



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년02월15일

(11) 등록번호 10-2637590

(24) 등록일자 2024년02월13일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
*C07K 14/705* (2006.01) *A01K 67/027* (2024.01)  
*C07K 14/79* (2006.01) *C12N 15/85* (2006.01)  
*G01N 33/68* (2006.01)
- (52) CPC특허분류  
*C07K 14/70582* (2013.01)  
*A01K 67/0275* (2024.01)
- (21) 출원번호 10-2019-7025801
- (22) 출원일자(국제) 2018년02월15일  
 심사청구일자 2021년02월09일
- (85) 번역문제출일자 2019년09월02일
- (65) 공개번호 10-2019-0135993
- (43) 공개일자 2019년12월09일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2018/018302
- (87) 국제공개번호 WO 2018/152285  
 국제공개일자 2018년08월23일
- (30) 우선권주장  
 62/460,692 2017년02월17일 미국(US)  
 (뒷면에 계속)
- (56) 선행기술조사문헌  
 Journal of Virology (2012) Vol.86, No.7,  
 pp.4024-4028\*  
 Science Translational Medicine (2014) Vol.6,  
 Issue 261, p.261ra154\*  
 W02016081643 A1  
 W02014189973 A1  
 \*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

- (73) 특허권자  
 데날리 테라퓨틱스 인크.  
 미국 캘리포니아 사우스 샌프란시스코 오이스터  
 포인트 블러바드 161 (우: 94080)
- (72) 발명자  
 데니스, 마크 에스.  
 미국 94080 캘리포니아 사우스 샌프란시스코 오이  
 스터 포인트 블러바드 161 데날리 테라퓨틱스 인  
 크. (내)  
 실버맨, 아담 피.  
 미국 94080 캘리포니아 사우스 샌프란시스코 오이  
 스터 포인트 블러바드 161 데날리 테라퓨틱스 인  
 크. (내)  
 주체로, 조이 유  
 미국 94080 캘리포니아 사우스 샌프란시스코 오이  
 스터 포인트 블러바드 161 데날리 테라퓨틱스 인  
 크. (내)
- (74) 대리인  
 특허법인 남앤남

전체 청구항 수 : 총 19 항

심사관 : 윤재욱

(54) 발명의 명칭 트랜스페린 수용체 유전자삽입 모델

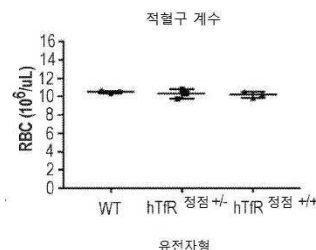
## (57) 요약

본 명세서의 요약서

일부 측면에서, 본 발명은 키메라 트랜스페린 수용체 (TfR) 폴리뉴클레오타이드 및 폴리펩티드를 제공한다. 또다  
 른 측면에서, 본 발명은 키메라 TfR 유전자삽입 동물 모델을 제공하고, 이 동물 모델을 이용하여, 혈액-뇌 장벽

(뒷면에 계속)

대표도 - 도1a



을 통과할 수 있는 치료제를 확인한다.

(52) CPC특허분류

**C07K 14/79** (2013.01)

**C12N 15/8509** (2013.01)

**G01N 33/68** (2013.01)

**A01K 2227/105** (2013.01)

**A01K 2267/03** (2013.01)

**C12N 2015/8527** (2013.01)

**G01N 2500/10** (2013.01)

(30) 우선권주장

62/543,658 2017년08월10일 미국(US)

62/543,559 2017년08월10일 미국(US)

62/583,314 2017년11월08일 미국(US)

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

동물의 고유 TfR 폴리펩티드의 트랜스페린 결합 부위와 서열 번호:1에 대하여 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 갖는 이중성 정점 도메인을 포함하며 혈액-뇌 장벽 (BBB) 수송을 매개할 수 있는 키메라 트랜스페린 수용체 (TfR) 폴리펩티드를 발현하며, 상기 동물이 마우스 또는 랫(rat)이며, 키메라 TfR 폴리펩티드는 마우스 또는 랫의 뇌에서 발현되는, 유전자삽입 동물.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, 상기 이중성 정점 도메인은:

- (a) 서열 번호:1에 대하여 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 갖거나;
- (b) 서열 번호:1에 대하여 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 갖거나;
- (c) 서열 번호:1의 아미노산 서열을 포함하거나; 또는
- (d) 서열 번호:7, 서열 번호:8, 또는 서열 번호:9의 아미노산 서열을 포함하는, 유전자삽입 동물.

#### 청구항 3

제1항에 있어서, 상기 키메라 TfR 폴리펩티드는

- (a) 서열 번호:3에 대하여 적어도 95% 아미노산 서열 동일성을 갖거나; 또는
- (b) 서열 번호: 3의 아미노산 서열을 포함하는, 유전자삽입 동물.

#### 청구항 4

제2항에 있어서, 상기 키메라 TfR 폴리펩티드는

- (a) 서열 번호:3에 대하여 적어도 95% 아미노산 서열 동일성을 갖거나; 또는
- (b) 서열 번호: 3의 아미노산 서열을 포함하는, 유전자삽입 동물.

#### 청구항 5

제1항에 있어서, 상기 동물은

- (a) 서열 번호:2에 대하여 적어도 70% 뉴클레오티드 서열 동일성을 갖거나;
- (b) 서열 번호:2에 대하여 적어도 95% 뉴클레오티드 서열 동일성을 갖거나; 또는
- (c) 서열 번호:2의 뉴클레오티드 서열을 포함하는,

키메라 TfR 폴리펩티드의 이중성 정점 도메인을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는, 유전자삽입 동물.

#### 청구항 6

제1항에 있어서, 상기 동물은 키메라 TfR 폴리펩티드를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하고, 상기 폴리뉴클레오티드는 마우스 TfR 유전자의 엑손 및 인트론을 포함하고, 마우스 TfR 유전자의 정점 도메인을 대체하기 위하여, 마우스 TfR 유전자의 4번째 엑손 다음에 위치하는 상기 이중성 정점 도메인을 인코딩하는 핵산 서열을 포함하는, 유전자삽입 동물.

#### 청구항 7

제2항에 있어서, 상기 동물은 키메라 TfR 폴리펩티드를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하고, 상기 폴리뉴클레오티드는 마우스 TfR 유전자의 엑손 및 인트론을 포함하고, 마우스 TfR 유전자의 정점 도메인을 대체하기

위하여, 마우스 TfR 유전자의 4번째 엑손 다음에 위치하는 상기 이중성 정점 도메인을 인코딩하는 핵산 서열을 포함하는, 유전자삽입 동물.

#### 청구항 8

제3항에 있어서, 상기 동물은 키메라 TfR 폴리펩티드를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하고, 상기 폴리뉴클레오티드는 마우스 TfR 유전자의 엑손 및 인트론을 포함하고, 마우스 TfR 유전자의 정점 도메인을 대체하기 위하여, 마우스 TfR 유전자의 4번째 엑손 다음에 위치하는 상기 이중성 정점 도메인을 인코딩하는 핵산 서열을 포함하는, 유전자삽입 동물.

#### 청구항 9

제4항에 있어서, 상기 동물은 키메라 TfR 폴리펩티드를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하고, 상기 폴리뉴클레오티드는 마우스 TfR 유전자의 엑손 및 인트론을 포함하고, 마우스 TfR 유전자의 정점 도메인을 대체하기 위하여, 마우스 TfR 유전자의 4번째 엑손 다음에 위치하는 상기 이중성 정점 도메인을 인코딩하는 핵산 서열을 포함하는, 유전자삽입 동물.

#### 청구항 10

제5항에 있어서, 상기 동물은 키메라 TfR 폴리펩티드를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하고, 상기 폴리뉴클레오티드는 마우스 TfR 유전자의 엑손 및 인트론을 포함하고, 마우스 TfR 유전자의 정점 도메인을 대체하기 위하여, 마우스 TfR 유전자의 4번째 엑손 다음에 위치하는 상기 이중성 정점 도메인을 인코딩하는 핵산 서열을 포함하는, 유전자삽입 동물.

#### 청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서,

- (a) 동물의 게놈은 키메라 TfR 폴리펩티드를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하고/하거나;
- (b) 키메라 TfR 폴리펩티드는 동물의 뇌에서 발현되고/되거나;
- (c) 동물이 대응하는 야생형 동물의 동일한 조직에서 TfR 발현 수준의 80% 내지 120%로 뇌, 간, 신장, 또는 폐 조직에서 키메라 TfR 폴리펩티드의 수준을 발현하고/하거나;
- (d) 동물이 대응하는 야생형 동물의 적혈구 세포 계수, 헤모글로빈 수준, 또는 헤마토크릿 수준의 80% 내지 120% 이내로 적혈구 세포 계수, 헤모글로빈 수준, 또는 헤마토크릿 수준을 포함하고/하거나; 및/또는
- (e) 유전자삽입 동물이 (i) 키메라 TfR 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산 서열에 대하여 동형접합체이거나, 또는 (ii) 키메라 TfR 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산 서열에 대하여 이형접합체인, 유전자삽입 동물.

#### 청구항 12

혈액-뇌 장벽을 통과하는 정점 도메인 결합 폴리펩티드(ADBP)를 스크리닝 또는 모니터링하는 방법에 있어서, 다음을 포함하는 방법:

- (a) ADBP를 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 따른 유전자삽입 동물에게 투여하는 단계; 및
- (b) 상기 유전자삽입 동물의 뇌에서 ADBP의 존재 또는 활성을 측정하는 단계.

#### 청구항 13

혈액-뇌 장벽을 통과하는 정점 도메인 결합 폴리펩티드(ADBP)를 스크리닝 또는 모니터링하는 방법에 있어서, 다음을 포함하는 방법:

- (a) ADBP를 제11항에 따른 유전자삽입 동물에게 투여하는 단계; 및
- (b) 상기 유전자삽입 동물의 뇌에서 ADBP의 존재 또는 활성을 측정하는 단계.

#### 청구항 14

제12항에 있어서, ADBP는 작동체 분자, 소분자, RNA, DNA, 폴리펩티드, 항체 또는 이의 항원-결합 단편에 결합

되는, 방법.

#### 청구항 15

제13항에 있어서, ADBP는 작동체 분자, 소분자, RNA, DNA, 폴리펩티드, 항체 또는 이의 항원-결합 단편에 결합되는, 방법.

#### 청구항 16

제14항에 있어서,

(a) 상기 측정 단계는:

(i) 동물의 뇌 또는 뇌 조직에 상기 작동체 분자에 결합하는 물질을 접촉시키고, 뇌 안에 존재하는 상기 작동체 분자의 수준을 결정하거나; 또는

(ii) 상기 작동체 분자의 약물력학(PD) 효과를 측정하는 것을 포함하며; 그리고/또는

(b) 상기 작동체 분자는 뇌 안에 표적에 결합하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편인, 방법.

#### 청구항 17

제15항에 있어서,

(a) 상기 측정 단계는:

(i) 동물의 뇌 또는 뇌 조직에 상기 작동체 분자에 결합하는 물질을 접촉시키고, 뇌 안에 존재하는 상기 작동체 분자의 수준을 결정하거나; 또는

(ii) 상기 작동체 분자의 약물력학(PD) 효과를 측정하는 것을 포함하며; 그리고/또는

(b) 상기 작동체 분자는 뇌 안에 표적에 결합하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편인, 방법.

#### 청구항 18

배아(embryo)로부터 생성된 유전자삽입 마우스 또는 랫(rat)에서 혈액-뇌 장벽(BBB) 수송을 매개할 수 있는 키메라 TfR 폴리펩티드를 발현시키는 유전자삽입 마우스 또는 랫의 단일 세포 배아로부터 유전자삽입 동물을 만드는 방법에 있어서, 상기 방법은 상기 마우스 또는 랫의 단일 세포 배아에서 상기 내인성 TfR 유전자의 정점 도메인을 서열 번호:1에 대하여 적어도 80% 동일성을 갖는 이중성 정점 도메인으로 대체시키며, 키메라 TfR 폴리펩티드는 배아로부터 생성된 유전자삽입 마우스 또는 랫의 뇌에서 발현되는 단계,

배아를 상기 배아와 동일한 동물 종의 모의 임신 암컷에게 옮기는 단계, 및

암컷에 의해 생산된 후손으로부터 유전자삽입 마우스 또는 랫을 선별하는 단계로서, 상기 마우스 또는 랫은 키메라 TfR 폴리펩티드를 발현하는, 단계를 포함하며;

(a) 상기 정점 도메인의 대체는 상동성 재조합에 의해 실행되며/되거나;

(b) 상기 방법은 Cas9 단백질, 적어도 하나의 sgRNA, 및 상기 이중성 정점 도메인을 인코딩하는 핵산 서열을 포함하는 공여 DNA를 접촉시키는 것을 포함하고, 상기 이중성 정점 도메인은 좌측 상동 아암(arm) 및 우측 상동 아암의 측면에 있고, 이로써 상기 이중성 정점 도메인 코딩 서열은 상기 배아의 게놈 안에서 상기 내인성 TfR 유전자의 정점 도메인을 대체하며/하거나;

(c) 상기 이중성 정점 도메인은 상기 배아 안에서의 발현에 코돈-최적화되며/되거나; 그리고/또는

(d) 상기 공여 DNA는 내인성 마우스 또는 랫 TfR 유전자의 4번째 엑손 다음에 위치하는, 방법.

#### 청구항 19

혈액-뇌 장벽(BBB) 수송을 매개할 수 있는 키메라 TfR 폴리펩티드를 발현시키는 유전자삽입 동물을 만드는 방법에 있어서, 상기 방법은

(a) 마우스 또는 랫(rat)의 배아 세포 안으로 서열 번호:1에 대하여 적어도 80% 동일성을 갖는 정점 도메인을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 도입시키는 단계로서, 상기 폴리뉴클레오티드는 내인성 TfR 정점 도메인을 인코

드하는 내인성 TfR 유전자의 영역으로 표적화시키고, 서열 번호:1에 대하여 적어도 80% 동일성을 갖는 정점 도메인을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드는 상기 내인성 정점 도메인을 인코딩하는 내인성 TfR 유전자의 영역을 대체하는, 단계, 그리고

(b) 상기 세포 또는 이의 후손을 유전자삽입 마우스 또는 랫으로 발달시키며, 키메라 TfR 폴리펩티드는 유전자삽입 마우스 또는 랫의 뇌에서 발현되는 단계를 포함하는 방법.

#### 청구항 20

삭제

#### 청구항 21

삭제

#### 청구항 22

삭제

#### 청구항 23

삭제

#### 청구항 24

삭제

#### 청구항 25

삭제

#### 청구항 26

삭제

#### 청구항 27

삭제

#### 청구항 28

삭제

#### 청구항 29

삭제

#### 청구항 30

삭제

#### 청구항 31

삭제

#### 청구항 32

삭제

#### 청구항 33

삭제

#### 청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

청구항 66



삭제

청구항 67

삭제

## 발명의 설명

## 기술 분야

## 배경 기술

### [0001] 발명의 배경

[0002] 혈액-뇌 장벽 (BBB)은 대부분의 거대 분자가 말초에서 뇌로 통과하는 것을 차단하고, 따라서 뇌 노출이 필요한 거대 분자 치료제의 사용을 제한시킨다. 트랜스페린 수용체 (TfR)는 BBB에서 고도로 발현되고, 수용체-매개된 트랜스사이토시스(transcytosis)를 통해 BBB를 가로 질러 이러한 치료제를 수송하는데 사용될 수 있다. 잠재적 치료제가 BBB를 가로 지르는 능력을 평가하는 것을 목적으로 마우스 TfR이 전장(full-length)의 인간 TfR cDNA로 대체된 마우스 모델이 이미 개발되었다. 그러나, 이들 유전자삽입 마우스는 건강에 좋지 않았으며, 비정상적으로 높은 TfR 발현과, 적혈구 수는 낮고, 혈청 철 농도가 높았다. Yu 등, *Science Trans. Med.*, 6(261):261ra154 (2014). 결과적으로, 이러한 기존 마우스 모델은 뇌 질환을 치료할 수 있는 치료제의 BBB를 가로 지르는 능력을 평가하는 도구로 사용하기에 적합하지 않다; 내인성(endogenous) TfR 발현 및 표현형을 보다 대표하는 모델이 요구된다.

### [0003] 발명의 간단한 요약

[0004] 한 측면에서, 본 명세서는 비-인간 포유동물 트랜스페린 결합 부위와 서열 번호:1에 대하여 최소한 80% 동일한 아미노산 서열을 갖는 이종성(heterologous) 정점(apical) 도메인을 포함하는 키메라 트랜스페린 수용체 (TfR) 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다. 일부 구체예에서, 상기 이종성 정점 도메인은 서열 번호:1의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 이종성 정점 도메인은 서열 번호:7, 서열 번호:8, 또는 서열 번호:9의 아미노산 서열을 포함한다.

[0005] 일부 구체예에서, 상기 비-인간 포유동물 트랜스페린 결합 부위는 고유의 (가령, TfR의 막경유 및/또는 세포내 도메인과 동일한 종) 트랜스페린 결합 부위, 가령, 고유의 마우스 트랜스페린 결합 부위이다. 일부 구체예에서, 상기 키메라 TfR 폴리펩티드는 서열 번호:3에 대하여 최소한 80% 아미노산 서열 동일성, 또는 최소한 85%, 90%, 또는 95% 동일성을 갖는다. 일부 구체예에서, 상기 키메라 TfR 폴리펩티드는 서열 번호:3의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 키메라 TfR 폴리펩티드의 이종성 정점 도메인을 인코딩하는 핵산 서열 영역은 서열 번호:2에 대하여 최소한 70% 뉴클레오티드 서열 동일성을 갖는다. 일부 구체예에서, 상기 키메라 TfR 폴리펩티드의 이종성 정점 도메인을 인코딩하는 핵산 서열 영역은 서열 번호:2의 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 키메라 TfR을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드는 마우스 트랜스페린 수용체 유전자의 엑손 및 인트론을 포함하고, 상기 이종성 정점 도메인을 인코딩하는 핵산 서열은 마우스 트랜스페린 수용체 유전자의 정점 결합 도메인을 대체하기 위하여, 마우스 트랜스페린 수용체 유전자의 4번째 엑손 다음에 위치한다.

[0006] 또다른 측면에서, 비-인간 포유동물 트랜스페린 결합 부위와 서열 번호:1에 대하여 최소한 80% 동일한 아미노산 서열을 갖는 이종성 정점 도메인을 포함하는 키메라 TfR 폴리펩티드가 본원에서 제공된다. 일부 구체예에서, 상기 키메라 TfR 폴리펩티드는 오직 고유의 정점 도메인만이 이종성 정점 도메인으로 대체된 고유의 TfR 폴리펩티드를 포함한다. 일부 구체예에서, 키메라 TfR 폴리펩티드는 고유의 TfR 결합 부위와 고유의 TfR 결합 부위에 대하여 이종성인 정점 결합 도메인을 포함하고, 가령, 이때 상기 정점 도메인에 추가하여, 최소한 하나의 도메인은 비-고유의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 이종성 정점 도메인은 서열 번호:1의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 이종성 정점 도메인은 서열 번호:7, 서열 번호:8, 또는 서열 번호:9의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 키메라 TfR은 서열 번호: 3에 대하여 최소한 80%, 90%, 95%, 또는 98% 아미노산 서열 동일성을 갖는다. 일부 구체예에서, 상기 키메라 TfR 폴리펩티드는 서열 번호:3의 아미노산 서열을 포함한다.

- [0007] 추가 측면에서, 상기에서 기술된 바와 같은 키메라 트랜스페린 수용체를 발현시키는 숙주 세포가 본원에서 제공된다. 일부 구체예에서, 숙주 세포는 상기 키메라 트랜스페린 수용체 폴리펩티드를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 숙주 세포는 마우스 세포이다. 일부 구체예에서, 상기 숙주 세포에 의해 발현되는 키메라 TfR 폴리펩티드는 (a) TfR 폴리펩티드의 내인성 정점 도메인을 대신하여 이중성 정점 도메인과 (b) 상기 내인성 트랜스페린 결합 부위를 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 이중성 정점 도메인은 서열 번호: 1에 대하여 최소한 80% 동일한 아미노산 서열을 갖는다. 일부 구체예에서, 상기 숙주 세포는 상기 내인성 TfR의 정점 도메인만이 이중성 정점 도메인으로 대체된, 키메라 TfR을 발현시킨다. 일부 구체예에서, 숙주 세포는 내인성 TfR 결합 부위와 이중성 정점 도메인을 포함하는 키메라 TfR을 발현시키고, *가령*, 이때 상기 정점 도메인에 추가하여, 최소한 하나의 도메인은 비-고유의 아미노산 서열이다. 일부 구체예에서, 상기 이중성 정점 도메인은 서열 번호:1의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구체예에서, 세포내 상기 이중성 정점 도메인을 인코딩하는 핵산 서열은 서열 번호:2의 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 숙주 세포는 마우스 세포다. 일부 구체예에서, 세포내 정점 도메인을 인코딩하는 핵산 서열은 마우스 트랜스페린 수용체 유전자의 4번째 엑손 다음에 위치한다. 일부 구체예에서, 상기 숙주 세포는 *생체외(ex vivo)*이다. 일부 구체예에서, 상기 숙주 세포는 배아 줄기 세포이다. 일부 구체예에서, 상기 숙주 세포의 계통은 고유의 TfR의 정점 도메인의 결손을 포함한다.
- [0008] 추가 측면에서, 본 명세서는 키메라 TfR 폴리펩티드를 발현시키는 비-인간 유전자삽입 동물을 제공하며, 이때 상기 키메라 TfR 폴리펩티드는 상기 비-인간 유전자삽입 동물에 대하여 내인성인 TfR 폴리펩티드의 정점 도메인을 대체한 이중성 정점 도메인을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 비-인간 유전자삽입 동물의 계통은 상기 비-인간 유전자삽입 동물의 내인성 TfR 정점 도메인을 대신한 이중성 정점 도메인을 인코딩하는 트랜스페린 수용체 유전자를 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 비-인간 유전자삽입 동물은 상기 비-인간 유전자삽입 동물의 TfR의 고유 도메인을 대신한 이중성 정점 도메인과 고유의 트랜스페린 결합 부위를 포함하는, 키메라 TfR을 발현시킨다. 일부 구체예에서, 비-인간 유전자삽입 동물은 키메라 트랜스페린 수용체를 발현시키는데, 이때 내인성 트랜스페린 수용체의 정점 도메인만이 이중성 정점 도메인으로 대체된다. 일부 구체예에서, 비-인간 유전자삽입 동물은 내인성 TfR 결합 부위와 상기 내인성 TfR 결합 부위에 대하여 이중성인 정점 결합 도메인을 포함하는 키메라 TfR 폴리펩티드를 발현시키는데, *가령*, 이때 상기 정점 도메인에 추가하여, 최소한 하나의 도메인은 비-고유의 아미노산 서열이다. 일부 구체예에서, 상기 비-인간 유전자삽입 동물은 상기에서 기술된 바의 숙주 세포를 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 유전자삽입 동물은 설치류이다. 일부 구체예에서, 상기 유전자삽입 동물은 마우스 또는 랫이다. 일부 구체예에서, 상기 유전자삽입 동물은 상기 키메라 TfR에 대하여 동형접합체(homozygous)이다. 일부 구체예에서, 상기 유전자삽입 동물은 상기 키메라 TfR에 대하여 이형접합체(heterozygous)이다.
- [0009] 또다른 측면에서, 키메라 TfR에 결합하는 정점 도메인 결합 폴리펩티드 (ADBP) 를 스크리닝하는 방법이 본원에서 제공되는데, 상기 방법은 후보 ADBP에 전술한 바와 같은 키메라 TfR 폴리펩티드를 접촉시키고; 그리고 상기 키메라 TfR 폴리펩티드에 결합하는 상기 후보 ADBP의 양을 측정하는 것을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 후보 ADBP에 상기 키메라 TfR 폴리펩티드를 접촉시키는 단계는 이 ADBP에 상기 키메라 TfR 폴리펩티드를 발현시키는 숙주 세포를 접촉시키는 것을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 후보 ADBP에 상기 키메라 TfR 폴리펩티드를 접촉시키는 단계는 이 ADBP에 상기 키메라 TfR 폴리펩티드를 발현시키는 내피(endothelium)를 접촉시키는 것을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 내피는 혈액-뇌 장벽 내피이다. 일부 구체예에서, 상기 키메라 TfR 폴리펩티드에 결합하는 상기 후보 ADBP의 양은 면역분석(immunoassay)에 의해 측정된다. 일부 구체예에서, 상기 키메라 TfR 폴리펩티드에 결합하는 상기 후보 ADBP의 양은 표면 플라즈몬 공명(surface plasmon resonance)에 의해 측정된다. 일부 구체예에서, 이때 접촉 단계는 *생체내(in vivo)*에서 실행된다. 일부 구체예에서 상기 후보 ADBP는 작동체(effector) 분자에 결합된다. 일부 구체예에서, 상기 작동체 분자는 소(small)분자, RNA, DNA, 또는 폴리펩티드이다. 일부 구체예에서, 상기 작동체 분자는 폴리펩티드이다. 일부 구체예에서, 상기 폴리펩티드는 항체 또는 이의 항원-결합 단편이다.
- [0010] 여전히 또다른 측면에서, 상기 키메라 TfR 폴리펩티드에 결합하는 ADBP의 양을 측정하는 방법이 본원에서 제공되는데, 상기 방법은 이 ADBP에 상기 기술된 키메라 TfR 폴리펩티드를 접촉시키고; 그리고 상기 키메라 TfR 폴리펩티드에 결합된 ADBP의 양을 면역분석 또는 표면 플라즈몬 공명으로 측정하는 것을 포함한다.
- [0011] 여전히 또다른 측면에서, 혈액-뇌 장벽을 통과하는 ADBP를 스크리닝하는 방법이 본원에서 제공되는데, 상기 방법은 다음을 포함한다: (a) 전술한 서열 번호:1에 대하여 최소한 80% 아미노산 서열 동일성을 갖는 정점 도메인에 결합하는 ADBP를 비-인간 유전자삽입 동물에게 투여하고; 그리고 (b) 상기 비-인간 유전자삽입 동물의 뇌에

서 이 ADBP의 존재 또는 활성을 측정한다. 일부 구체예에서, 상기 ADBP는 작동체 분자에 결합된다. 일부 구체예에서, 상기 작동체 분자는 소분자, RNA, DNA, 또는 폴리펩티드이다. 일부 구체예에서, 상기 폴리펩티드는 항체 또는 이의 항원-결합 단편이다. 일부 구체예에서, 상기 측정 단계는 정량적 면역분석을 실행하는 것을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 측정 단계는 이 동물의 뇌 또는 뇌 조직에 상기 작동체 분자에 결합하는 물질을 접촉시키고, 이 뇌 안에 상기 작동체 분자의 수준을 측정하는 것을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 측정 단계는 상기 작동체 분자의 약물력학(PD) 효과를 측정하는 것을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 작동체 분자는 항-BACE1 항체 또는 이의 항원-결합 단편이며, 상기 측정 단계는 이 뇌 안에 가용성 A베타40 수준을 측정하는 것을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 작동체 분자는 뇌 안에 표적에 결합하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편이다.

[0012] 또다른 측면에서, 혈액-뇌 장벽을 통과하는 ADBP를 모니터링하는 방법이 본원에서 제공되는데, 상기 방법은 다음을 포함한다: (a) 전술한 서열 번호:1에 대하여 최소한 80% 아미노산 서열 동일성을 갖는 정점 도메인에 결합하는 ADBP를 비-인간 유전자삽입 동물에게 투여하고; 그리고 (b) 상기 비-인간 유전자삽입 동물의 뇌에서 이 ADBP의 존재 또는 활성을 측정한다. 일부 구체예에서, 상기 ADBP는 작동체 분자에 결합된다. 일부 구체예에서, 상기 작동체 분자는 소분자, RNA, DNA, 또는 폴리펩티드이다. 일부 구체예에서, 상기 폴리펩티드는 항체 또는 이의 항원-결합 단편이다. 일부 구체예에서, 상기 측정 단계는 정량적 면역분석을 실행하는 것을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 측정 단계는 상기 작동체 분자에 결합하는 물질을 접촉시키고, 이 뇌 안에 존재하는 상기 작동체 분자의 수준을 측정하는 것을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 작동체 분자는 뇌 안에 표적에 결합하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편이다. 일부 구체예에서, 상기 측정 단계는 이 표적에 결합하는 상기 작동체 분자의 PD 효과를 측정하는 것을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 작동체 분자는 항-BACE1 항체 또는 이의 항원-결합 단편이며, 상기 측정 단계는 이 뇌 안에 가용성 A베타40 수준을 측정하는 것을 포함한다.

[0013] 여전히 또다른 측면에서, 키메라 트랜스페린 수용체 (TfR) 폴리펩티드를 발현시키는 유전자삽입 비-인간 단일 세포 배아(embryo)를 만드는 방법이 본원에서 제공되는데, 상기 방법은 상기 비-인간 단일 세포 배아에서 상기 내인성 TfR의 정점 도메인을 서열 번호:1에 대하여 최소한 80% 동일성을 갖는 이종성 정점 도메인으로 대체시키는 것을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 정점 도메인의 대체는 상동성(homologous) 재조합에 의해 실행된다. 일부 구체예에서, 상기 방법은 Cas9 단백질, 최소한 하나의 단일 가이드(guide) RNA (sgRNA), 및 상기 이종성 정점 도메인을 인코딩하는 핵산 서열을 포함하는 공여 DNA를 접촉시키는 것을 포함하고, 이때 상기 이종성 정점 도메인은 좌측 상동 아암(homology arm) 및 우측 상동 아암의 측면에 있고, 이로써 상기 이종성 정점 도메인 코딩 서열은 상기 비-인간 단일 세포 배아의 게놈 안에서 상기 내인성 TfR의 정점 도메인을 대체한다. 일부 구체예에서, 상기 이종성 정점 도메인은 상기 비-인간 단일 세포 배아 안에서 발현에 코돈-최적화된다(codon-optimized). 일부 구체예에서 상기 비-인간 단일 세포 배아는 마우스 배아이다. 일부 구체예에서, 상기 공여 DNA는 마우스 트랜스페린 수용체 유전자의 4번째 엑손 다음에 위치한다.

[0014] 여전히 또다른 측면에서, 비-인간 유전자삽입 동물을 만드는 방법이 본원에서 제공되는데, (a) 전술한 상기 유전자삽입 비-인간 단일 세포 배아를 상기 비-인간 단일 세포 배아와 동일한 동물 종의 모의(pseudo) 임신한 암컷으로 옮기고, 그리고 (b) 이 암컷에 의해 생산된 후손으로부터 비-인간 유전자삽입 동물을 선별하는 것을 포함하며, 이때 상기 비-인간 유전자삽입 동물은 키메라 트랜스페린 수용체 (TfR) 폴리펩티드를 포함하고, 이때 내인성 TfR의 정점 도메인은 서열 번호:1에 대하여 최소한 80% 동일성을 갖는 이종성 정점 도메인으로 대체되었다.

[0015] 여전히 또다른 측면에서, 키메라 트랜스페린 수용체 (TfR) 폴리펩티드를 발현시키는 비-인간 유전자삽입 동물을 만드는 방법이 본원에서 제공되는데, 상기 방법은 (a) 이 동물의 배아 세포 안으로 서열 번호:1에 대하여 최소한 80% 동일성을 갖는 정점 도메인을 인코딩하는 동물 폴리뉴클레오티드를 도입시키고, 이때 상기 폴리뉴클레오티드는 내인성 TfR 정점 도메인을 인코딩하는 내인성 TfR 유전자의 영역으로 표적화시키고, 이때 서열 번호:1에 대하여 최소한 80% 동일성을 갖는 정점 도메인을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드는 상기 내인성 정점 도메인을 인코딩하는 내인성 TfR 유전자의 영역을 대체하고, 그리고 (b) 비-인간 유전자삽입 동물 안으로 상기 세포 또는 이의 후손을 발달시키는 것을 포함한다.

[0016] 전술한 전반적인 설명 및 다음의 상세한 설명은 오직 예시적이며 설명을 위함이고, 청구되는 바와 같이 본 발명을 추가 설명하기 위하여 의도된 것이다. 다른 목적, 장점 및 신규 한 특징은 다음의 본 발명의 상세한 설명으로부터 당업자에게 명백할 것이다.

## 도면의 간단한 설명

[0017] 도 1a-1c는 야생형, huTfR<sup>정점+/-</sup>, 및 huTfR<sup>정점+/+</sup> 마우스의 온혈구 계산(complete blood count) 분석 결과를 보여준다. 전체 적혈구 세포, 헤모글로빈, 또는 헤마토크릿에서 유전자형-특이적 차이는 관찰되지 않았다. 도면 그래프는 평균  $\pm$  SD를 나타내고, 한 집단에서 n=3이다.

도 2a-2b는 huTfR<sup>정점+/-</sup> 마우스에서 전신으로 투여된 항-TfR의 뇌 혈관 국소화(localization)를 보여준다. 5 mg/kg의 인간-정점-특이적 항-TfR은 C57B16 야생형 또는 키메라 huTfR<sup>정점+/-</sup> 이형접합체 마우스에게 정맥으로 투여되었다. 1시간 후, 마우스는 PBS로 관주되었고, 항체 분포에 대하여 뇌를 착색시켰다. 대표적인 이미지는 huTfR<sup>정점+/-</sup> 이형접합체에서 전신 주사된 항-TfR (정점 도메인-특이적)의 눈에 띄는 혈관 국소화를 나타내지만, 야생형 마우스에서는 그렇지 않다. 이는 키메라 huTfR 단백질이 BBB에서 발현됨을 나타낸다.

도 3a-3b는 huTfR<sup>정점+/+</sup> 마우스에서 전신으로 투여된 항-TfR/BACE1의 뇌 실질조직(parenchymal) 분포를 보여준다. huTfR 마우스로부터의 피질 뇌 섹션의 대표적인 이미지에서 정맥 주사된 항-TfR/BACE1(50 mg/kg, 투여-후 24시간)의 넓은 실질조직 분포를 보여준다. 대조적으로, 항-BACE1을 주사한 huTfR<sup>정점+/+</sup> huTfR 마우스의 뇌 섹션에서 뚜렷한 착색이 관찰되지 않았다.

도 4a-4d는 huTfR<sup>정점+/+</sup> 마우스에서 이중특이적 항체의 투여 후, 항-TfR/BACE1 이중특이적 항체의 뇌 취입(uptake) 및 A-베타 감소를 보여준다. 도 4a는 이 마우스에게 50 mg/kg의 항-TfR/BACE1 또는 항-BACE1을 투여한 후 24시간에 huTfR<sup>정점+/+</sup> 마우스에서 혈장 huIgG1 농도를 보여준다. 이들 결과는 항-TfR/BACE1의 TfR-매개된 제거(clearance)는 항-BACE1의 것에 비해 향상되었음을 보여주었다. 도 4b는 상기 항체의 전신 투여 후, 항-TfR/BACE1의 평균 뇌 취입을 보여준다. 이 결과는 마우스 뇌에서의 항-BACE1의 것과 비교하여, 항-TfR/BACE1의 축적이 약 28 배 증가를 보여준다. 도 4c는 항-BACE1로 처리된 마우스와 비교하였을 때, 항-TfR/BACE1로 처리된 마우스에서 뇌 안의 A-베타가 49% 감소되었음을 보여준다. 도 4d는 처리안된 야생형 마우스와 비교하였을 때, 항-BACE1 또는 항-TfR/BACE1로 처리된 huTfR<sup>정점+/+</sup> 마우스에서 혈장 A-베타 수준의 감소를 보여준다. 모든 집단은 평균  $\pm$  SD로 나타낸다, 한 집단에서 n=8임 (처리안된 야생형 마우스의 경우 n=2임).

도 5a-5d는 야생형 마우스와 비교하였을 때, huTfR<sup>정점+/+</sup> 마우스의 다양한 조직에서 TfR의 발현을 보여준다; 뇌 (도 5a), 간 (도 5b), 신장 (도 5c), 및 폐 (도 5d)에서 전체 TfR 발현에서의 두드러진 차이는 없다. 모든 집단은 평균  $\pm$  SD로 나타낸다, 한 집단에서 n=4-8임.

## 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0018] 발명의 상세한 설명

[0019] 우리는 비-인간 (가령, 마우스) 포유동물 트랜스페린 결합 부위 및 트랜스페린 결합 부위를 보유하는 도메인에 대하여 이중성인 정점 도메인을 함유하는 트랜스페린 수용체의 키메라 형태를 개발하였다. 이들 키메라 수용체는 유전자삽입 동물에서 발현될 수 있는데, 특히 트랜스페린 결합 부위가 유전자삽입 동물 종으로부터 유래되고, 정점 도메인은 영장류(가령, 인간 또는 원숭이)로부터 유래된다. 본 발명은 따라서 비-인간 포유동물 트랜스페린 결합 부위와 서열 번호:1에 대하여 최소한 80% 동일성을 갖는 정점 도메인을 포함하는 키메라 트랜스페린 수용체를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다. 본 발명은 이러한 키메라 TfRs를 발현시키는 비-인간, 예를 들면, 비-영장류, 유전자삽입 동물 및 인간 트랜스페린 수용체 (huTfR) 생체내 결합에 의해 BBB를 관통할 수 있는 폴리펩티드를 스크리닝하는데 상기 비-인간 유전자삽입 동물을 이용하는 용도를 또한 제공한다. 일부 구체예에서, 상기 비-인간 유전자삽입 동물은 고유의 트랜스페린 수용체 (이를 테면 마우스 트랜스페린 수용체 (mTfR))를 보유하며, 이때 상기 정점 도메인은 이중상동성(orthologous) 서열 번호:1에 대하여 최소한 80% 동일성을 갖는 정점 도메인으로 대체되며, 이로 인하여 고유의 트랜스페린 결합 부위와 무손상(intact) 트랜스페린 수용체를 인코딩하는 서열의 대부분, 가령, 최소한 70%, 또는 최소한 75%는 남겨진다. 따라서 이 비-인간 유전자삽입 동물은 적절한 철 항상성(homeostasis) 뿐만 아니라 트랜스페린에 결합하고, 이를 운반하는 능력을 비롯하여, 상기 비-인간 동물의 내인성 트랜스페린 수용체의 트랜스페린-결합 기능성을 최대 유지한다. 결과적으로, 유전자삽입 동물은 건강하며, 뇌 질환 치료를 위한 치료제의 발견 및 개발에 사용하기에 적합하다.

[0020] 용어

[0021] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 단수 형태 "a", "an" 및 "the"는 내용에서 명확하게 달리 지시하지 않는 한,



복수의 지시 대상을 포함한다. 따라서, 예를 들면, "항체"에 대한 언급은 임의선택적으로 2 개 이상의 이러한 분자의 조합 등을 포함한다.

- [0022] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "약(about)" 및 "대략적으로(approximately)"은 숫자 값 또는 범위로 특정된 양을 변경하는데 사용될 때, 당업자에게 수치 값과 수치 뿐만 아니라 이 값으로부터 합리적으로 편차, 예를 들면,  $\pm 20\%$ ,  $\pm 10\%$  또는  $\pm 5\%$ 의 편차는 인용된 값의 의도된 의미 안에 있음을 나타낸다.
- [0023] “트랜스페린 수용체(transferrin receptor)”는 본원에서 사용될 때, 트랜스페린 수용체 단백질 1을 지칭한다. 인간 트랜스페린 수용체 1 폴리펩티드 서열은 서열 번호:6에서 제시된다. 다른 종의 트랜스페린 수용체 단백질 1 서열 또한 공지되어 있다(가령, 침팬지, 수탁 번호 XP\_003310238.1; 붉은털원숭이, NP\_001244232.1; 개, NP\_001003111.1; 소, NP\_001193506.1; 마우스, NP\_035768.1; 랫, NP\_073203.1; 그리고 닭, NP\_990587.1). 용어 “트랜스페린 수용체”는 트랜스페린 수용체 단백질 1 염색체 좌(locus)에서 유전자에 인코딩된 예시적인 기준 서열, 가령, 인간 서열의 대립형질(allelic) 변이체를 포괄한다. 전장의 트랜스페린 수용체 단백질은 짧은 N-말단 세포내 영역, 막경유 영역, 및 거대 세포의 도메인을 포함한다. 상기 세포의 도메인은 3개의 도메인: 프로테아제-유사 도메인, 나선(helical) 도메인, 및 정점 도메인에 의해 특징화된다.
- [0024] 용어 “키메라 TfR”은 본원에서 사용될 때, 이중성 트랜스페린 수용체의 대응하는 정점 도메인 영역으로 대체된 정점 도메인의 전부 또는 하위영역을 갖는 트랜스페린 수용체 단백질을 지칭한다.
- [0025] “트랜스페린 결합 부위”는 본원에서 사용될 때, 트랜스페린, 가령, 철-결합된 트랜스페린과 상기 수용체에 결합하는 것을 증개하는 TfR 단백질의 나선의 프로테아제-유사 도메인 안 영역을 지칭한다. 상기 트랜스페린 결합 부위는 상기 정점 도메인으로부터 원위에 있다.
- [0026] “비-인간 포유동물 트랜스페린 결합 부위”는 본원에서 사용될 때, 비-인간 포유류의 고유의 트랜스페린 수용체의 트랜스페린 결합 부위, 또는 고유의 비-인간 포유동물 트랜스페린에 결합할 수 있는 이의 기능적 유도체의 서열을 말한다. 일부 구체예에서, 상기 비-인간 포유동물 트랜스페린 결합 부위는 상기 비-인간 포유류의 고유의 트랜스페린 수용체의 트랜스페린 결합 부위에 대하여 최소한 80%, 최소한 90%, 최소한 95%, 또는 최소한 98% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 상기 비-인간 포유류의 예는 마우스, 랫, 토끼, 소, 양, 개, 고양이, 말, 돼지, 비인간 영장류 및 이와 유사한 것 등을 포함한다.
- [0027] 본원에서 사용될 때, “huTfR<sup>정점+/+</sup> 마우스”는 유전자삽입 마우스를 지칭하는데, 이때 상기 마우스 트랜스페린 수용체의 정점 도메인은 인간 트랜스페린 수용체의 정점 도메인으로 대체되었으며, 상기 유전자삽입 마우스는 삽입유전자(transgene)에 대하여 동형접합체이다.
- [0028] 본원에서 사용될 때, “huTfR<sup>정점+/-</sup> 마우스”는 유전자삽입 마우스를 지칭하는데, 이때 상기 마우스 트랜스페린 수용체의 정점 도메인은 인간 트랜스페린 수용체의 정점 도메인으로 대체되었으며, 상기 유전자삽입 마우스는 삽입유전자에 대하여 이형접합체이다.
- [0029] 본원에서 사용될 때, 트랜스페린 수용체 또는 이의 도메인에 있어서, 용어 “야생형(wild-type)”, “고유의(native)”, 및 “자연 발생적(naturally occurring)”이란 자연계에서 발생하는 서열을 갖는 트랜스페린 수용체 또는 이의 도메인을 본원 명세서에서 지칭되는데 이용된다.
- [0030] “내인성(endogenous)” 트랜스페린 수용체 또는 이의 도메인이란 본원에서 사용될 때, 세포 또는 비-인간 동물에서 가령, 상기 세포 또는 동물에 대하여 유전적 변형(modification) 없이, 자연적으로 발생하는 트랜스페린 수용체를 지칭한다.
- [0031] 본원에서 사용될 때, 트랜스페린 수용체의 도메인, 가령, 상기 정점 도메인에 대하여 용어 “이종성(heterologous)”이란, 트랜스페린 수용체의 고유의 맥락 외부에서 발현된 이의 수용체를 지칭하는데, 가령, 자연 상태에서 전형적으로 트랜스페린 수용체에 근접한 트랜스페린 수용체 서열, 또는 전형적으로 근접해 있지 않은 인접(또는 연속된) 트랜스페린 수용체 서열과는 구별된다.
- [0032] 용어 “아미노산”이란 자연 발생적 아미노산 및 합성 아미노산, 뿐만아니라 이 자연 발생적 아미노산과 유사한 방식으로 기능을 하는 아미노산 유사체 및 아미노산 모방체(mimetics)를 지칭한다.
- [0033] 자연-발생적 아미노산은 유전자 코드, 뿐만아니라 나중 변형된, 가령, 히드록시프롤린, γ 카르복시글루타메이트, 및 O-포스포세린과 같이 변형된 아미노산에 의해 인코딩된 것들이다. 자연-발생적 α-

아미노산에는 다음을 포함하나, 이에 국한되지 않는다: 알라닌 (Ala), 시스테인 (Cys), 아스파르트산 (Asp), 글루타민산 (Glu), 페닐알라닌 (Phe), 글리신 (Gly), 히스티딘 (His), 이소류신 (Ile), 아르기닌 (Arg), 리신 (Lys), 류신 (Leu), 메티오닌 (Met), 아스파라긴 (Asn), 프롤린 (Pro), 글루타민 (Gln), 세린 (Ser), 트레오닌 (Thr), 발린(Val), 트립토판 (Trp), 티로신 (Tyr), 및 이의 조합. 자연-발생적  $\alpha$ -아미노산의 입체이성체로는 다음을 포함하나, 이에 국한되지 않는다: D-알라닌 (D-Ala), D-시스테인 (D-Cys), D-아스파르트산 (D-Asp), D-글루타민산 (D-Glu), D-페닐알라닌 (D-Phe), D-히스티딘 (D-His), D-이소류신 (D-Ile), D-아르기닌 (D-Arg), D-리신 (D-Lys), D-류신 (D-Leu), D-메티오닌 (D-Met), D-아스파라긴 (D-Asn), D-프롤린 (D-Pro), D-글루타민 (D-Gln), D-세린 (D-Ser), D-트레오닌 (D-Thr), D-발린(D-Val), D-트립토판 (D-Trp), D-티로신 (D-Tyr), 및 이의 조합.

[0034] 아미노산은 IUPAC-IUB Biochemical Nomenclature Commission에서 권장하는 통상적으로 알려진 3문자 기호 또는 1-문자 기호에 의해 본 명세서에서 언급될 수 있다.

[0035] 용어 "폴리펩티드", "펩티드" 및 "단백질"은 아미노산 잔기들의 중합체를 포함하는 것으로 본 명세서에서 호환된다. 이 용어는 하나 또는 그 이상의 아미노산 잔기들이 대응하는 자연적으로 발생하는 아미노산의 유사체 또는 인공적인 모방체인 아미노산 중합체에 적용되고, 뿐만 아니라 자연적으로 발생하는 아미노산 중합체 및 비-자연적으로 발생하는 아미노산 중합체에도 적용된다. 아미노산 중합체는 전적으로 L-아미노산, 전적으로 D-아미노산, 또는 L 아미노산과 D 아미노산의 혼합물을 포함할 수 있다.

[0036] 용어 “보존적 변형된 변이체”란 유사한 특징을 갖는 것으로 분류될 수 있는, 또다른 아미노산으로 아미노산을 치환시키는 변형을 지칭한다. 이러한 방식에서 특정된 보존적 아미노산 집단의 부유 예로는 다음을 포함할 수 있다: “하전된/극성 집단”은 Glu (글루타민산 또는 E), Asp (아스파르트산 또는 D), Asn (아스파라긴 또는 N), Gln (글루타민 또는 Q), Lys (리신 또는 K), Arg (아르기닌 또는 R), 및 His (히스티딘 또는 H)을 포함하고; “방향족 집단”은 Phe (페닐알라닌 또는 F), Tyr (티로신 또는 Y), Trp (트립토판 또는 W), 및 (히스티딘 또는 H)을 포함하고; 그리고 “지방족 집단”은 Gly (글리신 또는 G), Ala (알라닌 또는 A), Val (발린 또는 V), Leu (류신 또는 L), Ile (이소류신 또는 I), Met (메티오닌 또는 M), Ser (세린 또는 S), Thr (트레오닌 또는 T), 및 Cys (시스테인 또는 C)을 포함한다. 각 집단에서, 하위집단들 또한 식별될 수 있다. 예를 들면, 하전된 또는 극성 아미노산의 집단은 다음을 포함하는 하위-집단으로 더 분류될 수 있다: “양으로-하전된 하위-집단”은 Lys, Arg 및 His을 포함하고; “음으로-하전된 하위-집단”은 Glu 및 Asp을 포함하고; 그리고 “극성 하위-집단”은 Asn 및 Gln을 포함한다. 또다른 실시예에서, 방향족 또는 고리 집단은 다음을 포함하는 하위-집단으로 더 분류될 수 있다: “질소 고리 하위-집단”은 Pro, His 및 Trp을 포함하고; 그리고 “페닐 하위-집단”은 Phe 및 Tyr을 포함한다. 또다른 추가 실시예에서, 지방족 집단은 다음을 포함하는 하위-집단으로 더 분류될 수 있다: 가령, “지방족 비-극성 하위-집단”은 Val, Leu, Gly, 및 Ala을 포함하고; 그리고 “지방족 약간의-극성 하위-집단”은 Met, Ser, Thr, 및 Cys을 포함한다. 보존적 돌연변이의 범주의 예로는 상기 하위-집단 안의 아미노산의 아미노산 치환, 이를 테면, 다음을 포함하나, 이에 국한되지 않는다: Arg을 대신한 Lys 또는 이의 역, 이때 양전하는 유지될 수 있다; Asp을 대신한 Glu 또는 이의 역, 이때 음전하는 유지될 수 있다; Thr을 대신한 Ser 또는 이의 역, 유리(free)-OH는 유지될 수 있다; 그리고 Asn을 대신한 Gln 또는 이의 역, 유리-NH<sub>2</sub>는 유지될 수 있다. 일부 구체예들에서, 자연 발생적 소수성 아미노산을 대신하여 활성 부위에서 가령, 소수성을 보존하기 위하여 소수성 아미노산으로 대체된다.

[0037] 2개 또는 그 이상 폴리펩티드 서열에서 용어 “동일한(identical)” 또는 “동일성(identity)” 백분율이란 비교창에서 최대 대응을 위하여 비교 및 정렬될 때, 또는 서열 비교 알고리즘을 이용하여 측정하였을 때, 또는 수작업 배열 및 시각적 관찰에 의해 측정하였을 때, 명시된 영역에서 동일한, 2개 또는 그 이상 폴리펩티드 서열에서 아미노산 잔기가 동일하거나, 또는 명시된 백분율, 가령, 최소한 60% 동일성, 최소한 65%, 최소한 70%, 최소한 75%, 최소한 80%, 최소한 85%, 최소한 90%, 또는 최소한 95% 또는 더 큰 백분율의 2개 또는 그 이상 서열 또는 하위 서열을 말한다.

[0038] 폴리펩티드 서열 비교를 위하여, 일반적으로 하나의 서열이 참고 서열로 작용하여, 후보 서열들과 비교된다. 정렬은 당업자에게 이용가능한 다양한 방법, 예를 들어, 시각적 정렬, 또는 최대 정렬을 달성하기 위해 공지된 알고리즘을 사용하여 공개적으로 이용가능한 소프트웨어를 사용하여 수행될 수 있다. 이러한 프로그램은 BLAST 프로그램, ALIGN, ALIGN-2 (Genentech, South San Francisco, Calif.) 또는 Megalign (DNASTAR)을 포함한다. 최대 정렬을 달성하기 위해, 정렬에 사용된 매개변수는 당업자에 의해 결정될 수 있다. 출원의 목적을 위한 폴리펩티드 서열의 서열 비교를 위해, 2 개의 단백질 서열을 디폴트 매개변수와 함께, 정렬시키기 위한 BLASTP

알고리즘 표준 단백질 BLAST가 사용된다.

- [0039] 용어 "포함하는(comprising)"이란 조성물 및 방법이 언급된 요소를 포함하지만, 다른 것을 배제하지 않음을 의미한다. 조성물 및 방법을 한정하는데 사용되는 경우, "본질적으로 ~로 구성된다(consisting essentially of)"란 명시된 재료 또는 단계, 및 청구된 발명의 기본적인이고 신규한 특성(들)에 실질적으로 영향을 미치지 않는 재료 또는 단계를 지칭한다. "구성되는(Consisting of~)"이란 미량 이상의 다른 성분 및 언급된 실질적인 방법 단계를 배제하는 것을 의미한다. 이들 이행 용어(transition terms) 각각에 의해 정의된 실시 예는 본 발명의 범위 내에 있다.
- [0040] 용어 "폴리뉴클레오타이드", "핵산", 및 "올리고뉴클레오타이드"는 데옥시리보뉴클레오타이드 또는 리보뉴클레오타이드인 간에 임의의 길이의 뉴클레오타이드의 폴리머 형태 또는 이의 유사체를 지칭하는데 호환적으로 이용된다. 폴리뉴클레오타이드는 임의의 3 차원 구조를 가질 수 있고, 공지되거나 알려지지 않은 임의의 기능을 수행할 수 있다. 다음은 폴리뉴클레오타이드의 비-제한적인 예이다: 유전자 또는 유전자 단편 (예를 들면, 프로브, 프라이머, EST 또는 SAGE 태그), 엑손, 인트론, 메신저 RNA (mRNA), 전달 RNA, 리보솜 RNA, 리보자임, cDNA, 재조합 폴리뉴클레오타이드, 분지형 폴리뉴클레오타이드, 플라스미드, 벡터, 임의의 서열의 단리된 DNA, 임의의 서열의 단리된 RNA, 핵산 프로브 및 프라이머. 폴리뉴클레오타이드는 변형된 뉴클레오타이드, 이를 테면, 메틸화된 뉴클레오타이드와 뉴클레오타이드의 유사체를 포함할 수 있다. 뉴클레오타이드 구조에 대한 변형이 존재한다면, 이는 폴리 뉴클레오타이드의 합체(assembly) 전 또는 후에 부여될 수 있다. 뉴클레오타이드의 서열은 비-뉴클레오타이드 성분에 의해 중단될 수 있다. 폴리뉴클레오타이드는 예를 들어 표지(labeling) 성분과의 접합에 의해 중합 후에 추가로 변형될 수 있다. 이 용어는 또한 이중 가닥 및 단일 가닥 분자 모두를 지칭한다. 달리 특정되거나 요구되지 않는 한, 본 발명의 임의의 구체예에서 폴리뉴클레오타이드는 이중 가닥 형태와 이중 표준 가닥 형태를 구성하는 것으로 공지된 또는 예측되는 2개의 상보적인 단일 가닥 형태를 각각 포괄한다.
- [0041] 폴리뉴클레오타이드는 4 개의 뉴클레오타이드 염기: 아데닌 (A); 시토신 (C); 구아닌 (G); 티민 (T); 그리고 상기 폴리뉴클레오타이드가 RNA일 때, 우라실 (U)로 구성된다. 따라서, 용어 "폴리뉴클레오타이드 서열"은 폴리뉴클레오타이드 분자의 알파벳을 나타낸다.
- [0042] 용어 "녹-인(knock-in)"이란 예정된 유전자 좌에서 DNA 서열 정보의 일대일 치환, 또는 유전자좌 내에서 발견되지 않은 서열 정보의 삽입을 지칭한다. 당업자는 게놈의 특정 유전자 좌에서 표적 폴리 뉴클레오타이드 서열을 녹-인을 위해, 다양한 유전자 접근법, 예를 들어 CRISPR/Cas9 시스템, ZFN, TALEN, 트랜스포존-매개 삽입을 사용하는 방법을 쉽게 인지할 것이다.
- [0043] "혈액-뇌 장벽(blood-brain barrier)" 또는 "BBB"라는 용어는 뇌 세포 외액으로부터 중추 신경계 (CNS)로의 순환 혈액을 구별시키는 선택성이 매우 큰 반투과성 막 장벽을 지칭한다. 이 혈액-뇌 장벽은 단단한 접합(junctions)에 의해 연결된 뇌 내피 세포에 의해 형성된다.
- [0044] 트랜스페린 수용체
- [0045] 트랜스페린 수용체는 리간드-점유된 트랜스페린 수용체의 수용체-매개된 엔도사이토시스를 통하여 철의 세포 취입을 매개한다. TfR은 이를 테면, 비-인간 영장류 및 설치류와 같은 인간 및 비인간 종 및 인간 모두에 존재한다. 상기 고유의 인간 TfR (huTfR), Uniprot P02786, 서열 번호:6는 동종이량체 유형 II 막경유 단백질이며; 이는 세포질 도메인, 막경유 영역, 그리고 세포의 도메인을 보유하며, 이는 정점 도메인과 트랜스페린-결합 도메인을 포함한다. huTfR의 각각의 단량체는 구조적으로 별개의 3 개 도메인을 갖는다: 막에 근접한 프로테아제-유사 도메인, 모든 이량체 접촉을 위한 나선형 도메인, 그리고 막-원위 정점 도메인 (Lawrence 등, *Science*, 286 (1999), pp. 779-782). HuTfR 이량체는 약 190,000 달톤의 분자량을 갖는다. 서열 번호: 1의 서열을 갖는 huTfR의 정점 도메인 (서열 번호: 2로 인코딩됨)은 트랜스페린과 TfR 사이의 상호 작용에 참여하지 않는다. 이 도메인은 다른 단백질이 TfR에 결합하기 위한 접촉 표면을 제공할 수 있다고 추측되었다. 고유의 시노몰구스(cynomolgous) 원숭이, 고유의 붉은털원숭이(rhesus) 및 고유의 침팬지 TfR이 대표적인데, 예를 들면, 차례로 수탁번호 XP\_005545315, NP\_001244232.1, 및 XP\_003310238.1이다. 고유의 시노몰구스 원숭이, 고유의 붉은털원숭이 원숭이, 그리고 고유의 침팬지 TfRs의 상기 정점 도메인은 서열 번호:1의 고유의 인간 TfR 정점 도메인과 차례로 약 96%, 95%, 및 98% 서열 동일성을 갖는다.
- [0046] 고유의 마우스 TfR (mTfR), Uniprot Q62351, 서열 번호:5는 huTfR와 약 77% 아미노산 서열 동일성을 갖는다. 상기 고유의 mTfR의 정점 도메인은 고유의 huTfR의 도메인과 약 74% 동일하다. mTfR은 인간 대응물과 유사한, 구조적으로 별개의 3 개 도메인을 함유한다. 주석이 달린 엑손 및 인트론이 있는 마우스 TfR의 완전한 유전자

서열은 NCBI 데이터베이스에서 찾을 수 있다. (유전자 ID: 22042). 마우스 TfR은 염색체 16 (NCBI 참고 서열 NC\_000082.6)에서 찾는다.

- [0047] 한 측면은 키메라 TfR 폴리펩티드를 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 키메라 TfR은 비-인간 포유동물 트랜스페린 결합 부위, 그리고 huTfR, 서열 번호:1의 정점 도메인과 아미노산 서열 동일성, *가령*, 최소한 75%, 최소한 77%, 최소한 80%, 최소한 85%, 최소한 90%, 또는 최소한 95% 동일성을 공유하는, 이중성 정점 도메인을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 이중성 정점 도메인은 서열 번호:1, 서열 번호:7, 서열 번호:8, 또는 서열 번호:9의 서열을 갖는다.
- [0048] 상기 키메라 TfR의 비-인간 포유동물 트랜스페린 결합 부위로 인하여상기 비-포유동물 트랜스페린이 이 키메라 TfR에 특이적으로 결합하는 것이 허용된다. 일부 구체예에서, 상기 비-인간 포유동물 트랜스페린 결합 부위는 고유의 트랜스페린 결합 부위, *가령*, 마우스 트랜스페린 수용체 결합 부위이다.
- [0049] 일부 구체예에서, 키메라 TfR 폴리펩티드는 오직 고유의 정점 도메인이 이중성 정점 도메인으로 대체된 고유의 TfR 폴리펩티드를 포함한다. 일부 구체예들에서, 키메라 TfR 폴리펩티드는 고유의 TfR 결합 부위와 고유의 TfR 결합 부위에 대하여 이중성인 정점 결합 도메인을 포함하고, *가령*, 이때 상기 정점 도메인에 추가하여, 최소한 하나의 도메인은 비-고유의 아미노산 서열을 갖는다.
- [0050] 일부 구체예에서, 상기 키메라 TfR 폴리펩티드는 서열 번호:3에 대하여 최소한 80%, 최소한 85%, 최소한 85%, 최소한 92%, 최소한 95%, 또는 최소한 98% 아미노산 서열 동일성을 갖는다. 한 구체예에서, 상기 키메라 TfR을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 폴리펩티드는 마우스 트랜스페린 수용체 유전자의 엑손 및 인트론, 그리고 huTfR 정점 도메인을 인코딩하는 핵산 서열을 포함한다. 한 구체예에서, 비-인간 포유동물 TfR 정점 도메인은 huTfR 정점 도메인 코딩 서열로 대체하는데, 예를 들면상기 비-인간 포유동물 TfR 유전자에서 대응하는 엑손은 huTfR 정점 도메인 서열로 대체된다. 예시적인 구체예에서, 상기 비-인간 포유동물 TfR 유전자는 마우스 TfR 유전자이다. 한 구체예에서, mTfR 정점 도메인은 huTfR 정점 도메인 코딩 서열로 대체되는데, 이것은 상기 키메라 TfR을 만들기 위하여, 예를 들면 마우스 트랜스페린 수용체 유전자의 4번째 엑손 다음에 위치된다.
- [0051] 일부 측면에서, 본 발명은 본원에서 기술된 키메라 TfR 폴리펩티드를 포함하는 상기 폴리펩티드중 임의의 것을 인코딩하는 핵산 서열을 포함하는 단리된 핵산을 제공한다. 일부 구체예에서, 상기 키메라 TfR 폴리펩티드에서 이중성 정점 도메인을 인코딩하는 핵산 서열의 영역은 고유의 huTfR의 정점 도메인 코딩 서열, 서열 번호:2에 대하여 최소한 75%, 최소한 77%, 최소한 80%, 최소한 85%, 최소한 90%, 또는 최소한 95%의 핵산 서열 동일성을 공유한다.
- [0052] 또다른 측면에서, 본원에서 기술된 키메라 트랜스페린 수용체를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함한, 폴리뉴클레오티드가 제공된다. 상기 폴리뉴클레오티드는 단일-가닥 또는 이중-가닥일 수 있다. 일부 구체예에서, 상기 폴리뉴클레오티드는 DNA이다. 특정 구체예에서, 상기 폴리뉴클레오티드는 cDNA이다. 일부 구체예에서, 상기 폴리뉴클레오티드는 RNA이다.
- [0053] 코돈 최적화
- [0054] 일부 구체예에서, 상기 키메라 TfR의 코딩 서열, 구체적으로 huTfR 정점 도메인을 인코딩하는 서열은 마우스에서 상기 키메라 TfR 발현을 개선시키기 위하여 코돈 최적화된다. 코돈 최적화 방법은 예를 들면, 최적화기를 이용하며, 이는 <http://genomes.urv.es/OPTIMIZER>, 및 DNA 2.0 (Newark, California)의 GeneGPS®Expression Optimization Technology에서 접근가능하다. 선호되는 구체예에서, 상기 코딩 서열은 GenScript (Piscataway, New Jersey)의 OptimumGene™ 알고리즘을 이용하여 마우스에서 발현을 위한 코돈-최적화된다.
- [0055] 상기 비-인간 포유동물 트랜스페린 수용체의 정점 도메인을 원하는 정점 도메인으로 대체시키는 방법
- [0056] 본원에서 기술된 바와 같이, 이중성 정점 도메인의 녹-인(knock-in)을 포함하는 비-인간 유전자삽입 동물은 다양한 방법, 예를 들면, 아연 핑거(zinc finger) 뉴클레아제 (ZFN), Tale-작동체 도메인 뉴클레아제 (TALEN), 트랜스포존-매개된 시스템, 및 CRISPR/Cas9 시스템을 이용하여 생성될 수 있다. 이들 방법은 전형적으로 하나 또는 그 이상의 뉴클레아제를 인코딩하는 하나 또는 그 이상의 폴리뉴클레오티드를 세포에 투여하는 것을 포함하고, 이 뉴클레아제는 DNA를 절단하여 이 DNA 가닥에 5' 및 3' 절단 단부를 만듦으로써, 상기 내인성 유전자의 변형을 매개한다. 5' 단부로 부터 5'로 연장된 서열과 3' 단부로 부터 3'로 연장된 서열에 실질적으로 상동성인 좌측 아암 및 우측 상동 아암의 측면에 공여 서열이 존재하여, 상기 공여 서열은 상동-지형된 복구 (HDR)를 통하여 상기 뉴클레아제가 표적으로 하는 내인성 유전자 안에 통합된다. 일부 구체예에서, 상기 녹-인(knock-



in)은 CRISPR/Cas9 시스템을 이용하여 실행된다. 예를 들면, 이중성 정점 도메인을 인코딩하는 핵산 서열이 내인성 TfR 유전자로 도입되어 키메라 TfR가 생성되고, 이로써 대체된 정점 도메인을 인코딩하고, 그러나 이 유전자의 전체적인 구조는 유지되는, 자연 발생적 서열이 된다.

[0057] CRISPR

[0058] 일부 구체예에서, 서열 번호: 1에 대하여 최소한 80% 동일한 정점 도메인의 녹-인(knock-in)은 CRISPR/Cas9 시스템을 이용하여 실행된다. CRISPR/Cas9 시스템은 Cas9 단백질, 그리고 트랜스페린 수용체의 대체될 정점 도메인 안에 표적 모티프에 Cas9 단백질을 지향시키고, 이에 혼성화되도록 할 수 있는 2개의 리보핵산중 최소한 하나를 포함한다. 이들 리보핵산은 “단일 가이드 RNA” 또는 “sgRNA”로 보통 불린다. 그 다음 Cas9 단백질은 상기 표적 모티프를 절단하고, 이로써 이중-가닥 브레이크 또는 단일-가닥 브레이크가 만들어진다. 2개의 상동 아암 측면에 huTfR 정점 도메인 코딩 서열을 포함하는 공여 DNA 존재 하에, 상기 공여 DNA는 표적 트랜스페린 수용체 DNA 안으로 삽입되어, 상기 정점 도메인이 대체된다.

[0059] 본 발명에서 이용된 Cas9 단백질은 자연 발생 Cas9 단백질 또는 이의 기능적 유도체일 수 있다. 고유의 서열 폴리펩티드의 “기능적 유도체생물학적(functional derivative)”는 고유의 서열 폴리펩티드와 공통의 정량적인 생물학적 성질을 갖는 화합물이다. “기능적 유도체”는 고유의 서열의 단편 및 고유의 서열 폴리펩티드의 유도체 그리고 이의 단편을 포함하나, 대응하는 고유의 서열 폴리펩티드와 공통의 정량적인 생물학적 성질을 갖는다면, 이에 국한되지 않는다. 본원에서 고려되는 생물학적 활성은 Cas9의 기능성 유도체가 DNA 기질을 단편으로 가수 분해하는 능력이다. Cas9 폴리펩티드 또는 이의 단편의 적합한 기능적 유도체는 Cas9 단백질 또는 이의 단편의 돌연변이체, 융합, 공유 변형을 포함하나, 이에 국한되지 않는다.

[0060] 일부 구체예에서, Cas9 단백질은 스트렙토코커스 피오게네스(streptococcus pyogenes)로부터 유래된다. Cas9는 2개의 엔도뉴클레아제 도메인을 보유하는데, sgRNA에 비상보적인 표적 DNA를 절단하는 RuvC-유사 도메인, 그리고 sgRNA에 상보적인 표적 DNA를 절단하는 HNH 뉴클레아제 도메인이 포함된다. Cas9의 이중-가닥의 엔도뉴클레아제 활성은 프로토스페이스(protospacer)-연합된 모티프 (PAM)로 공지된 짧은 보존된 서열 (2-5개 뉴클레오티드), 바로 이어서 표적 서열 안에 표적 모티프의 3'를 필요로 한다. 일부 구체예에서, PAM 모티프는 NGG 모티프이다. 하나의 예시적인 구체예에서, 마우스에서 정점 도메인은 sgRNAs에 의해 마우스 유전자의 엑손 4와 9 사이의 영역으로 지향되는 Cas9 단백질을 이용하여 대체된다. 공여 DNA를 이 반응으로 도입시킨다. 상기 공여 DNA는 엑손 4의 상류에서 시작하고, 마우스 TfR 서열에 상동성인 좌측 상동 아암과, 엑손 9에서 시작되고, 마우스 TfR 서열에 상동성인 우측 상동 아암 사이에 있는 인간 정점 도메인 코딩 서열을 포함한다. 특정 구체예에서, 좌측 상동 아암은 엑손 4의 상류에서 시작하고, 마우스 TfR 서열과 817개 뉴클레오티드가 중첩되고, 그리고 우측 상동 아암은 엑손 9에서 시작되고, 마우스 TfR 서열과 807개 뉴클레오티드가 중첩된다. 그 결과, 원하는 정점 도메인을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열, 이를 테면, 서열 번호: 1에 대하여 최소한 80% 동일한 아미노산 서열을 갖는 도메인은 마우스 4번째 엑손 다음에 삽입될 수 있고, 삽입된 뉴클레오티드 서열은 적절한 마우스의 다음 엑손의 3' 단부 측면에 있다. 일부 구체예에서, 마우스 TfR 유전자 안으로 삽입된 인간 정점 도메인 코딩 서열은 마우스 발현을 위하여 코돈-최적화된다.

[0061] sgRNAs는 이용된 특정 CRISPR/Cas9 시스템 및 표적 폴리뉴클레오티드의 서열에 따라 선택될 것이다. 일부 구체예에서, 하나 내지 두개의 리보핵산은 Cas9 단백질에 의해 인지되는 데옥시리보핵산 모티프에 바로 인접한 표적 모티프에 혼성화되도록 기획된다. 일부 구체예에서, 일부 구체예에서, 하나 내지 두개의 각 리보핵산은 Cas9 단백질에 의해 인지되는 데옥시리보핵산 모티프에 바로 인접한 표적 모티프에 혼성화되도록 기획되고, 이때 상기 표적 모티프는 대체되는 게놈 서열의 측면에 있다. 가이드 RNAs는 예를 들면, <http://crispr.mit.edu>에서 바로 이용가능한 소프트웨어를 이용하여 기획된다. 키메라 TfR 유전자삽입 마우스를 이용할 수 있는 예시적인 sgRNAs는 서열 번호:10-11을 포함한다.

[0062] 본 명세서에서 개시된 공여 DNA는 서열 번호: 1에 대하여 최소한 75% 동일한 아미노산 서열을 인코딩하는 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 공여 DNA는 서열 번호:1을 인코딩하는, 또는 서열 번호:1과 최소한 75%, 최소한 77%, 최소한 80%, 최소한 85%, 최소한 90%, 또는 최소한 95% 아미노산 서열 동일성을 공유하는 서열을 인코딩하는 서열을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 공여 DNA는 서열 번호:2의 뉴클레오티드 서열, 또는 서열 번호:2와 최소한 60%, 최소한 70%, 최소한 77%, 최소한 80%, 최소한 85%, 최소한 90%, 또는 최소한 95% 서열 동일성을 공유하는 서열을 포함한다. 본 발명에서 개시된 공여 DNA는 상기 정점 도메인 코딩 서열의 측면에 있고, Cas9 단백질에 의한 절단 부위에 대하여 5' 및 3' 엑손 서열을 중첩하도록 기획된 좌측 상동 아암 및 우측 상동 아암을 더 포함한다. 상기 상동 아암은 5' 및 3' 엑손 서열을 넘어서까지 연장될 수 있고, 각 상

동 아암은 길이가 최소한 20, 30, 40, 50, 100, 또는 150개 뉴클레오티드일 수 있다. 당업자는 실험에 필요한 상동 아암의 최적 길이를 쉽게 결정할 수 있다. 하나의 예시적인 구체예에서, 상기 공여 DNA의 좌측 상동 아암은 서열 번호:4 의 뉴클레오티드 1-817에 걸쳐있고, 우측 상동 아암은 서열 번호:4 의 뉴클레오티드 1523-2329에 걸쳐 있다. 일부 구체예에서, 좌측 상동 아암은 서열 번호:4의 뉴클레오티드 1-817에 대하여 최소한 85%, 최소한 90%, 최소한 95%, 또는 최소한 98% 서열 동일성을 공유한다. 일부 구체예에서, 우측 상동 아암은 서열 번호:4의 뉴클레오티드 1523-2329에 대하여 최소한 85%, 최소한 90%, 최소한 95%, 또는 최소한 98% 서열 동일성을 공유한다.

[0063] 일부 구체예에서, 표적 폴리뉴클레오티드 서열이외의 핵산 서열과의 혼성화는 최소화하도록, sgRNAs가 또한 선택될 수 있다. 일부 구체예에서, 하나 내지 두개의 리보핵산은 CRISPR/Cas9 시스템의 오프-타겟(off-target) 효과를 최소화시키기 위하여 상기 세포에서 모든 다른 게놈 뉴클레오티드 서열과 비교하였을 때, 최소한 2개의 미스매치(mismatches)를 갖는 표적 모티프에 혼성화되도록 기획된다. 당업자는 다양한 기술 (가령, 생물 정보학 분석)이 오프-타겟 효과를 최소화하기 위해, 적합한 표적 모티프를 선택하는데 사용될 수 있음을 이해할 것이다. 유전자 발현을 감소시키기 위해 CRISPR/Cas9 시스템을 사용하는 방법은 다양한 공보에 기재되어있는데, 가령, US 특허 공개 번호 2014/0170753 및 2016/0257974, 이의 개시 내용은 그 전체가 참고로 포함된다.

[0064] 아연 핑거 뉴클레아제 (ZFN)

[0065] 일부 구체예에서, ZFN을 이용하여 huTfR 정점 도메인을 녹킹-인(knocking-in) 함으로써, 상기 키메라 TfR이 만들어진다. ZFNs는 FokI 엔도뉴클레아제의 비-특이적 절단 도메인(N)과 아연 핑거 단백질 (ZFP)를 포함하는, 융합 단백질이다. 한 쌍의 ZFNs는 표적 유전자에서 특이적 좌(좌)를 인지하는 것에 관련되며: 하나는 서열 상류를 인지하고, 다른 하나는 변형될 부위의 서열 하류를 인지한다. ZFN의 뉴클레아제 부분은 특이적 좌를 절단한다. 그 다음 상기에서 기술된 공여 DNA는 특이적 좌 안으로 삽입될 수 있다. 유전자 발현을 감소시키기 위하여 ZFNs를 이용하는 방법은 예를 들면, 특허 번호 9,045,763, 및 Durai 등, "Zinc Finger Nucleases: Custom-Designed Molecular Scissors for Genome Engineering of Plant and Mammalian cells," *Nucleic Acid Research*, 33 (18):5978-5990 (2005)에서 공지되며, 그 개시 내용은 그 전체가 참고로 포함된다.

[0066] 전사 활성제-유사 작동체 뉴클레아제 (TALENs)

[0067] 일부 구체예에서, TALENs를 갖는 huTfR 정점 도메인을 녹킹-인(knocking-in) 함으로써, 상기 키메라 TfR이 만들어진다. TALENs는 게놈 부위 주위에 쌍으로 결합하고, 지시하여 특정 부위에서 게놈을 절단하기 위하여 동일한 비-특이적 뉴클레아제인 FokI를 겨냥한다는 점에서 ZFN과 유사하지만, 그러나 DNA 트리플렛(triplets)을 인지하는 대신, 각 도메인은 단일 뉴클레오티드를 인지한다. 유전자 발현을 감소시키기 위하여 ZFNs를 이용하는 방법은 예를 들면, 특허 번호 9,005,973 및 Christian 등, "Targeting DNA Double-Strand Breaks with TAL Effector Nucleases," *Genetics*, 186(2): 757-761 (2010)에서 공지되며, 그 개시 내용은 그 전체가 참고로 포함된다.

[0068] 상기 키메라 TfR을 발현시키는 숙주 세포/유전자삽입 동물

[0069] 일부 구체예에서, 본 발명은 가령, 상기에서 기술된 키메라 트랜스페린 수용체를 인코딩하는 핵산 서열을 포함하는 키메라 TfR을 발현시키는 숙주 세포를 제공한다. 일부 구체예에서, 상기 숙주 세포는 비-인간 포유동물 세포이다. 상기에서 기술된 임의의 녹-인(knock-in) 방법, 가령, CRISPR, TALEN, 아연 핑거 뉴클레아제를 이용하여 고유의 트랜스페린 수용체의 정점 도메인을 서열 번호: 1에 대하여 최소한 80% 동일한 아미노산 서열을 갖는 이중성 정점 도메인으로 대체시킬 수 있다. 일부 구체예에서, 상기 숙주 세포는 진핵 세포, 가령, 서열 번호:1에 대하여 최소한 80% 동일성의 마우스 세포다. 일부 경우에서, 상기 숙주 세포는 sgRNA 및 Cas9, 이중성 정점 도메인을 인코딩하는 핵산 서열을 포함하는 공여 DNA와 접촉되며, 상기 핵산 서열은 좌-우측 상동 아암의 측면에 있다. sgRNA 및 상동 아암들은 이중성 정점 도메인 코딩 서열이 숙주 세포에서 고유의 트랜스페린 수용체의 정점 도메인 코딩 서열을 대체하도록 게놈 안 위치로 삽입되는 서열을 갖는다. 일부 구체예에서, 상기 숙주 세포는 비-영장류 포유류, 이를 테면 마우스, 랫, 토끼, 소, 양, 개, 고양이, 말, 돼지, 및 이와 유사한 것 등을 포함하는 것들의 세포다.

[0070] 일부 구체예에서, 녹-인(knock-in) 방법은 키메라 트랜스페린 수용체 폴리펩티드를 발현시키는 ES 세포를 만들기 위하여 배아 줄기(ES) 세포에서 실행된다. 그 다음 배아 줄기 세포는 자손 세포 또는 비인간 형질 전환 동물의 게놈이 키메라 트랜스페린 수용체 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산을 포함하는 이들 동물로 개발될 수 있다. 일부 구체예에서, ES 세포는 배반포에 도입되고, 모의 임신한 암컷에게 옮겨진다. 일부 경우에서, 삽입유전

자를 휴대하는 기반(founder) 암컷이 선택되고, F1 이형접합체 마우스가 만들어지도록 야생형 암컷이 되었다. 동형접합체 비-인간 동물은 F1 세대 이형접합체 비인간 동물의 번식으로부터 후속적으로 생성될 수 있다. ES 세포의 배양 및 뉴클레오티드 서열을 도입하여 ES 세포의 게놈을 표적화하여 유전자삽입 동물 동물을 생산하는 방법은 잘 알려져 있고, 예를 들면, Ramirez-Solis 등, "Gene targeting in mouse embryonic stem cells," *Methods Enzymol.*, 225:855-878 (1993); 그리고 미국 특허 공개 번호 2013/0318643 참고하며, 그 개시 내용은 그 전체가 참고로 포함된다. 일부 구체예에서, 본 발명의 키메라 TfR을 갖는 유전자삽입 동물로부터의 배아 줄기 세포는 이 유전자삽입 동물의 자손을 제공하는 공급원으로서 사용될 수 있다.

[0071] 일부 구체예에서, 녹킹-인(knocking-in) 방법은 단일-세포 비-인간 동물에서 수행된다. 하나의 예시적인 구체예에서, sgRNAs, Cas9, 및 서열 번호: 1에 대하여 최소한 80% 동일한 정점 도메인 코딩 서열을 포함하는 공여 폴리뉴클레오티드는 전핵 미세주사(pronuclear microinjection)를 통해 단일 세포 배아에 도입되며, 이때 상기 코딩 서열은 좌측 상동 아암 및 우측 상동 아암의 측면에 있다. 그런 다음 수용자 배아는 모의 임신 암컷에게 옮겨진다. sgRNAs는 Cas9 단백질과 복합체를 형성하며, 그 다음 이것은 비-인간 동물 배아에서 트랜스페린 수용체의 정점 도메인의 코딩 서열을 표적으로 한다. 그 결과, 상기 비-인간 동물 트랜스페린 수용체 정점 도메인은 절단되고, 그리고 상기 공여 폴리뉴클레오티드의 트랜스페린 수용체 정점 도메인 코딩 서열로 대체된다. 일부 경우에서, 삽입유전자를 휴대하는 기반(founder) 암컷이 선택되고, F1 이형접합체 마우스가 만들어지도록 야생형 암컷이 되었다. 동형접합체 비-인간 동물은 F1 세대 이형접합체 비인간 동물의 번식으로부터 후속적으로 생성될 수 있다. 본원의 유전자삽입 동물은 설치류, 예를 들면, 마우스 또는 랫일 수 있다.

[0072] 하나의 예시적인 구체예에서, 상기 비-인간 유전자삽입 동물, 가령, 비-영장류 포유류는 고유의 TfR의 인트론과 트랜스페린 결합 도메인을 유지하는 일부 사실로 인하여, 상기 정점 도메인의 녹킹-인(knocking-in) 방법에 의해 만들어지고, 서열 번호: 1에 대하여 최소한 80% 동일한 아미노산 서열을 갖는 유전자삽입 동물은 일반적으로 건강하고, 동일한 종의 야생형 마우스와 유사한 생리학적 상태를 나타낸다. 한 구체예에서, TfR의 정점 영역 외부의 모든 인트론이 유지된다. 예를 들면, 상기 TfR 발현 수준은 동일한 종의 야생형 동물의 수준과 유사하며; 상기 유전자삽입 마우스에서 발현 수준은 야생형 마우스의 것보다 단지 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 또는 90% 적거나, 또는 야생형 마우스의 것보다 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 75%, 100%, 150%, 200%, 300%, 또는 500% 더 크지 않다. 적혈구 세포 계수, 헤모글로빈 수준, 및/또는 헤마토크릿 수준은 동일종의 야생형 동물에서의 수준과 또한 유사하며; 그 차이는 50%보다 크지 않고, 가령, 40%보다 크지 않고, 30%보다 크지 않고, 20%보다 크지 않고, 또는 10%보다 크지 않다. 전형적인 구체예에서, 본 발명에 따른 유전자삽입 동물은 영양분 및 단백질의 유입이 가능한 선택적 BBB 운반을 유지하고, 특신으로부터 CNS를 보호하는 능력도 유지하고; 삽입유전자의 존재는 트랜스페린 결합 또는 FcRn이 하기에서 기술한 바와 같이, 정점 도메인에 결합하는 항체에 결합하는 것을 간섭하지 않는다. 전형적으로, 유전자삽입 동물에서 TfR-매개된 세포 밀매(trafficking)는 또한 야생형 동물에 유사하다. 본 발명의 유전자삽입 동물은 인간 BBB-침투 약물의 약물동력학 또는 약물력학 연구를 위한 모델로써 인간 TfR이 전체 결여된 야생형 마우스 또는 전체 huTfR 세포의 도메인을 발현시키는 (가령, 전체 huTfR 단백질을 발현시키는) 유전자삽입 동물 모델보다 더 관련된다.

[0073] 본 발명이 실시 예에서 보여준바와 같이 마우스에 설명되어 있지만, 다른 비-인간 포유 동물, 예를 들어 설치류, 토끼, 소, 양, 개, 고양이, 말, 돼지, 낙타, 비인간 영장류 및 기타 포유류들이 또한 유사한 방식으로 키메라 TfR을 발현시키도록 조작될 수 있고, 이들 유전자삽입 동물은 또한 본원에 개시된 바와 같은 용도에 사용될 수 있다는 것을 당업자는 인지할 것이다.

[0074] 상기 정점 도메인 결합 폴리펩티드

[0075] "정점 도메인 결합 폴리펩티드" 또는 "ADBP"는 본원에서 사용될 때, 서열 번호:1에 대하여 최소한 80% 동일성을 갖는 정점 도메인에 결합하는 폴리펩티드를 지칭한다. ADBP는 상기 키메라 TfR의 huTfR의 정점 도메인에 결합할 수 있는 항체 또는 임의의 폴리펩티드일 수 있다. 일부 구체예에서, ADBP는 혈액-뇌 장벽을 통과하여 운반되는 제제다. 일부 구체예에서, ADBP는 가령, 공유 연계(linkage)에 의해 연결된 작동체 분자를 더 포함한다. 상기 작동체 분자는 치료요법적 물질, 라벨링 물질 또는 진단 물질일 수 있다. 특정 구체예에서, 상기 작동체 분자는 폴리펩티드, 이를 테면 효소 또는 신호생성 분자 상에 효소 활성 또는 저해 활성을 갖는 이를 테면 치료 또는 진단 항체, 또는 폴리펩티드이다. 특정 구체예에서, 상기 작동체 분자는 소분자, RNA, DNA, 또는 단백질을 포함한다.

[0076] 일부 구체예에서, ADBP는 이중특이적 항체이며, 상기 정점 도메인 결합 영역은 상기 정점 도메인을 인지하는 항체이고, 상기 작동체 분자는 상이한 항원, 가령, 효소 또는 신호생성 분자를 인지하는 항체이며, 그리고 상기



작동체 모이어티의 결합으로 효소 또는 신호생성 분자가 활성화되거나 또는 억제된다.

[0077] 상기 키메라 TfR에 결합하는 ADBPs의 스크리닝

[0078] 본원에서 개시된 상기 키메라 TfRs는 TfR에 결합할 수 있는 ADBPs를 스크리닝하는데 이용될 수 있다. 스크리닝 방법은 후보 ADBP를 상기 개시된 키메라 TfR과 접촉시키고, 키메라 TfR에 결합하는 후보 ADBP의 양을 결정하는 단계를 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 후보 ADBP에 상기 키메라 TfR을 접촉시키는 단계는 이 ADBP에 상기 키메라 TfR을 발현시키는 숙주 세포를 접촉시키는 것을 포함한다. 일부 경우에서, 상기 후보 ADBP에 상기 키메라 TfR을 접촉시키는 단계는 이 ADBP에 상기 키메라 TfR을 발현시키는 내피를 접촉시키는 것을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 내피는 BBB 내피이다.

[0079] 후보 ADBP와 TfR 간의 상호 작용은 당업계에 공지된 방법, 예를 들어 면역 분석 또는 SPR을 사용하여 측정될 수 있다. 일부 구체예에서, 키메라 TfR에 대한 후보 ADBP의 결합은 ELISA, Biacore™시스템 또는 공동면역 침전에 의해 측정된다.

[0080] BBB에 결합하는 ADBPs의 스크리닝

[0081] 상기 기재된 바와 같은 키메라 TfR을 발현하는 비-인간 유전자삽입 동물은 ADBP가 키메라 TfR의 정점 도메인에 결합하는 능력 및 궁극적으로 BBB를 가로 지르는 능력을 특징화하는데 사용될 수 있다.

[0082] 전형적으로, BBB를 가로 지르는 ADBP의 능력을 평가하기 위해, ADBP는 본원에 개시된 키메라 TfR을 휴대하는 유전자삽입 동물에게 바람직하게는 정맥 내 주사를 통해 투여된다. 일정 시간 후, 가령, 최소한 10 분, 최소한 20 분, 최소한 30 분, 최소한 60 분, 최소한 90 분, 최소한 120 분, 최소한 180 분, 또는 최소한 240 분, 상기 유전자삽입 동물을 희생시키고, ADBP의 존재를 결정하기 위해 뇌 조직을 분석한다. ADBP의 존재는 ADBP 및/또는 그에 결합된 작동체 분자의 존재를 분석함으로써 결정될 수 있다. 일부 구체예에서, 뇌 조직은 식염수, 예를 들어 PBS로 관류되고 검출 전에 고정된다. 이 섹션에서 작동체 분자의 존재는 표준 영상화 방법, 예를 들어 면역조직화학 법 또는 면역형광법을 사용하여 검출될 수 있다. 뇌 조직에서 작동체 분자의 양성 검출은 이 작동체 분자가 BBB를 가로지를 수 있음을 나타낸다. 일부 경우에서, 뇌에서 ADBP의 존재를 측정하는 것은 정량적 면역 분석을 수행하는 것을 포함한다. 키메라 TfR 유전자삽입 마우스를 사용하여 BBB를 가로 질러 수송을 측정하기 위한 분석은 강력하고, ADBP의 취입 측정에서 10-, 20-, 30-, 40-, 또는 50-배 이상 개선될 수 있다.

[0083] 일부 구체예에서, 뇌에서 ADBP의 존재를 검출하기 위해 영상화 방법 또는 면역 검정을 사용하는 것 외에도, 작동체 분자의 기질의 변화를 검출하는 방법 또한 작동체 분자의 뇌 흡수를 평가하는데 사용될 수 있다. 하나의 예시적인 구체예에서, ADBP는 뇌에서 효소의 효소 활성을 억제할 수 있는 작동체 분자를 포함한다. 일부 구체예에서, ADBP의 뇌 취입, 즉 BBB 수송 능력을 반영하는 ADBP 또는 ADBP에 연결된 작동체 분자에 의해 조절되는 효소의 효소 활성을 평가함으로써 측정될 수 있다.

[0084] 일부 구체예에서, 후보 ADBPs의 뇌 취입은 뇌에서 측정된다. 혈장을 모니터링하고 약동학적 프로파일을 평가할 수도 있다. 후보 작동체 분자의 투여 후, BBB 비-관통 분자와 비교하여, 뇌-대-플라즈마 비의 증가는 후보 ADBP가 BBB를 통과할 수 있음을 나타낸다.

[0085] 일부 경우에서, 상기 키메라 TfR을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 비-인간 유전자삽입 동물은 특정 질병 표현형을 나타내도록 조작된 비-인간 유전자삽입 동물과 교배될 수 있다. 일부 경우에서, 상기 비-인간 유전자삽입 동물은 다양한 마우스 모델, 예를 들면, 이를 테면 미국 특허 번호 8,476,485에서 기술된 ALS 마우스 모델; 이를 테면 미국 특허 번호 5,898,094 및 미국 특허 번호 6,175,057에서 기술된 AD 마우스 모델; 이를 테면 미국 특허 공개 번호 2016/0050895에서 기술된 TSPO 마우스 모델, 이를 테면 미국 특허 공개 번호 2014/0041062에서 기술된 자폐증 스펙트럼 장애 (ASD) 마우스 모델과 교배될 수 있는 유전자삽입 마우스이다. 상기 언급된 특허 및 특허 출원의 전체 내용은 본원에 참조로 포함된다. 일부 경우에서, 이러한 교배에 의해 생성된 하이브리드 마우스는 뇌에서 작동체 분자를 포함하는 ADBP의 분포 뿐만 아니라 뇌 질환 치료에서 ADBP 또는 작동체 분자의 효능을 평가하는데 사용될 수 있다.

[0086] 키트

[0087] 일부 구체예에서, 본원에서 기술된 키메라 트랜스페린 수용체 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드, 또는 이러한 폴리펩티드를 발현시키는 세포를 포함하는 키트가 제공된다. 일부 구체예에서, 키트는 상기 한 바와 같이 ADBPs를 스크리닝하는데 사용된다.

[0088] 일부 구체예에서, 상기 키트는 상기 키메라 TfR와 후보 ADBP 사이의 결합을 검출하기 위해 분석에 사용될 수 있

는 완충액 및 용기를 추가로 포함한다. 일부 구체예에서, 키트는 본원에 기술된 방법 (예를 들어, 혈액-뇌 장벽을 가로 질러 조성물을 투여하기 위해 키트를 사용하기 위한 지침서)을 수행하기 위한 지침 (즉, 프로토콜)을 담은 지시 자료를 추가로 포함한다. 지침 자료는 일반적으로 문서 또는 인쇄 자료를 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다. 지침을 보관할 수 있고, 최종 사용자에게 소통될 수 있는 임의의 매체도 본 발명에서 고려된다. 이러한 매체는 전자 보관 매체 (가령, 자석 디스크, 테이프, 카트릿지, 칩), 광학 매체 (가령, CD-ROM), 및 이와 유사한 것들을 포함하나, 이에 국한되지 않는다. 그러한 매체는 그러한 교육 자료를 제공하는 인터넷 주소를 포함할 수 있다.

[0089] **실시예들**

[0090] 하기 실시예들은 단지 예시를 위한 것이며 청구된 발명의 제한으로 해석되어서는 안된다. 당업자가 의도된 발명을 성공적으로 수행할 수 있도록 다양한 대안적인 기술 및 절차가 존재한다.

[0091] 실시예 1. HUTFR 마우스 생성 및 특징화

[0092] 녹-인/녹-아웃(knock-out) 마우스를 만드는 방법은 문헌에 출판되어 있으며, 당업자에게 잘 알려져 있다. 간략하게 설명하자면, C57B16 마우스를 이용하여 단일 세포 배아로의 전핵 미세주사를 통하여 인간 정점 TfR 마우스 계통의 녹-인(knock-in)을 만든 후, 모의 임신 암컷으로 배를 옮겼다. 구체적으로, Cas9, sgRNAs 서열 번호:10-11, 및 공여 DNA, 서열 번호:4는 이 배아에 도입되었다. 상기 공여 DNA는 마우스에서 발현을 위하여 코돈 최적화된 인간 정점 도메인 코딩 서열, 서열 번호:2를 포함하였다. 상기 정점 도메인 코딩 서열은 좌측 (서열 번호:4의 뉴클레오티드 1-817) 및 우측 상동 아암 (서열 번호:4의 뉴클레오티드 1523-2329)의 측면에 있다. 정점 도메인은 마우스의 4번째 엑손 다음에 삽입되고, 마우스의 9번째 엑손의 3'말단에 바로 측면에 위치하도록, 이러한 방식으로 공여 서열이 기획되었다. 배아를 받은 암컷 자손의 기반(founder) 수컷을 야생형 암컷에게 사육하여 F1 이형접합체 마우스를 만들었다. 동형접합체 마우스는 F1 세대 이형접합체 마우스의 번식으로부터 후속적으로 생성되었다.

[0093] 실시예 2: 항체 뇌 취입을 모니터링하기 위한 도구 항체의 생성

[0094] 인간 TfR 또는 인간/마우스 BACE1을 표적으로 하는 도구 항체는 당업자들에게 친숙한 프로토콜을 이용하여, 경쇄 및 중쇄를 인코딩하는 DNA를 가지고 있는 발현 플라스미드를 Expi293 또는 ExpiCHO 세포로 형질도입시킴으로써 만들었다. 이중특이적 항체는 "노브-인투-홀(knobs-into-holes)" 기술을 이용하여 만들었고; 노브 및 홀 절반 항체는 별도로 발현되었고, 그 다음 공개된 방법을 이용하여 연결시켰다. 먼저 단백질 A로 항체를 정제한다. 다음, 크기 배제 크로마토 그래피로 항체를 정제하였다. 이들 연구를 위하여 만들어진 항체는 다음과 같다:

[0095] 항-TfR: 인간 TfR 정점 도메인에 결합하는 인간 IgG1 항체.

[0096] 항-BACE1: 인간 BACE1에 결합하고, 마우스 BACE1과 교차-반응하는 인간 IgG1 항체. 이 항체는 BACE1의 효소 활성을 억제한다.

[0097] 항-TfR/BACE1: 인간 TfR 정점 도메인, 뿐만 아니라 인간 및 마우스 BACE1에 결합하는 인간 IgG1 노브-인투-홀 이중특이적 항체. 상기 노브 절반-항체는 항-BACE1 항체의 가변 도메인을 갖고; 상기 홀 절반-항체는 항-TfR 항체의 가변 도메인을 갖는다.

[0098] 실시예 3: HUTFR<sup>정점+/-</sup> 및 HUTFR<sup>정점+/+</sup> 마우스의 혈액 분석

[0099] 야생형 C57B16, huTfR<sup>정점+/-</sup>, 및 huTfR<sup>정점+/+</sup> 마우스 (한 집단에 n=3임)로부터 혈액을 채취하고, 표준 온혈구 계산(CBC) 분석을 실행하였다. 전체 적혈구 세포, 헤모글로빈, 및 헤마토크릿 수준을 비롯한 임의의 적혈구 매개 변수에서 유전자형-특이적 차이는 관찰되지 않았다(도 1).

[0100] 실시예 4: HUTFR<sup>정점+/-</sup> 및 HUTFR<sup>정점+/+</sup> 마우스에서 TfR-표적화된 항체의 뇌 국소화

[0101] 이 실시예에서, 항-TfR 항체를 만들어, huTfR<sup>정점+/-</sup> 마우스에서 TfR-표적으로 하는 치료제의 뇌 취입을 평가하였다. huTfR<sup>정점+/-</sup> 마우스 또는 야생형 C57B16에게 5 mg/kg의 항-TfR 항체를 정맥 주사하였다. 1시간 후, 상기 마우스를 희생시키고, PBS로 관주하였다. 반(hemi)-뇌를 4 % PFA에 하룻밤 동안 고정시킨 후, 30 % 슈크로스에 보존하였다. 시상 뇌 섹션 (35  $\mu$ m)을 마이크로톰을 사용하여 절단하고, 5 % BSA + 0.3 % Triton X-100에서 차단시킨 다음, Alexa488 항-huIgG1(1:500)로 형광 2 차 착색하였다. 20x 대물 렌즈를 갖는 Zeiss 광시야 현

미경을 사용하여 뇌 이미지를 촬영하였다. huTfR<sup>정점+/-</sup> 마우스에서 유의적인 혈관 착색이 관찰되었는데, 이는 TfR이 상당히 발현되는 BBB에서 뇌 내피 세포상의 인간 정점-특이적 항-TfR의 강력한 결합을 나타낸다(도 2). 대조적으로, 야생형 마우스에서는 착색이 거의 관찰되지 않았다.

[0102] TfR-특이적 BBB 운반을 확인하기 위하여, 상기에서 설명된 것과 유사한 방식을 이용하여 항-BACE1 항체 및 항-TfR/BACE1 이중특이적 항체를 테스트하였다. huTfR<sup>정점+/+</sup> 마우스에게 50 mg/kg의 상기 항체중 하나를 정맥 주사하였다. 24시간 후, 마우스에게 PBS를 관주시키고, 반(hemi)-뇌를 처리하고, huTfR<sup>정점+/-</sup> 마우스에 대하여 상기에서 기술된 바와 같이 착색시켰다. 항-TfR/BACE1에 대해서는 넓은 뇌 실질 염색이 관찰되었고, 반면, 항-BACE1에 대해서는 염색이 관찰되지 않았는데, 이것은 이들 마우스에서 TfR-정점 도메인-결합 폴리펩티드가 BBB 트랜스사이토시스에 필요하다는 것을 나타낸다(도 3).

[0103] 실시예 5: HUTFR<sup>정점+/+</sup> 마우스에서 항체의 뇌 및 혈장 PK/PD

[0104] 본 실시예에서 huTfR<sup>정점+/+</sup> 마우스에게 50 mg/kg의 항-BACE1 항체 또는 항-TfR/BACE1 이중특이적 항체를 정맥 주사하였다. 24 시간 후, 혈액은 심장천자를 통하여 수거하고, 마우스는 PBS로 관주시켰다. 뇌 조직을 PBS 중 1 % NP-40을 함유하는 용해 완충액의 10x 조직 중량에서 균질화시켰다. 혈액을 EDTA 튜브에 수집하여 응고를 방지하고, 혈장을 분리하기 위해 14000 rpm에서 7 분 동안 회전시켰다. 마우스 혈장 및 뇌 용해물 중의 항체 농도를 제조자의 지시에 따라, 일반적인 인간 IgG 분석(MSD 인간 IgG 키트 # K150JLD)을 사용하여 정량화하였다. 간략하게 설명하자면, 사전-피복된 플레이트를 MSD 차단제 A로 30 분 동안 차단시켰다. Hamilton Nimbus 액체 처리기를 사용하여 1:10,000으로 희석시키고, 차단된 플레이트에 이중으로 첨가하였다. 뇌 샘플을 1 % NP40 용해 완충액에서 균질화하고, PK 분석을 위해 1:10으로 희석된 용해물을 사용하였다. 투여 용액을 동일한 플레이트에서 분석하여, 정확한 투여량을 확인하였다. 표준 곡선인 0.78-200 ng/mL IgG는 4-매개변수 로지스틱 회귀를 사용하여 피팅하였다.

[0105] 24 시간 후, 항-TfR/BACE1의 혈장 수준은 주변으로-발현된 huTfR<sup>정점</sup>에 결합을 통하여 이 항체가 제거로 인하여 항-BACE1의 수준보다 더 낮았다(도 4a). 뇌에서, 항-BACE1과 비교하여 항-TfR/BACE1의 농도가 ~ 28 배 증가하는 것이 관찰되었다(도 4b). 항-TfR/BACE1의 상당한 축적은 BBB에서의 TfR-매개된 트랜스사이토시스에 기인하며, 이 결과는 인간 TfR-정점 도메인-결합 폴리펩티드에 대한 BBB 흡수를 측정하기 위한 도구로서 huTfR<sup>정점+/+</sup> 마우스를 검증한다.

[0106] 아밀로이드 전구체 단백질(APP) 절단의 BACE1 억제제는 혈장 및 뇌에서 항체 활성의 약물력학 관독으로서 사용되었다. 뇌 조직을 5M 구아니딘-HCl의 10x 조직 중량에서 균질화한 다음, PBS에서 0.25 % 카제인 완충액에서 1:10으로 희석 하였다. 혈장 및 뇌 용해물에서 마우스 Aβ40 수준을 샌드위치 ELISA를 사용하여 측정하였다. 384-웰 MaxiSorp 플레이트를 밤새 Aβ40 펩티드(Millipore #ABN240)의 C-말단에 특이적인 다중클론 포획 항체로 코팅 하였다. 카제인-희석된 구아니딘 뇌 용해물을 ELISA 플레이트에서 1:2로 추가로 희석하고, 검출 항체인 바이오티닐화된 M3.2와 동시에 첨가하였다. 1:5 희석에서 혈장을 분석하였다. 스트렙타비딘-HRP를 첨가하기 전, 시료를 하룻밤동안 4℃에서 항온처리하고, 그 다음 TMB 기질을 첨가하였다. 표준 곡선인 0.78-50 pg/mL msAβ40은 4-매개변수 로지스틱 회귀를 사용하여 피팅하였다.

[0107] 항-BACE1과 비교하였을 때, 항-TfR/BACE1 처리로 인하여 huTfR<sup>정점+/+</sup> 마우스에서 A-베타의 감소가 증가되었고, 이것은 뇌에서 BACE1 표적 관여는 항-TfR/BACE1로 이루어진다는 것을 나타낸다(도 4c). 처리되지 않은 야생형 마우스와 비교하여, 혈장 A-베타는 항-TfR/BACE1 및 항-BACE1 둘 다에 대해 유사한 정도로 감소되었다(도 4d). 이들 데이터는 인간 TfR-정점 도메인-결합 폴리펩티드의 평가를 위해 인간 TfR-매개 뇌 취입을 필요로 하는 표적 참여 연구에서 huTfR<sup>정점+/+</sup> 마우스의 사용을 지원한다.

[0108] 실시예 6: HUTFR<sup>정점+/+</sup> 마우스에서 TFR의 발현

[0109] huTfR<sup>정점+/+</sup> 마우스에서 TfR 발현 수준이 변경되는지 여부를 결정하기 위해 뇌 및 다양한 말초 조직을 야생형 및 huTfR<sup>정점+/+</sup> 마우스로부터 분리하였다. PBS로 관류 한 후 마우스로부터 뇌, 간, 폐 및 신장을 취하였다. PBS 중 1 % NP-40을 함유하는 용해 완충액의 10x 조직 중량에서 조직을 균질화시켰다. 샘플을 웨스턴 블롯상에서 수행하고, TfR의 발현 수준을 TfR의 세포 내 부분을 인식하고, 야생형 및 huTfR<sup>정점+/+</sup> 둘 다에 대해 교차-반응성



인 TfR 항체를 사용하여 측정하였다(1:2000; Thermofisher #13-6800). TfR 발현의 정량은 액틴에 대한 비율로 표현되었다(1:5000; Abcam 8227). 도 5a-5d는 huTfR<sup>정점+/+</sup> 마우스에서의 TfR 발현은 뇌 (도 5a), 간 (도 5b), 신장 (도 5c), 및 폐 (도 5d)에서 매우 유사하다는 것을 보여준다.

[0110] 본 명세서에 기술된 실시예 및 구체예는 단지 설명을 위한 것이며, 이에 대한 다양한 변형 또는 변경이 당업자에게 제안될 것이며, 본 출원의 사상 및 첨부된 청구 범위 및 본 발명의 범위 내에 포함되어야 하는 것으로 이해된다. 본원에 인용된 모든 간행물, 서열 수탁 번호, 특허 및 특허 출원은 모든 목적을 위해 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0111] 예시적인 서열 표

[0112] 서열 번호:1: 인간 정점 도메인 삽입체의 단백질 서열

AQNSVIIVDKNGRLVYLVENPGGYVAYSKAATVTGKLVHANFGTKKDFEDLYTPVNGS  
IVIVRAGKITFAEKVANAESLNAIGVLIYMDQTKFPIVNAELSFFGHAHLGTGDPYTPGFP  
SFNHTQFPSPRSSGLPNIPVQTISRAAAELKFGNMEGDCPSDWKTDSTCRMVTSSEKNVK  
LTVSN

[0114] 서열 번호:2: 인간 정점 도메인 삽입체의 DNA 서열

GCTCAGAACTCCGTGATCATCGTGGATAAGAACGGCCGGCTGGTGTACCTGGTGGGA  
GAACCCTGGCGGATACGTGGCTTACTCTAAGCCGCTACCGTGACAGGCAAGCTGG  
TGCACGCCAACTTCGGAACCAAGAAGGACTTTGAGGATCTGTACACACCAGTGAAC  
GGCTCTATCGTGATCGTGC GCGCTGGAAGATCACCTTCGCCGAGAAGGTGGCTAAC  
GCCGAGAGCCTGAACGCCATCGGCGTGCTGATCTACATGGATCAGACAAAGTTTCC  
CATCGTGAACGCTGAGCTGTCTTTCTTTGGACACGCTCACCTGGGCACCGGAGACCC  
ATACACACCCGGATTCCCTAGCTTTAACCACACCCAGTTCCCCCTTCCAGGTCTAG  
CGGACTGCCAAACATCCCCGTGCAGACAAATCAGCAGAGCCGCTGCCGAGAAGCTGT  
TTGGCAACATGGAGGGAGACTGCCCTCCGATTGGAAGACCGACTCTACATGTAGG  
ATGGTGACCTCCGAGTCAAAAAATGTCAAATCACCGTGTCCAAT

[0116] 서열 번호:3: 유전자삽입 마우스에서 발현되는 키메라 TfR 서열(이탤릭체 부분은 세포질 도메인을 나타내고, 굵은 부분은 막 관통 도메인을 나타내고, 회색 부분은 세포 외 도메인을 나타내고, 그리고 굵고 밑줄 친 부분은 정점 도메인을 나타낸다)

MMDQARS~~AFSNLFGGEPLSYTRFSLARQVDGDN~~SHVEMKLA~~ADEEENADNNMKASVRKPKR~~  
FNGRLCFAAIALVIFFLIGFMSGYLGYCKRVEQKEECVKLAETEETDKSETMETEDVPT  
SSRLYWADLKTLLSEKLN~~SIEFADTIKQLSQNTYTPREAGSQKDESLAYYIENQFHEFKFS~~  
KVWRDEHYVKIQVKSSAQNSVIIVDKNGRLVYLVENPGGYVAYSKAATVTGKLVHA  
NFGTKKDFEDLYTPVNGSIVIVRAGKITFAEKVANAESLNAIGVLIYMDQTKFPIVN  
AELSFFGHAHLGTGDPYTPGFP~~SFNHTQFPSPRSSGLPNIPVQTISRAAAELKFGN~~  
EGDCPSDWKTDSTCRMVTSSEKNVKLTVSNVLKERRILNIFGVIKGYEEPDRYVVVG  
AQRDALGAGVAAKSSVGTGLLLKLAQVFS~~DMISKDGRFRSRIIFASWTAGDFGAVGAT~~  
EWLEGYLSSLHLKAFTYINLDKVVVLGTSNFKVSASPLLYTLMGKIMQDVKHPVDGKSL  
YRDSNWISKVEKLSFDNAAYPFLAYSGIPAVSFCEDADYPYLGTRLDTYEALTQKVP  
QLNQMVRTAAEVAGQLIIKLTHDVELNLDYEMYSKLLSFMKDLNQFKTDIRDMGLSL  
QWLYSARGDYFRATSRLTTDFHNAEKTNR~~FVMREINDRIMKVEYHFLSPYVSPRESPFR~~  
HIFWGS~~SGHTLSALVENLKL~~RQKNITAFNETLFRNQLALATWTIQGVANALSGDIWNID  
NEF

[0118] 서열 번호:4: 전장의 공여 DNA (좌측 상동 아암: 1-817; 우측 상동 아암: 1523-2329; 인간 정점 도메인: 941-1492; 코돈 최적화된 서열: 821-1522)

CTATACAGATATATAAGGATGGGGCTTTTTTTTTTAAATTTTTAAAAAGATTTGTTT  
ATTATTATATGTAAGTACACTGTAGCTGTCTTCAGACACTCCAGAAGAGGGCATCAG  
ATCTCATTACAGATGGTTGTGAGCTACCATGTGGTCACTGGGATTTGAACTCAGGAC  
CTTCAGAAGAGCAGTCAGTGCTCTTAAGTGAATAAGTTAATAAGTTAAGTGAATA  
GGTAATAAAGGTCCCTATGAAAAGGGTTCAGACCCAAAGAGTCAGAGATCCACAG  
GTTGAGAACCTCCTGCCCTAAATCTTGTGCTCTCCTTATTCAAGACCACTCCTGTTG  
CAGTTGCTCTTAAGCATGAGTATGCTCCCTTCTGAAAAGTCTCCATAGCAGCCATCTCT  
CCAGCCCCAGAGTGAGGCTTTTAAAGGAATCTTCATGATAAATAGAATTTTTAAAAA  
AGTAACTGAAGTTACTTAAGGTGTTAAGGTACATTTTATCCCTCAGTAACTGGTTA  
ATCTAGCAGTTTTGAGTCATACTTCATTTATCTTGACTTTGAAGAGTAAGATATTTAA  
ACAATTTGCTTGATCCTTGAAGTAAGTATTTAAATAGACATTTTAAATGCAGACTTTTT  
TTAGTTGACTGGTGGTGTGACGTGGTCAATCCAAGTACTCATGGGAGGCAGAGGC  
AGGAGGATCTCTCTTAGACCAGCCTGGTCTATAGAGCAAGTTCCAGGACAGCCAG  
GGCTACACAGAAACCTTGTTCACAAAGACTTTTATCCTTCCAGGCAGCTGAGCCA  
GAATACATACACTCCTAGGGAAGCTGGTTCACAGAAGGACGAATCCCTGGCATACT  
ACATCGAGAATCAGTTTCACGAGTTCAAGTTAGCAAAGTCTGGAGAGATGAGCAC  
TACGTGAAGATCCAGGTGAAGAGCTCCGCTCAGAACTCCGTGATCATCGTGGATAA  
GAACGGCCGGCTGGTGTACCTGGTGGAGAACCCTGGCGGATACGTGGCTTACTCTA  
AGGCCGCTACCGTGACAGGCAAGCTGGTGCACGCCAAGTTCGGAACCAAGAAGGAC  
TTTGAGGATCTGTACACACCAGTGAACGGCTCTATCGTGATCGTGCAGCGCTGGAAAG  
ATCACCTTCGCCGAGAAGGTGGCTAACGCCGAGAGCCTGAACGCCATCGGCGTGTG  
GATCATCTGGATCAGACAAAGTTTCCATCGTGAACGCTGAGCTGTCTTTCTTTGG  
ACACGCTCACCTGGGCACCGGAGACCCATACACACCCGGATTCCCTAGCTTTAACCA  
CACCCAGTTCCCCCTTCCAGGTCTAGCGGACTGCCAAACATCCCCGTGCAGACAAT  
CAGCAGAGCCGCTGCCGAGAAGCTGTTTGGCAACATGGAGGGAGACTGCCCCCTCG  
ATTGGAAGACCGACTCTACATGTAGGATGGTGACCTCCGAGTCAAAAAATGTCAA  
CTCACCGTGTCCAATGTGCTGAAAGAACGACGCATCCTGAATATCTTTGGAGTTATT  
AAAGGTTATGAGGAACCAGGTAAAGACCTGCTTTGTACTTTTTCACTTTACTGTTTTG  
CTTACTGTAGATAGGTCTAGTGCAGGAAGGAGAAGGATGCTAGCTTGGCATGAACT  
GCTATATCTTGTGTTGTCCTAATGTGAACTTTGTAAATATATGTGTATATAACACATAAT  
ATGGCCATGTAAGTGTATGGAGAGGCCAGAGTTAAGTATTAATATCTTTCTGTAA  
CATTTAAATTTTACATATGAAGGTCAGTGAACAGATTGAAGGAGTTTTGTCCAGGT  
GGGACTTGGATCTAAATTTTTTACAATGCCTGGCAGCAAACACCTTTTTAATCAACT  
GAGCTGTCTCCCCAAATAAAGTGAATGTGATATCAGCTTGTGGATAATTTTTTTTTGT  
TGCTTTGATAAGTGGTTTTCTTACAGGATCACATACCAGTTCTGTCCATAGCATTAA  
CAAACATAACTGTCATGCAGTAGATTAATGTGCAGGGCACATCCAACAGTCACATTT  
ATTAATAGGACAAAAAGTTGGACCTTATATGTAGCACACCTATAATTCCAGTGCTAG  
GAAGATCCGGGTAGGAGATCCTTAGTTCGGTGCTACTTAGTGAGGGTTTGTTCAAA  
AAACAAAAGCTATGATGGTGTGTTGCCTTTTTTCTTTTAGACCGTTATGTTGTAGTAG  
GAGCCCAGAGAGACGCTTTGGGTGCTGGTGTGCGGCGAAGTCCAGTGTGGGAACA  
GGTCTTCTGTTGAAACTTGCCCAAGTATTCTCAGATATGATTTCAAAGGT

[0119]

[0120]

서열 번호:5: 마우스 TfR 단백질 서열 (Uniprot Q62351) (이탤릭체 부분은 세포질 도메인을 나타내고, 굵은 부분은 막 관통 도메인을 나타내고, 회색 부분은 세포 외 도메인을 나타내고, 그리고 굵고 밑줄 친 부분은 정점 도메인을 나타낸다)

*MMDQARS****AFSNLFGGEPLSYTRFSLARQVDGDN****SHVEMKLA****ADEEENADNNMKASVRKPKR***  
*FNGRLCFAAIALVIFFLIGFMSGYLGYCKRVEQKEECVKLAETEE****TDKSETMETEDVPT***  
*SSRLYWADLKTLLSEKLNSIEFADTIKQLSQNTYTPREAGSQKDESLAYYIENQFHEFKFS*  
*KVWRDEHYVKIQVKSSIGQNMVTIVQSNGNLDPVESPEGYVAFSKPTEVSGKLVHA*  
***NFGTKKDFEELS****YSVNGSLVIVRAGEITFAEKVANAQSFNAIGVLIYMDKNKFPVVE*  
***ADLALFGHAHLGTGDPYTPGFPSFNHTQFPQSQSSGLPNIPVQTISR******AAAEKLF******FGKM***  
***EGSCPARWNIDSSCKLELSQNQNVLIVKN****VLKERRILNIFGVIKGYEEDRYVVG*  
*QRDALGAGVAAKSSVGTGLLLKLAQVFSDMISKDGFPRPSRIIFASWTAGDFGAVGATE*  
*WLEGYLSSLHLKAFTYINLDKVVLTGTSNFKVSASPLLYTLMGKIMQDVKHPVDGKSLY*  
*RDSNWISKVEKLSFDNAAYPFLAYSGIPAVSFCFCEADADYPYLGTRLDTYEALTQKVPO*  
*LNQMVRTAAEVAGQLIKLTHDVELNLDYEMYSKLLSFMKDLNQFKTDIRDMLGSLQ*  
*WLYSARGDYFRATSRLTTDFHNAEKTNRFVMREINDRIMKVEYHFLSPYVSPRESPFRHI*  
*FWGSGSHTLSALVENLKLRLQKNITAFNETLFRNQLALATWTIQGVANALSGDIWNIDNE*  
***F***

[0121]

[0122]

서열 번호:6: 인간 TfR 단백질 서열 (Uniprot P02786) (이탤릭체 부분은 세포질 도메인을 나타내고, 굵은 부분은 막 관통 도메인을 나타내고, 회색 부분은 세포 외 도메인을 나타내고, 그리고 굵고 밑줄 친 부분은 정점 도메인을 나타낸다)



MMDQARSAFSNLFGGEPLSYTRFSLARQVDGDNHVMKLAVIDEENADNNTKANVTKPKR  
CSGSICYGTIAVIVFFLIGFMIGYLGKGVKTECERLAGTESPVREEPGEDFPAARR  
LYWDDLKRKLSEKLDSTDFGTIKLLNENSYPREAGSQKDENLALYVENQFREFKLSK  
VWRDQHFVKIQVKDS AQNSVIIVDKNGRLVYLVENPGGYVAYSKAATVTGKLVHAN  
FGTKKDFEDLYTPVNGSIVIVRAGKITFAEKVANAESLNAIGVLIYMDQTKFPIVNA  
ELSFFGHAHLGTGDPYTPGFPSFNHTQFPPSRSSGLPNIPVQTISRAAA EKLFGNME  
GDCPSDWKTDSTCRMVTSSESKNVKLT VSNVLKEIKILNIFGVKGFVEPDHYVVVGAQ  
RDAWGPGAAGSGVGTALLKLAQMFSMDMVLKDGFPSPRSIIFASWSAGDFGSGVATEW  
LEGYLSSLHLKAFTYINLDKAVLGTSNFKVSASPLLYTLIEKTMQNVKHPVTGQFLYQDS  
NWASKVEKLTLDNAAFPFLAYSIGIPAVSFCFCEIDTYPYLGTTMDTYKELIERIPELNKV  
ARAAAEVAGQFVIKLT HDVELNLDYERYNSQLLSFVRDLNQYRADIKEMGLSLQWLYS  
ARGDFFRATSRLLTDFGNAEKTDRFVMKKLNDVRMRVEYHFLSPYVSPKESPRHVFV  
GSGSHTLPALLENLKLKQKQNGAFNETLFRNQLALATWTIQGAANALSGDVWDIDNEF

[0123]

[0124]

서열 번호:7: 마카카 무라타(macaca mulatta) (붉은털원숭이 원숭이) TfR의 정점 도메인 (NCBI 참고 서열 NP\_001244232.1); 이것은 고유의 인간 TfR의 정점 도메인에 대하여 95% 동일함

AQNSVIIVDKNGGLVYLVENPGGYVAYSKAATVTGKLVHANFGTKKDFEDLSPVNGS  
IVIVRAGKITFAEKVANAESLNAIGVLIYMDQTKFPIVKADLSFFGHAHLGTGDPYTPGFP  
SFNHTQFPPSQSSGLPNIPVQTISRAAA EKLFGNMEGDCPSDWKTDSTCKMVTSENKSV  
KLT VSN

[0125]

[0126]

서열 번호:8: 침팬지 TfR의 정점 도메인 (NCBI 참고 서열 XP\_003310238.1); 이것은 고유의 인간 TfR의 정점 도메인에 대하여 98% 동일함

AQNSVIIVDKNGSLVYLVENPGGYVAYSKAATVTGKLVHANFGTKKDFEDLHTPVNGSI  
VIVRAGKITFAEKVANAESLNAIGVLIYMDQTKFPIVNAELSFFGHAHLGTGDPYTPGFP  
SFNHTQFPPSRSSGLPNIPVQTVSRAAA EKLFGNMEGDCPSDWKTDSTCRMVTSSESKNV  
KLT VSN

[0127]

[0128]

서열 번호:9: 마카카 파쉬쿨라리스(macaca fascicularis)(시노물구스 원숭이) TfR의 정점 도메인 (NCBI 참고 서열 XP\_005545315); 이것은 고유의 인간 TfR의 정점 도메인에 대하여 96% 동일함

AQNSVIIVDKNGGLVYLVENPGGYVAYSKAATVTGKLVHANFGTKKDFEDLSPVNGS  
IVIVRAGKITFAEKVANAESLNAIGVLIYMDQTKFPIVKADLSFFGHAHLGTGDPYTPGFP  
SFNHTQFPPSQSSGLPNIPVQTISRAAA EKLFGNMEGDCPSDWKTDSTCKMVTSENKSV  
KLT VSN

[0129]

[0130]

서열 번호:10

[0131]

GAATACATACACTCCTCGTGAGG

[0132]

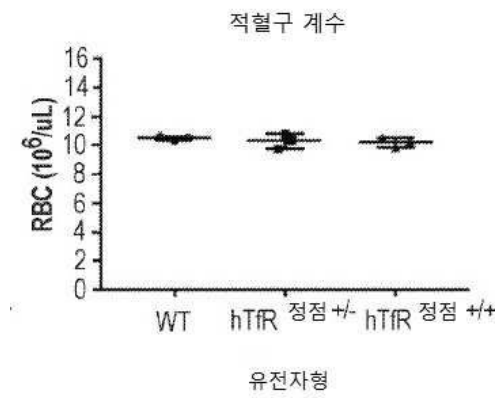
서열 번호:11

[0133]

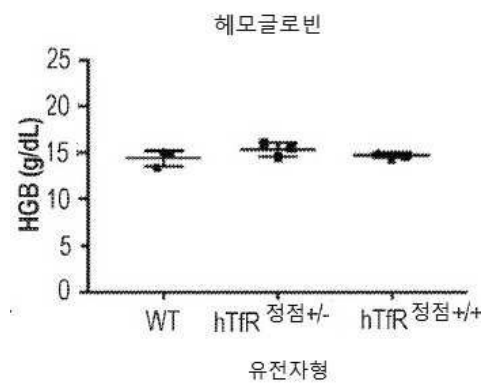
AGAAGAATACTTAACATCTTTGG

도면

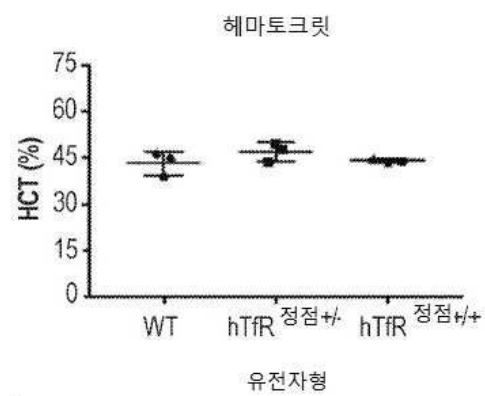
도면1a



도면1b

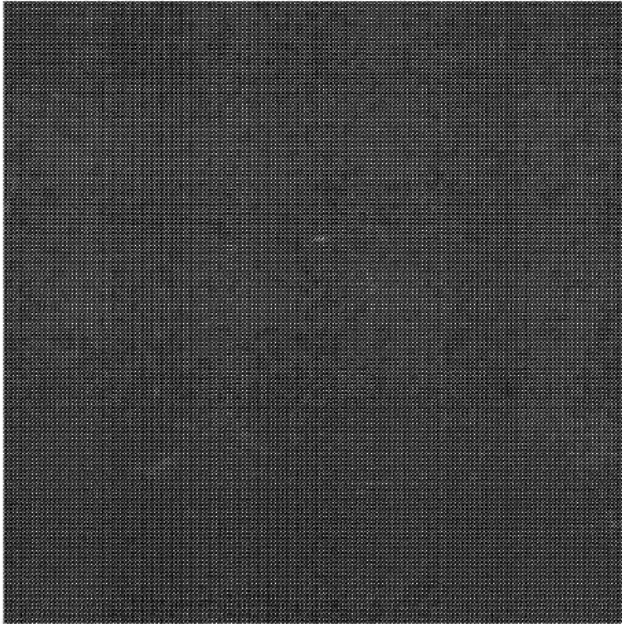


도면1c



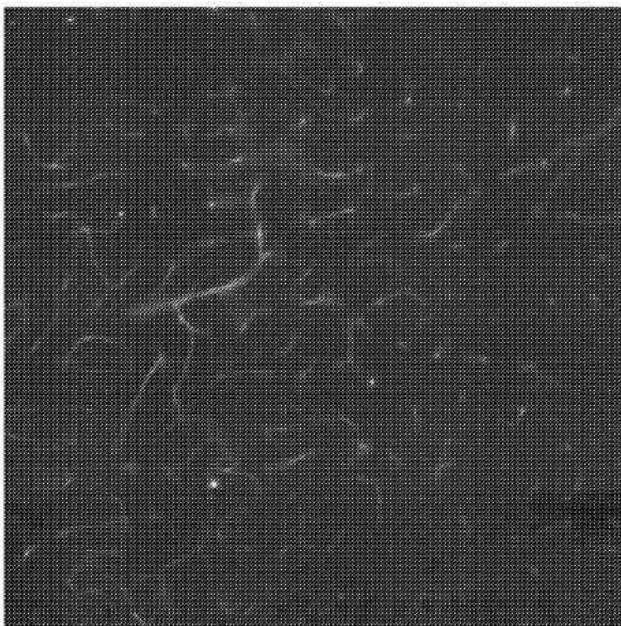
도면2a

IV 5 mg/kg 항-TfR



도면2b

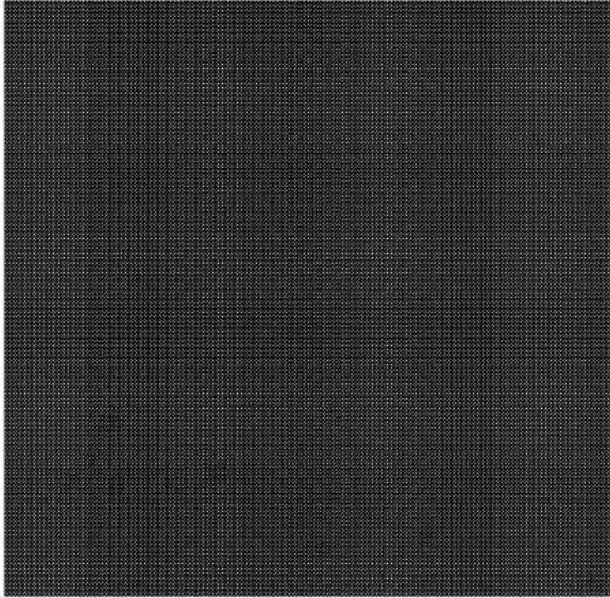
IV 5 mg/kg 항-TfR





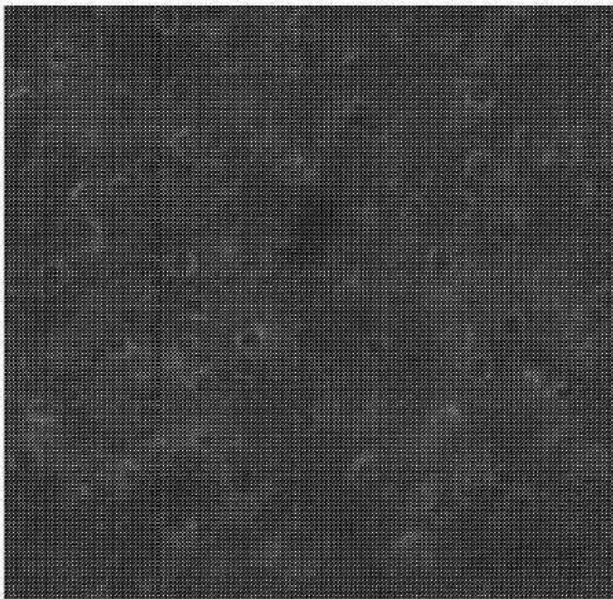
도면3a

IV 50 mg/kg 항-BACE1

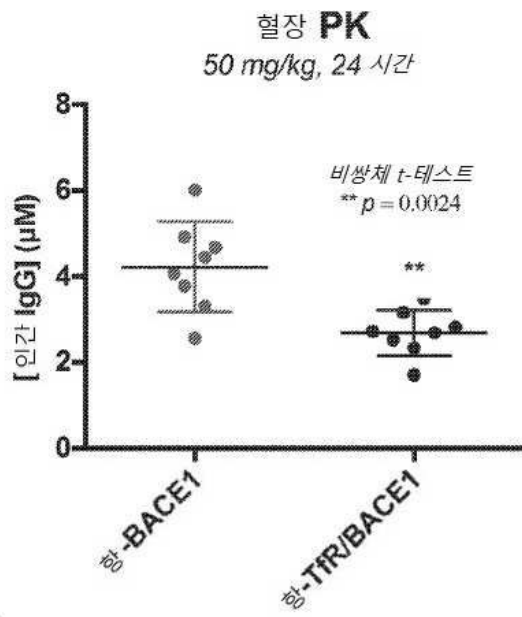


도면3b

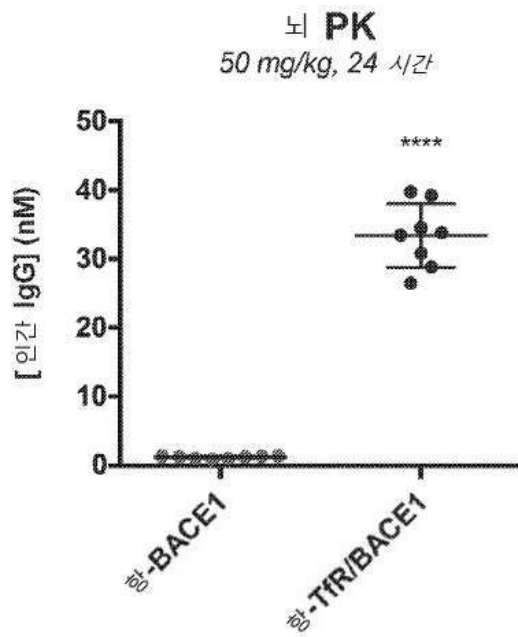
IV 50 mg/kg 항-TfR/BACE1



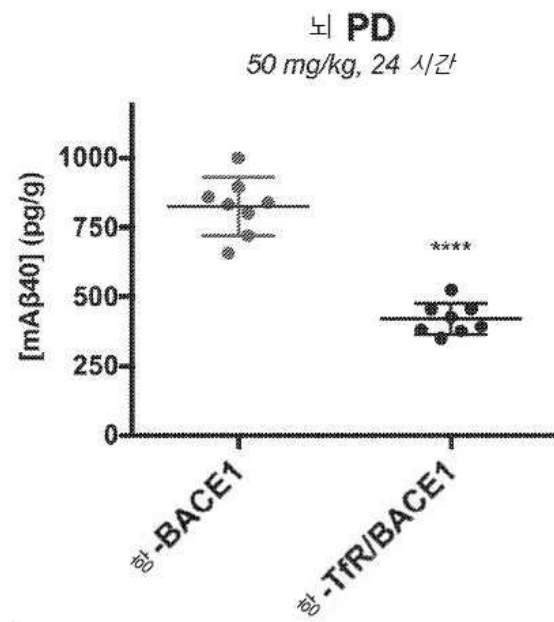
도면4a



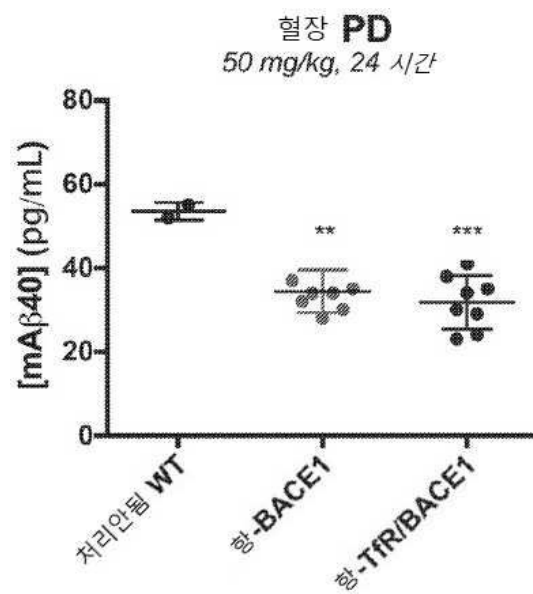
도면4b



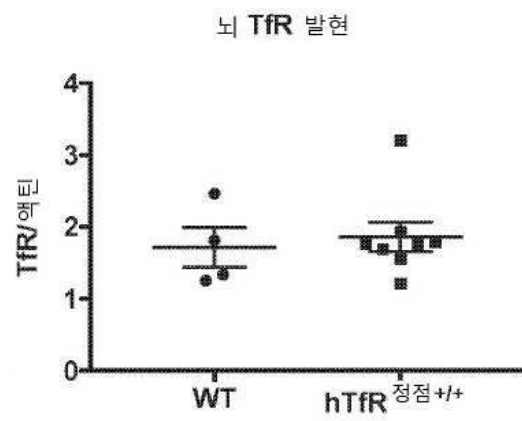
도면4c



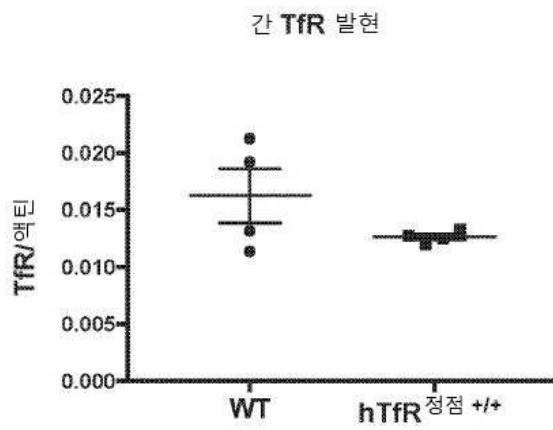
도면4d



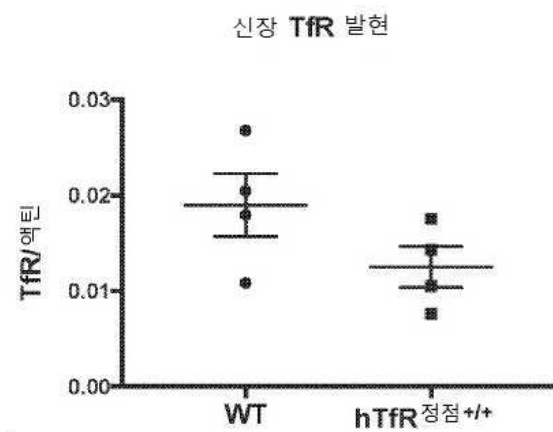
도면5a



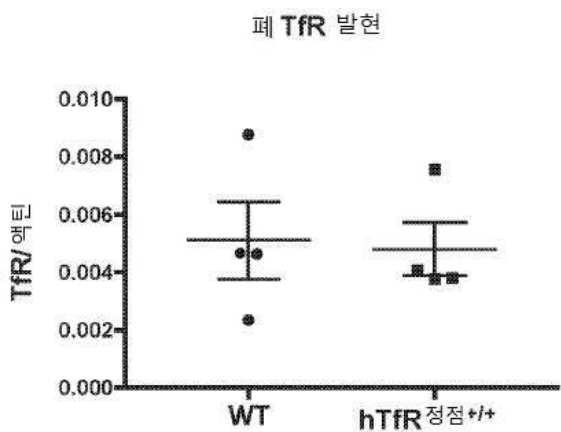
도면5b



도면5c



도면5d



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Denali Therapeutics Inc.  
Dennis, Mark S.  
Silverman, Adam P.  
Zuchero, Joy Yu

<120> TRANSFERRIN RECEPTOR TRANSGENIC MODELS  
<130> 1076191  
<150> US 62/460,692  
<151> 2017-02-17  
<150> US 62/543,559  
<151> 2017-08-10  
<150> US 62/543,658  
<151> 2017-08-10  
<150> US 62/583,314  
<151> 2017-11-08  
<160> 11  
<170> PatentIn version 3.5  
<210> 1  
<211> 184  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
<400> 1



Ala Gln Asn Ser Val Ile Ile Val Asp Lys Asn Gly Arg Leu Val Tyr

1 5 10 15

Leu Val Glu Asn Pro Gly Gly Tyr Val Ala Tyr Ser Lys Ala Ala Thr

20 25 30

Val Thr Gly Lys Leu Val His Ala Asn Phe Gly Thr Lys Lys Asp Phe

35 40 45

Glu Asp Leu Tyr Thr Pro Val Asn Gly Ser Ile Val Ile Val Arg Ala

50 55 60

Gly Lys Ile Thr Phe Ala Glu Lys Val Ala Asn Ala Glu Ser Leu Asn

65 70 75 80

Ala Ile Gly Val Leu Ile Tyr Met Asp Gln Thr Lys Phe Pro Ile Val

85 90 95

Asn Ala Glu Leu Ser Phe Phe Gly His Ala His Leu Gly Thr Gly Asp

100 105 110

Pro Tyr Thr Pro Gly Phe Pro Ser Phe Asn His Thr Gln Phe Pro Pro

115 120 125

Ser Arg Ser Ser Gly Leu Pro Asn Ile Pro Val Gln Thr Ile Ser Arg

130 135 140

Ala Ala Ala Glu Lys Leu Phe Gly Asn Met Glu Gly Asp Cys Pro Ser

145 150 155 160

Asp Trp Lys Thr Asp Ser Thr Cys Arg Met Val Thr Ser Glu Ser Lys

165 170 175

Asn Val Lys Leu Thr Val Ser Asn

180

<210> 2

<211> 552

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

gctcagaact ccgtgatcat cgtggataag aacggccggc tgggtgtacct ggtggagaac 60

cctggcggat acgtggctta ctctaaggcc gctaccgtga caggcaagct ggtgcacgcc 120

aacttcggaa ccaagaagga ctttgaggat ctgtacacac cagtgaacgg ctctatcgtg 180  
atcgtgcgcg ctggaaagat caccttcgcc gagaaggtgg ctaacgccga gaggctgaac 240  
gccatcggcg tgctgatcta catggatcag acaaagtttc ccatcgtgaa cgctgagctg 300  
tctttctttg gacacgtca cctgggcacc ggagacccat acacaccgg attccctagc 360  
ttaaccaca cccagttccc ccttccagg tctagcggac tgccaaacat ccccgtagc 420  
acaatcagca gagccgtgc cgagaagctg tttggcaaca tggagggaga ctgccctcc 480

gattggaaga ccgactctac atgtaggatg gtgacctcg agtcaaaaaa tgtcaaactc 540  
accgtgtcca at 552

<210> 3

<211> 763

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic chimeric transferrin receptor (TfR) polypeptide  
sequence

<220><221> DOMAIN

<222> (1)..(67)

<223> Cytoplasmic Domain

<220><221> DOMAIN

<222> (68)..(88)

<223> Transmembrane Domain

<220><221> DOMAIN

<222> (89)..(763)

<223> Extracellular Domain

<220><221> DOMAIN

<222> (198)..(381)

<223> Apical Domain

<400> 3

Met Met Asp Gln Ala Arg Ser Ala Phe Ser Asn Leu Phe Gly Gly Glu

1 5 10 15

Pro Leu Ser Tyr Thr Arg Phe Ser Leu Ala Arg Gln Val Asp Gly Asp

20 25 30

Asn Ser His Val Glu Met Lys Leu Ala Ala Asp Glu Glu Glu Asn Ala

35 40 45

Asp Asn Asn Met Lys Ala Ser Val Arg Lys Pro Lys Arg Phe Asn Gly

50

55

60

Arg Leu Cys Phe Ala Ala Ile Ala Leu Val Ile Phe Phe Leu Ile Gly

65

70

75

80

Phe Met Ser Gly Tyr Leu Gly Tyr Cys Lys Arg Val Glu Gln Lys Glu

85

90

95

Glu Cys Val Lys Leu Ala Glu Thr Glu Glu Thr Asp Lys Ser Glu Thr

100

105

110

Met Glu Thr Glu Asp Val Pro Thr Ser Ser Arg Leu Tyr Trp Ala Asp

115

120

125

Leu Lys Thr Leu Leu Ser Glu Lys Leu Asn Ser Ile Glu Phe Ala Asp

130

135

140

Thr Ile Lys Gln Leu Ser Gln Asn Thr Tyr Thr Pro Arg Glu Ala Gly

145

150

155

160

Ser Gln Lys Asp Glu Ser Leu Ala Tyr Tyr Ile Glu Asn Gln Phe His

165

170

175

Glu Phe Lys Phe Ser Lys Val Trp Arg Asp Glu His Tyr Val Lys Ile

180

185

190

Gln Val Lys Ser Ser Ala Gln Asn Ser Val Ile Ile Val Asp Lys Asn

195

200

205

Gly Arg Leu Val Tyr Leu Val Glu Asn Pro Gly Gly Tyr Val Ala Tyr

210

215

220

Ser Lys Ala Ala Thr Val Thr Gly Lys Leu Val His Ala Asn Phe Gly

225

230

235

240

Thr Lys Lys Asp Phe Glu Asp Leu Tyr Thr Pro Val Asn Gly Ser Ile

245

250

255

Val Ile Val Arg Ala Gly Lys Ile Thr Phe Ala Glu Lys Val Ala Asn

260

265

270

Ala Glu Ser Leu Asn Ala Ile Gly Val Leu Ile Tyr Met Asp Gln Thr

275

280

285

Lys Phe Pro Ile Val Asn Ala Glu Leu Ser Phe Phe Gly His Ala His

290                      295                      300  
 Leu Gly Thr Gly Asp Pro Tyr Thr Pro Gly Phe Pro Ser Phe Asn His  
  
 305                      310                      315                      320  
 Thr Gln Phe Pro Pro Ser Arg Ser Ser Gly Leu Pro Asn Ile Pro Val  
                          325                      330                      335  
 Gln Thr Ile Ser Arg Ala Ala Ala Glu Lys Leu Phe Gly Asn Met Glu  
                          340                      345                      350  
 Gly Asp Cys Pro Ser Asp Trp Lys Thr Asp Ser Thr Cys Arg Met Val  
                          355                      360                      365  
 Thr Ser Glu Ser Lys Asn Val Lys Leu Thr Val Ser Asn Val Leu Lys  
  
 370                      375                      380  
 Glu Arg Arg Ile Leu Asn Ile Phe Gly Val Ile Lys Gly Tyr Glu Glu  
 385                      390                      395                      400  
 Pro Asp Arg Tyr Val Val Val Gly Ala Gln Arg Asp Ala Leu Gly Ala  
                          405                      410                      415  
 Gly Val Ala Ala Lys Ser Ser Val Gly Thr Gly Leu Leu Leu Lys Leu  
                          420                      425                      430  
 Ala Gln Val Phe Ser Asp Met Ile Ser Lys Asp Gly Phe Arg Pro Ser  
  
 435                      440                      445  
 Arg Ser Ile Ile Phe Ala Ser Trp Thr Ala Gly Asp Phe Gly Ala Val  
                          450                      455                      460  
 Gly Ala Thr Glu Trp Leu Glu Gly Tyr Leu Ser Ser Leu His Leu Lys  
 465                      470                      475                      480  
 Ala Phe Thr Tyr Ile Asn Leu Asp Lys Val Val Leu Gly Thr Ser Asn  
                          485                      490                      495  
 Phe Lys Val Ser Ala Ser Pro Leu Leu Tyr Thr Leu Met Gly Lys Ile  
  
 500                      505                      510  
 Met Gln Asp Val Lys His Pro Val Asp Gly Lys Ser Leu Tyr Arg Asp  
                          515                      520                      525  
 Ser Asn Trp Ile Ser Lys Val Glu Lys Leu Ser Phe Asp Asn Ala Ala  
                          530                      535                      540

Tyr Pro Phe Leu Ala Tyr Ser Gly Ile Pro Ala Val Ser Phe Cys Phe  
 545                      550                      555                      560  
 Cys Glu Asp Ala Asp Tyr Pro Tyr Leu Gly Thr Arg Leu Asp Thr Tyr  
  
                     565                      570                      575  
 Glu Ala Leu Thr Gln Lys Val Pro Gln Leu Asn Gln Met Val Arg Thr  
                     580                      585                      590  
 Ala Ala Glu Val Ala Gly Gln Leu Ile Ile Lys Leu Thr His Asp Val  
                     595                      600                      605  
 Glu Leu Asn Leu Asp Tyr Glu Met Tyr Asn Ser Lys Leu Leu Ser Phe  
                     610                      615                      620  
 Met Lys Asp Leu Asn Gln Phe Lys Thr Asp Ile Arg Asp Met Gly Leu  
  
 625                      630                      635                      640  
 Ser Leu Gln Trp Leu Tyr Ser Ala Arg Gly Asp Tyr Phe Arg Ala Thr  
                     645                      650                      655  
 Ser Arg Leu Thr Thr Asp Phe His Asn Ala Glu Lys Thr Asn Arg Phe  
                     660                      665                      670  
 Val Met Arg Glu Ile Asn Asp Arg Ile Met Lys Val Glu Tyr His Phe  
                     675                      680                      685  
 Leu Ser Pro Tyr Val Ser Pro Arg Glu Ser Pro Phe Arg His Ile Phe  
  
                     690                      695                      700  
 Trp Gly Ser Gly Ser His Thr Leu Ser Ala Leu Val Glu Asn Leu Lys  
 705                      710                      715                      720  
 Leu Arg Gln Lys Asn Ile Thr Ala Phe Asn Glu Thr Leu Phe Arg Asn  
                     725                      730                      735  
 Gln Leu Ala Leu Ala Thr Trp Thr Ile Gln Gly Val Ala Asn Ala Leu  
                     740                      745                      750  
 Ser Gly Asp Ile Trp Asn Ile Asp Asn Glu Phe  
                     755                      760

<210> 4  
 <211> 2329  
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic donor DNA sequence

<220><221> misc\_feature

<222> (1)..(817)

<223> left homology arm

<220><221> misc\_feature

<222> (821)..(1522)

<223> codon-optimized sequence

<220><221> misc\_feature

<222> (941)..(1492)

<223> human apical domain

<220><221> misc\_feature

<222> (1523)..(2329)

<223> righ homology arm

<400> 4

ctatacagat atataaggat ggggcttttt tttttaatt tttaaaaaag atttgtttat 60

tattatatgt aagtacactg tagctgtctt cagacactcc agaagagggc atcagatctc 120

attacagatg gtgtgagct accatgtggt cactgggatt tgaactcagg accttcagaa 180

gagcagtcag tgctcttaac tgataagtta ataataagtt aactgataag gtaataaagg 240

tcccctatga aaagggttca gacccaaaga gtcagagatc cacaggttga gaacctcctg 300

ccctaaatct tgttgctctc cttattcaag accactcctg ttgcagttgc tcttaagcat 360

gagtatgctc cttctgaaa gtctccatag cagccatctc tccagcccca gagtgaggct 420

tttaaggaa tcttcatgat aaatagaatt tttaaaaaag taactgaagt tacttaagg 480

gttaaggtag attttattcc cttagtaact ggtaaatcta gcagttttga gtcatacttc 540

atttatcttg actttgaaga gtaagatatt aaaacaattt gcttgatcct tgaagtaagt 600

atttaaatag acattttaat gcagactttt tttagttgac tgggtggtgtt gcacgtggtc 660

aatccaagta ctcatgggag gcagaggcag gaggatctct ctctagacca gcctggtcta 720

tagagcaagt tccaggacag ccagggttac acagaaacct tgtttcaaac aagactttta 780

tccttccagg cagctgagcc agaatacata cactcctagg gaagctggtt cacagaagga 840

cgaatccctg gcatactaca tcgagaatca gtttcacgag ttcaagttaa gcaaagtctg 900

gagagatgag cactacgtga agatccagggt gaagagctcc gctcagaact ccgtgatcat 960

cgtggataag aacggccggc tgggtgtacct ggtggagaac cctggcggat acgtggctta 1020

ctctaaggcc gctaccgtga caggcaagct ggtgcacgcc aacttcggaa ccaagaagga 1080  
ctttgaggat ctgtacacac cagtgaacgg ctctatcgtg atcgtgcgcg ctggaaagat 1140  
caccttcgcc gagaaggtgg ctaacgccga gagcctgaac gccatcggcg tgctgatcta 1200  
catggatcag acaaagtttc ccatcgtgaa cgctgagctg tctttctttg gacacgtca 1260  
cctgggcacc ggagacccat acacacccgg attccctagc ttttaaccaca cccagttccc 1320

cccttcagg tctageggac tgccaaacat ccccgctcag acaatcagca gagccgctgc 1380  
cgagaagctg ttiggcaaca tggagggaga ctgcccctcc gattggaaga ccgactctac 1440  
atgtaggatg gtgacctcg agtcaaaaaa tgtcaaactc accgtgtcca atgtgctgaa 1500  
agaacgacgc atcctgaata tctttggagt tattaaaggt tatgaggaa caggtaaaga 1560  
cctgctttgt acittttcac tttactgttt tgcttactgt agataggtct agtgcaggaa 1620  
ggagaaggat gctagcttgg catgaactgc tatatcttgt ttgtcctaata gtgaactttg 1680  
taatatatgt gtatataaca cataatatgg ccatgtaagt gtatggagag gccagagtta 1740

agtattaaat atctttctgt aatcatttaa aattttacat atgaaggtca gtgaacagat 1800  
tgaaggagtt ttgtccaggt gggacttgga tctaaatfff ttacaatgcc tggcagcaaa 1860  
caccttttta atcaactgag ctgtctcccc aaataaagtg aatgtgatat cagcttgtgg 1920  
ataatfffft ttgtttgctt tgataagtgg ttttcttaca ggatcacata ccagttctgt 1980  
ccatagcatt aaacaaacat aactgtcatg cagtagatta atgtgcaggg cacatccaac 2040  
agtcacattt attaatagga caaaaagttg gaccttatat gtagcacacc tataattcca 2100  
gtgctaggaa gatccgggta ggagatcctt agttcggtgc tacttagtga gggtttgttt 2160

caaaaaacaa aagctatgat ggtgtgttgc cttttttctt ttagaccgtt atgtttagt 2220  
aggagcccag agagacgctt tgggtgctgg tgttcggcg aagtcagtg tgggaacagg 2280  
tcttctgttg aaacttgccc aagtattctc agatatgatt tcaaaaggt 2329

<210> 5  
<211> 763  
<212> PRT  
<213> Mus musculus  
<220><221> DOMAIN  
<222> (1)..(67)  
<223> cytoplasmic domain  
<220><221> DOMAIN  
<222> (68)..(88)  
<223> transmembrane domain

<220><221> DOMAIN

<222> (89)..(763)

<223> extracellular domain

<220><221> DOMAIN

<222> (199)..(381)

<223> apical domain

<400> 5

Met Met Asp Gln Ala Arg Ser Ala Phe Ser Asn Leu Phe Gly Gly Glu

1 5 10 15

Pro Leu Ser Tyr Thr Arg Phe Ser Leu Ala Arg Gln Val Asp Gly Asp

20 25 30

Asn Ser His Val Glu Met Lys Leu Ala Ala Asp Glu Glu Glu Asn Ala

35 40 45

Asp Asn Asn Met Lys Ala Ser Val Arg Lys Pro Lys Arg Phe Asn Gly

50 55 60

Arg Leu Cys Phe Ala Ala Ile Ala Leu Val Ile Phe Phe Leu Ile Gly

65 70 75 80

Phe Met Ser Gly Tyr Leu Gly Tyr Cys Lys Arg Val Glu Gln Lys Glu

85 90 95

Glu Cys Val Lys Leu Ala Glu Thr Glu Glu Thr Asp Lys Ser Glu Thr

100 105 110

Met Glu Thr Glu Asp Val Pro Thr Ser Ser Arg Leu Tyr Trp Ala Asp

115 120 125

Leu Lys Thr Leu Leu Ser Glu Lys Leu Asn Ser Ile Glu Phe Ala Asp

130 135 140

Thr Ile Lys Gln Leu Ser Gln Asn Thr Tyr Thr Pro Arg Glu Ala Gly

145 150 155 160

Ser Gln Lys Asp Glu Ser Leu Ala Tyr Tyr Ile Glu Asn Gln Phe His

165 170 175

Glu Phe Lys Phe Ser Lys Val Trp Arg Asp Glu His Tyr Val Lys Ile

180 185 190



Gln Val Lys Ser Ser Ile Gly Gln Asn Met Val Thr Ile Val Gln Ser  
195 200 205

Asn Gly Asn Leu Asp Pro Val Glu Ser Pro Glu Gly Tyr Val Ala Phe  
210 215 220

Ser Lys Pro Thr Glu Val Ser Gly Lys Leu Val His Ala Asn Phe Gly  
225 230 235 240

Thr Lys Lys Asp Phe Glu Glu Leu Ser Tyr Ser Val Asn Gly Ser Leu  
245 250 255

Val Ile Val Arg Ala Gly Glu Ile Thr Phe Ala Glu Lys Val Ala Asn  
260 265 270

Ala Gln Ser Phe Asn Ala Ile Gly Val Leu Ile Tyr Met Asp Lys Asn  
275 280 285

Lys Phe Pro Val Val Glu Ala Asp Leu Ala Leu Phe Gly His Ala His  
290 295 300

Leu Gly Thr Gly Asp Pro Tyr Thr Pro Gly Phe Pro Ser Phe Asn His  
305 310 315 320

Thr Gln Phe Pro Pro Ser Gln Ser Ser Gly Leu Pro Asn Ile Pro Val  
325 330 335

Gln Thr Ile Ser Arg Ala Ala Ala Glu Lys Leu Phe Gly Lys Met Glu  
340 345 350

Gly Ser Cys Pro Ala Arg Trp Asn Ile Asp Ser Ser Cys Lys Leu Glu  
355 360 365

Leu Ser Gln Asn Gln Asn Val Lys Leu Ile Val Lys Asn Val Leu Lys  
370 375 380

Glu Arg Arg Ile Leu Asn Ile Phe Gly Val Ile Lys Gly Tyr Glu Glu  
385 390 395 400

Pro Asp Arg Tyr Val Val Val Gly Ala Gln Arg Asp Ala Leu Gly Ala  
405 410 415

Gly Val Ala Ala Lys Ser Ser Val Gly Thr Gly Leu Leu Leu Lys Leu  
420 425 430

Ala Gln Val Phe Ser Asp Met Ile Ser Lys Asp Gly Phe Arg Pro Ser

435                      440                      445  
 Arg Ser Ile Ile Phe Ala Ser Trp Thr Ala Gly Asp Phe Gly Ala Val  
 450                      455                      460  
 Gly Ala Thr Glu Trp Leu Glu Gly Tyr Leu Ser Ser Leu His Leu Lys  
 465                      470                      475                      480  
 Ala Phe Thr Tyr Ile Asn Leu Asp Lys Val Val Leu Gly Thr Ser Asn  
 485                      490                      495  
 Phe Lys Val Ser Ala Ser Pro Leu Leu Tyr Thr Leu Met Gly Lys Ile  
  
 500                      505                      510  
 Met Gln Asp Val Lys His Pro Val Asp Gly Lys Ser Leu Tyr Arg Asp  
 515                      520                      525  
 Ser Asn Trp Ile Ser Lys Val Glu Lys Leu Ser Phe Asp Asn Ala Ala  
 530                      535                      540  
 Tyr Pro Phe Leu Ala Tyr Ser Gly Ile Pro Ala Val Ser Phe Cys Phe  
 545                      550                      555                      560  
 Cys Glu Asp Ala Asp Tyr Pro Tyr Leu Gly Thr Arg Leu Asp Thr Tyr  
  
 565                      570                      575  
 Glu Ala Leu Thr Gln Lys Val Pro Gln Leu Asn Gln Met Val Arg Thr  
 580                      585                      590  
 Ala Ala Glu Val Ala Gly Gln Leu Ile Ile Lys Leu Thr His Asp Val  
 595                      600                      605  
 Glu Leu Asn Leu Asp Tyr Glu Met Tyr Asn Ser Lys Leu Leu Ser Phe  
 610                      615                      620  
 Met Lys Asp Leu Asn Gln Phe Lys Thr Asp Ile Arg Asp Met Gly Leu  
  
 625                      630                      635                      640  
 Ser Leu Gln Trp Leu Tyr Ser Ala Arg Gly Asp Tyr Phe Arg Ala Thr  
 645                      650                      655  
 Ser Arg Leu Thr Thr Asp Phe His Asn Ala Glu Lys Thr Asn Arg Phe  
 660                      665                      670  
 Val Met Arg Glu Ile Asn Asp Arg Ile Met Lys Val Glu Tyr His Phe  
 675                      680                      685

Leu Ser Pro Tyr Val Ser Pro Arg Glu Ser Pro Phe Arg His Ile Phe

690 695 700  
 Trp Gly Ser Gly Ser His Thr Leu Ser Ala Leu Val Glu Asn Leu Lys  
 705 710 715 720  
 Leu Arg Gln Lys Asn Ile Thr Ala Phe Asn Glu Thr Leu Phe Arg Asn  
 725 730 735  
 Gln Leu Ala Leu Ala Thr Trp Thr Ile Gln Gly Val Ala Asn Ala Leu  
 740 745 750  
 Ser Gly Asp Ile Trp Asn Ile Asp Asn Glu Phe  
 755 760

<210> 6  
 <211> 760  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <220><221> DOMAIN  
 <222> (1)..(67)  
 <223> cytoplasmic domain  
 <220><221> DOMAIN  
 <222> (68)..(89)  
 <223> transmembrane domain  
 <220><221> DOMAIN  
 <222> (90)..(760)  
 <223> extracellular domain  
 <220><221> DOMAIN  
 <222> (196)..(379)  
 <223> apical domain  
 <400> 6

Met Met Asp Gln Ala Arg Ser Ala Phe Ser Asn Leu Phe Gly Gly Glu  
 1 5 10 15  
 Pro Leu Ser Tyr Thr Arg Phe Ser Leu Ala Arg Gln Val Asp Gly Asp  
 20 25 30  
 Asn Ser His Val Glu Met Lys Leu Ala Val Asp Glu Glu Glu Asn Ala

35                      40                      45  
 Asp Asn Asn Thr Lys Ala Asn Val Thr Lys Pro Lys Arg Cys Ser Gly  
 50                      55                      60  
 Ser Ile Cys Tyr Gly Thr Ile Ala Val Ile Val Phe Phe Leu Ile Gly  
 65                      70                      75                      80  
 Phe Met Ile Gly Tyr Leu Gly Tyr Cys Lys Gly Val Glu Pro Lys Thr  
  
 85                      90                      95  
 Glu Cys Glu Arg Leu Ala Gly Thr Glu Ser Pro Val Arg Glu Glu Pro  
 100                      105                      110  
 Gly Glu Asp Phe Pro Ala Ala Arg Arg Leu Tyr Trp Asp Asp Leu Lys  
 115                      120                      125  
 Arg Lys Leu Ser Glu Lys Leu Asp Ser Thr Asp Phe Thr Gly Thr Ile  
 130                      135                      140  
 Lys Leu Leu Asn Glu Asn Ser Tyr Val Pro Arg Glu Ala Gly Ser Gln  
  
 145                      150                      155                      160  
 Lys Asp Glu Asn Leu Ala Leu Tyr Val Glu Asn Gln Phe Arg Glu Phe  
 165                      170                      175  
 Lys Leu Ser Lys Val Trp Arg Asp Gln His Phe Val Lys Ile Gln Val  
 180                      185                      190  
 Lys Asp Ser Ala Gln Asn Ser Val Ile Ile Val Asp Lys Asn Gly Arg  
 195                      200                      205  
 Leu Val Tyr Leu Val Glu Asn Pro Gly Gly Tyr Val Ala Tyr Ser Lys  
  
 210                      215                      220  
 Ala Ala Thr Val Thr Gly Lys Leu Val His Ala Asn Phe Gly Thr Lys  
 225                      230                      235                      240  
 Lys Asp Phe Glu Asp Leu Tyr Thr Pro Val Asn Gly Ser Ile Val Ile  
 245                      250                      255  
 Val Arg Ala Gly Lys Ile Thr Phe Ala Glu Lys Val Ala Asn Ala Glu  
 260                      265                      270  
 Ser Leu Asn Ala Ile Gly Val Leu Ile Tyr Met Asp Gln Thr Lys Phe  
  
 275                      280                      285

Pro Ile Val Asn Ala Glu Leu Ser Phe Phe Gly His Ala His Leu Gly  
290 295 300

Thr Gly Asp Pro Tyr Thr Pro Gly Phe Pro Ser Phe Asn His Thr Gln  
305 310 315 320

Phe Pro Pro Ser Arg Ser Ser Gly Leu Pro Asn Ile Pro Val Gln Thr  
325 330 335

Ile Ser Arg Ala Ala Ala Glu Lys Leu Phe Gly Asn Met Glu Gly Asp  
340 345 350

Cys Pro Ser Asp Trp Lys Thr Asp Ser Thr Cys Arg Met Val Thr Ser  
355 360 365

Glu Ser Lys Asn Val Lys Leu Thr Val Ser Asn Val Leu Lys Glu Ile  
370 375 380

Lys Ile Leu Asn Ile Phe Gly Val Ile Lys Gly Phe Val Glu Pro Asp  
385 390 395 400

His Tyr Val Val Val Gly Ala Gln Arg Asp Ala Trp Gly Pro Gly Ala  
405 410 415

Ala Lys Ser Gly Val Gly Thr Ala Leu Leu Leu Lys Leu Ala Gln Met  
420 425 430

Phe Ser Asp Met Val Leu Lys Asp Gly Phe Gln Pro Ser Arg Ser Ile  
435 440 445

Ile Phe Ala Ser Trp Ser Ala Gly Asp Phe Gly Ser Val Gly Ala Thr  
450 455 460

Glu Trp Leu Glu Gly Tyr Leu Ser Ser Leu His Leu Lys Ala Phe Thr  
465 470 475 480

Tyr Ile Asn Leu Asp Lys Ala Val Leu Gly Thr Ser Asn Phe Lys Val  
485 490 495

Ser Ala Ser Pro Leu Leu Tyr Thr Leu Ile Glu Lys Thr Met Gln Asn  
500 505 510

Val Lys His Pro Val Thr Gly Gln Phe Leu Tyr Gln Asp Ser Asn Trp  
515 520 525

Ala Ser Lys Val Glu Lys Leu Thr Leu Asp Asn Ala Ala Phe Pro Phe

530 535 540  
 Leu Ala Tyr Ser Gly Ile Pro Ala Val Ser Phe Cys Phe Cys Glu Asp  
 545 550 555 560  
 Thr Asp Tyr Pro Tyr Leu Gly Thr Thr Met Asp Thr Tyr Lys Glu Leu  
 565 570 575  
 Ile Glu Arg Ile Pro Glu Leu Asn Lys Val Ala Arg Ala Ala Ala Glu  
 580 585 590  
 Val Ala Gly Gln Phe Val Ile Lys Leu Thr His Asp Val Glu Leu Asn

595 600 605  
 Leu Asp Tyr Glu Arg Tyr Asn Ser Gln Leu Leu Ser Phe Val Arg Asp  
 610 615 620  
 Leu Asn Gln Tyr Arg Ala Asp Ile Lys Glu Met Gly Leu Ser Leu Gln  
 625 630 635 640  
 Trp Leu Tyr Ser Ala Arg Gly Asp Phe Phe Arg Ala Thr Ser Arg Leu  
 645 650 655  
 Thr Thr Asp Phe Gly Asn Ala Glu Lys Thr Asp Arg Phe Val Met Lys

660 665 670  
 Lys Leu Asn Asp Arg Val Met Arg Val Glu Tyr His Phe Leu Ser Pro  
 675 680 685  
 Tyr Val Ser Pro Lys Glu Ser Pro Phe Arg His Val Phe Trp Gly Ser  
 690 695 700  
 Gly Ser His Thr Leu Pro Ala Leu Leu Glu Asn Leu Lys Leu Arg Lys  
 705 710 715 720  
 Gln Asn Asn Gly Ala Phe Asn Glu Thr Leu Phe Arg Asn Gln Leu Ala

725 730 735  
 Leu Ala Thr Trp Thr Ile Gln Gly Ala Ala Asn Ala Leu Ser Gly Asp  
 740 745 750  
 Val Trp Asp Ile Asp Asn Glu Phe  
 755 760

<210> 7

<211> 184

<212> PRT

<213> Macaca mulatta

<400> 7

Ala Gln Asn Ser Val Ile Ile Val Asp Lys Asn Gly Gly Leu Val Tyr

1 5 10 15

Leu Val Glu Asn Pro Gly Gly Tyr Val Ala Tyr Ser Lys Ala Ala Thr

20 25 30

Val Thr Gly Lys Leu Val His Ala Asn Phe Gly Thr Lys Lys Asp Phe

35 40 45

Glu Asp Leu Asp Ser Pro Val Asn Gly Ser Ile Val Ile Val Arg Ala

50 55 60

Gly Lys Ile Thr Phe Ala Glu Lys Val Ala Asn Ala Glu Ser Leu Asn

65 70 75 80

Ala Ile Gly Val Leu Ile Tyr Met Asp Gln Thr Lys Phe Pro Ile Val

85 90 95

Lys Ala Asp Leu Ser Phe Phe Gly His Ala His Leu Gly Thr Gly Asp

100 105 110

Pro Tyr Thr Pro Gly Phe Pro Ser Phe Asn His Thr Gln Phe Pro Pro

115 120 125

Ser Gln Ser Ser Gly Leu Pro Asn Ile Pro Val Gln Thr Ile Ser Arg

130 135 140

Ala Ala Ala Glu Lys Leu Phe Gly Asn Met Glu Gly Asp Cys Pro Ser

145 150 155 160

Asp Trp Lys Thr Asp Ser Thr Cys Lys Met Val Thr Ser Glu Asn Lys

165 170 175

Ser Val Lys Leu Thr Val Ser Asn

180

<210> 8

<211> 184

<212> PRT

<213> Pan troglodytes

<400> 8

Ala Gln Asn Ser Val Ile Ile Val Asp Lys Asn Gly Ser Leu Val Tyr



1                      5                      10                      15  
 Leu Val Glu Asn Pro Gly Gly Tyr Val Ala Tyr Ser Lys Ala Ala Thr  
  
                     20                      25                      30  
 Val Thr Gly Lys Leu Val His Ala Asn Phe Gly Thr Lys Lys Asp Phe  
                     35                      40                      45  
 Glu Asp Leu His Thr Pro Val Asn Gly Ser Ile Val Ile Val Arg Ala  
                     50                      55                      60  
 Gly Lys Ile Thr Phe Ala Glu Lys Val Ala Asn Ala Glu Ser Leu Asn  
 65                      70                      75                      80  
 Ala Ile Gly Val Leu Ile Tyr Met Asp Gln Thr Lys Phe Pro Ile Val  
  
                     85                      90                      95  
 Asn Ala Glu Leu Ser Phe Phe Gly His Ala His Leu Gly Thr Gly Asp  
                     100                      105                      110  
 Pro Tyr Thr Pro Gly Phe Pro Ser Phe Asn His Thr Gln Phe Pro Pro  
                     115                      120                      125  
 Ser Arg Ser Ser Gly Leu Pro Asn Ile Pro Val Gln Thr Val Ser Arg  
                     130                      135                      140  
 Ala Ala Ala Glu Lys Leu Phe Gly Asn Met Glu Gly Asp Cys Pro Ser  
  
 145                      150                      155                      160  
 Asp Trp Lys Thr Asp Ser Thr Cys Arg Met Val Thr Ser Glu Ser Lys  
                     165                      170                      175  
 Asn Val Lys Leu Thr Val Ser Asn  
                     180  
 <210> 9  
 <211> 184  
 <212> PRT  
 <213> *Macaca fascicularis*  
 <400> 9  
 Ala Gln Asn Ser Val Ile Ile Val Asp Lys Asn Gly Gly Leu Val Tyr  
 1                      5                      10                      15  
 Leu Val Glu Asn Pro Gly Gly Tyr Val Ala Tyr Ser Lys Ala Ala Thr

20                      25                      30  
 Val Thr Gly Lys Leu Val His Ala Asn Phe Gly Thr Lys Lys Asp Phe  
 35                      40                      45  
 Glu Asp Leu Asp Ser Pro Val Asn Gly Ser Ile Val Ile Val Arg Ala  
 50                      55                      60  
 Gly Lys Ile Thr Phe Ala Glu Lys Val Ala Asn Ala Glu Ser Leu Asn  
 65                      70                      75                      80  
 Ala Ile Gly Val Leu Ile Tyr Met Asp Gln Thr Lys Phe Pro Ile Val  
  
 85                      90                      95  
 Lys Ala Asp Leu Ser Phe Phe Gly His Ala His Leu Gly Thr Gly Asp  
 100                      105                      110  
 Pro Tyr Thr Pro Gly Phe Pro Ser Phe Asn His Thr Gln Phe Pro Pro  
 115                      120                      125  
 Ser Gln Ser Ser Gly Leu Pro Asn Ile Pro Val Gln Thr Ile Ser Arg  
 130                      135                      140  
 Ala Ala Ala Glu Lys Leu Phe Gly Asn Met Glu Gly Asp Cys Pro Ser  
  
 145                      150                      155                      160  
 Asp Trp Lys Thr Asp Ser Thr Cys Lys Met Val Thr Ser Glu Asn Lys  
 165                      170                      175  
 Ser Val Lys Leu Thr Val Ser Asn  
 180

<210> 10

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sgRNA sequence

<400> 10

gaatacatac actcctcgtg agg

23

<210> 11

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sgRNA sequence

<400> 11

agaagaatac ttaacatctt tgg

23