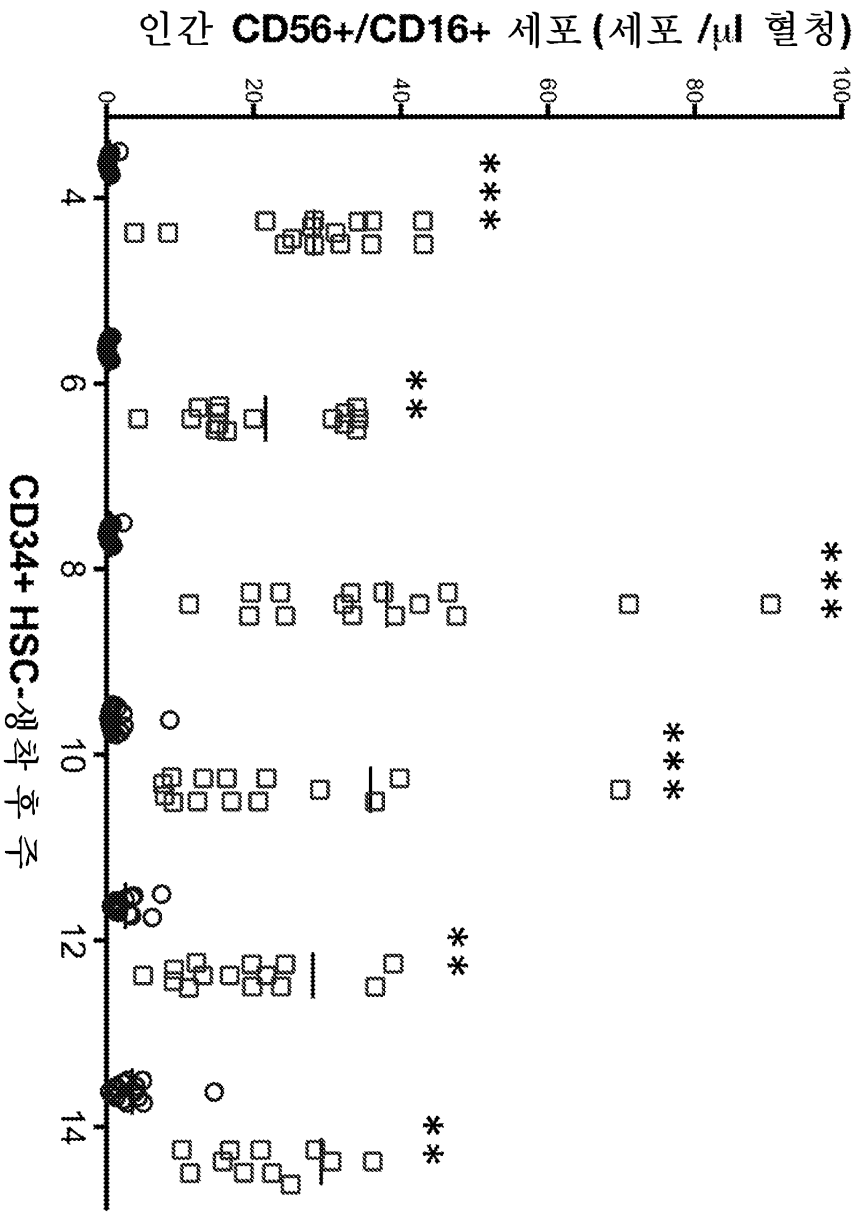
도면9


인간 CD20+ 세포 (CD45의 %)
0
20
40
60
80
100
4
6
8
10
12
14
CD34+ HSC-생착 후 주
NSG
NSG-Tg(Hu-IL15)
*
**
**
***
**

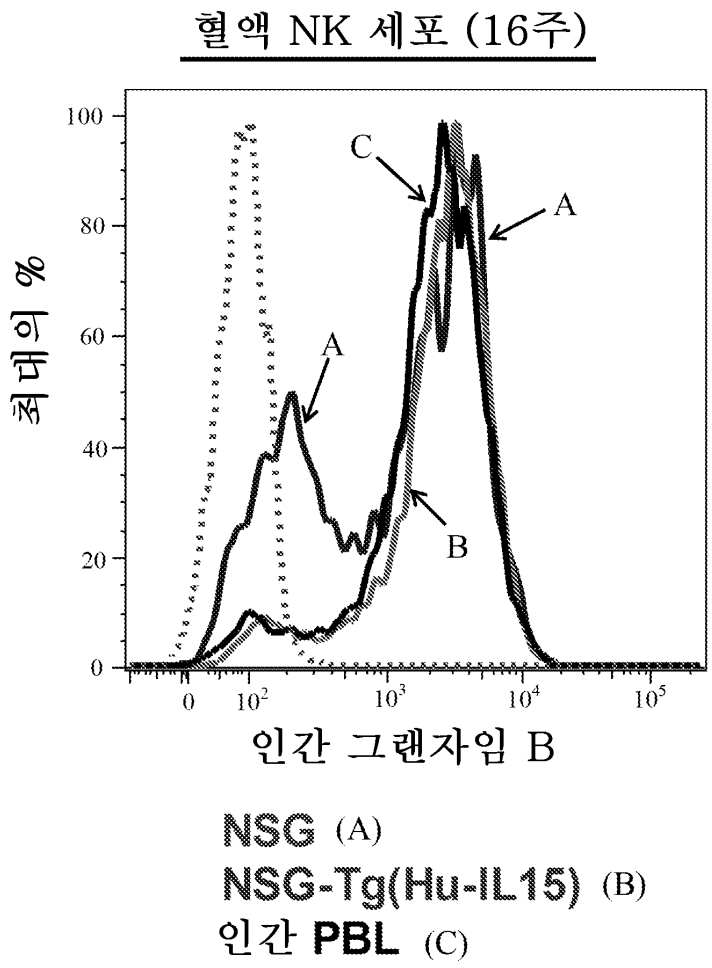
도면10


인간 CD33+ 세포 (CD45의 %)
0
20
40
60
80
CD34+ HSC-생착 후 주
4
6
8
10
12
14
*
NSG
NSG-Tg(Hu-IL15)

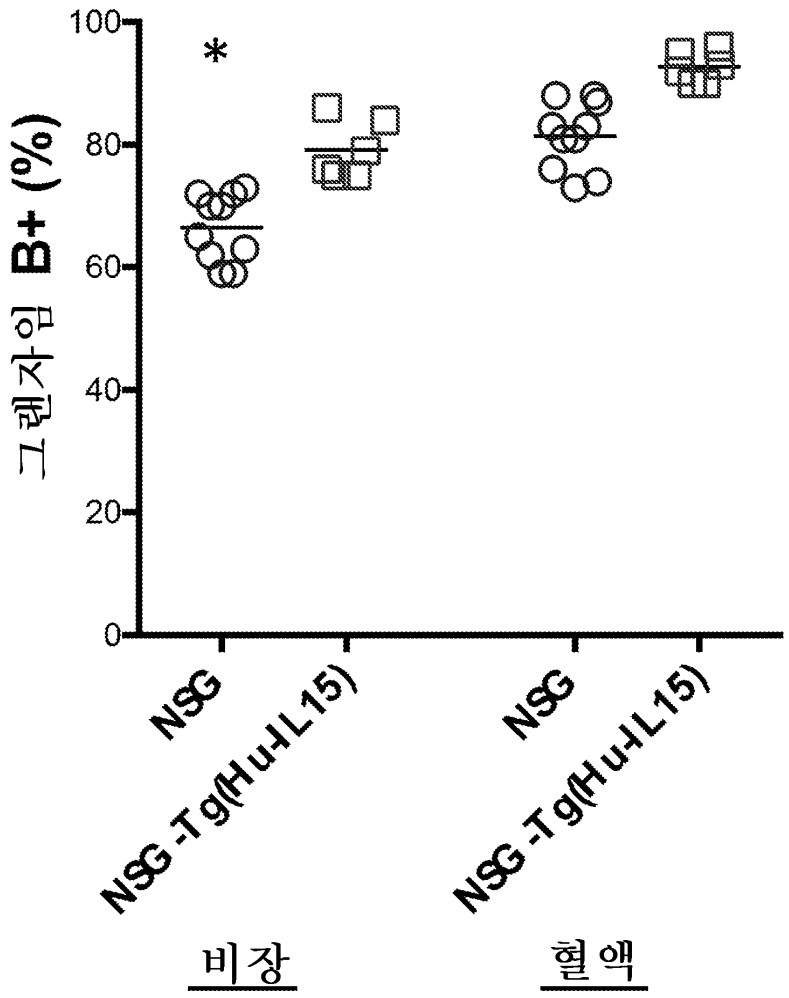
도면11


인간 CD56+/CD16+ 세포 (세포 /μl 혈청)
0
20
40
60
80
100
CD34+ HSC-생착 후 주
4
6
8
10
12
14

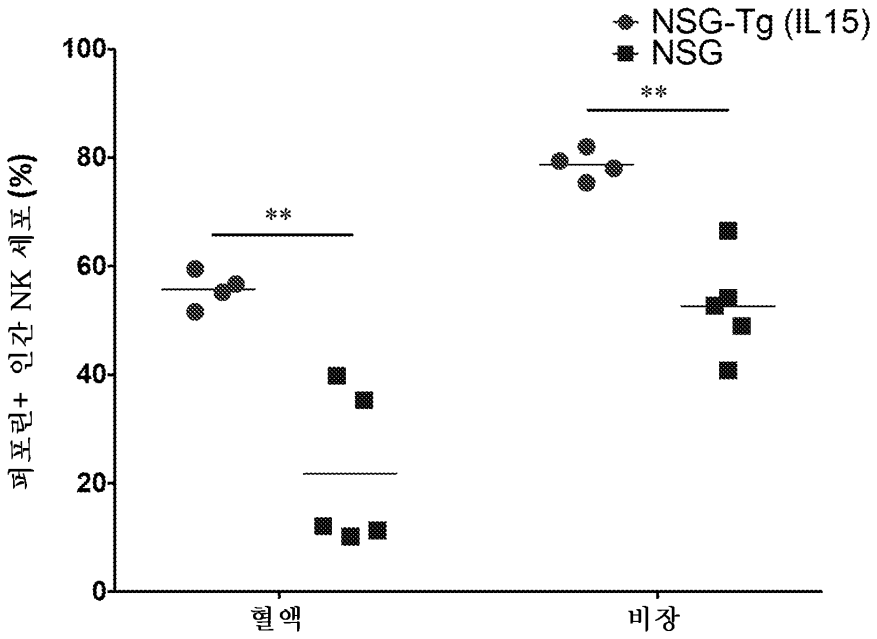
도면12a


혈액 NK 세포 (16주)
100
80
60
40
20
0
최대의 %
C
A
A
B
0
10^2
10^3
10^4
10^5
인간 그랜자임 B
NSG (A)
NSG-Tg(Hu-IL15) (B)
인간 PBL (C)

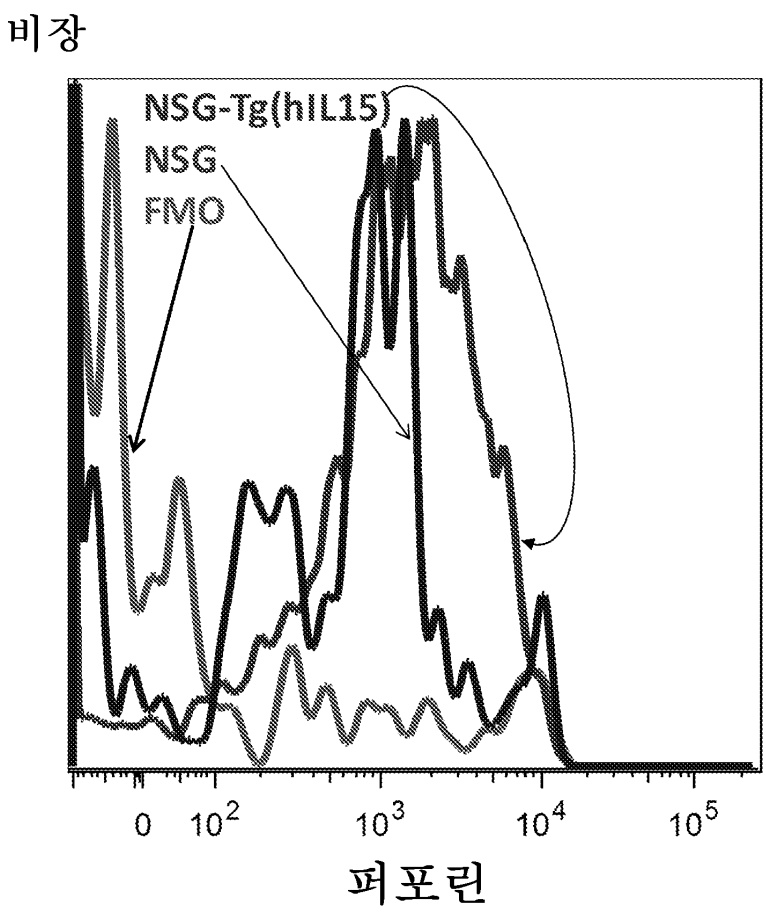
도면12b



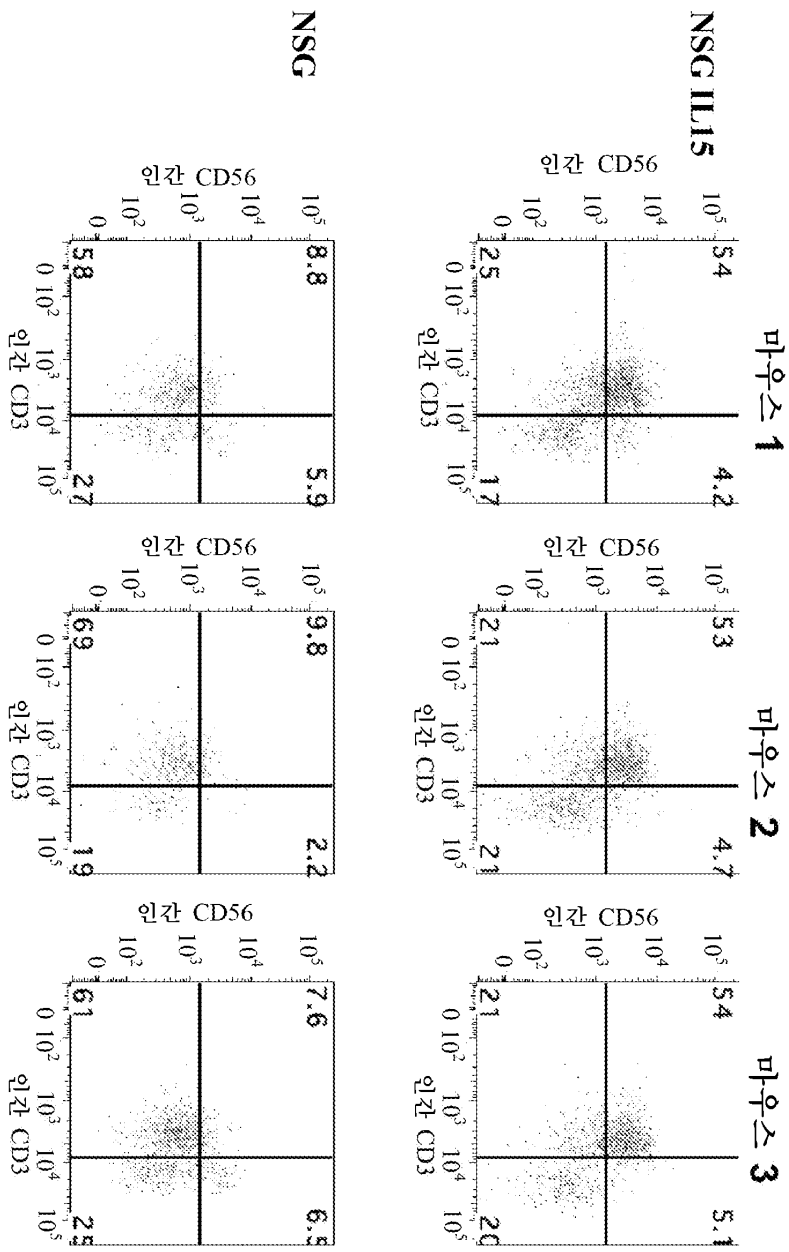
도면13a


NSG-Tg (IL15)
NSG
**
**
퍼포린+ 인간 NK 세포 (%)
100
80
60
40
20
0
혈액
비장

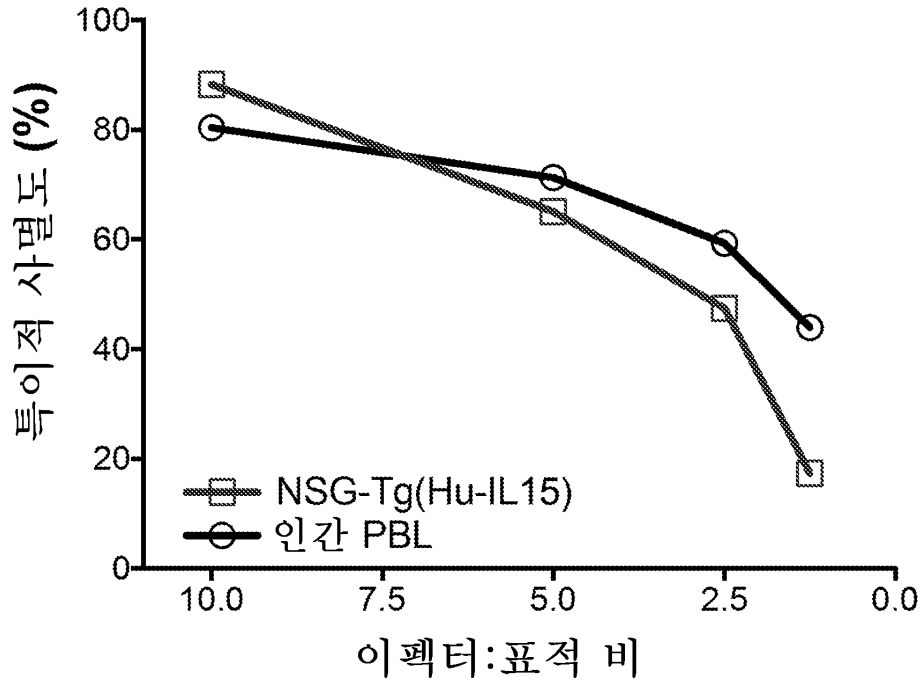
도면13b


비장
NSG-Tg(hIL15)
NSG
FMO
0
10^2
10^3
10^4
10^5
퍼포린

도면14


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

도면15



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> The Jackson Laboratory

<120> IMMUNODEFICIENT MICE TRANSGENICALLY EXPRESSING HUMAN INTERLEUKIN 15

<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

<213> Homo sapiens

<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

<210> 2

<211> 486

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<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

acttct 486