

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7669113号
(P7669113)

(45)発行日 令和7年4月28日(2025.4.28)

(24)登録日 令和7年4月18日(2025.4.18)

(51)国際特許分類

A 0 1 K	67/0278(2024.01)	A 0 1 K	67/0278	Z N A
C 1 2 N	5/0735(2010.01)	C 1 2 N	5/0735	
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10	
C 1 2 Q	1/02 (2006.01)	C 1 2 Q	1/02	
G 0 1 N	33/15 (2006.01)	G 0 1 N	33/15	Z

請求項の数 21 (全36頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2019-545322(P2019-545322)
 (86)(22)出願日 平成30年2月15日(2018.2.15)
 (65)公表番号 特表2020-510418(P2020-510418
 A)
 (43)公表日 令和2年4月9日(2020.4.9)
 (86)国際出願番号 PCT/US2018/018302
 (87)国際公開番号 WO2018/152285
 (87)国際公開日 平成30年8月23日(2018.8.23)
 審査請求日 令和3年1月29日(2021.1.29)
 審判番号 不服2023-8484(P2023-8484/J1)
 審判請求日 令和5年5月24日(2023.5.24)
 (31)優先権主張番号 62/460,692
 (32)優先日 平成29年2月17日(2017.2.17)
 (33)優先権主張国・地域又は機関
 米国(US)

最終頁に続く

(73)特許権者 518086619
 デナリ セラピューティクス インコーポ
 レイテッド
 Denali Therapeutics
 Inc.
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 940
 80, サウス サンフランシスコ, オ
 イスター ポイント ブールバード 161
 (74)代理人 100102978
 弁理士 清水 初志
 (74)代理人 100205707
 弁理士 小寺 秀紀
 (74)代理人 100160923
 弁理士 山口 裕孝
 (74)代理人 100119507

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 トランスフェリン受容体トランスジェニックモデル

(57)【特許請求の範囲】**【請求項1】**

血液脳関門 (BBB) 輸送を媒介することができるキメラトランスフェリン受容体 (TfR) ポリペプチドを発現するトランスジェニックマウスまたはラットであって、前記キメラTfRポリペプチドが、前記マウスまたはラットの天然TfRポリペプチドのトランスフェリン結合部位と、配列番号1と少なくとも90%同一のアミノ酸配列を有する異種頂端ドメインとを含み、ここで、該キメラTfRポリペプチドは、該マウスまたはラットの脳で発現する、前記トランスジェニックマウスまたはラット。

【請求項2】

前記異種頂端ドメインが、

- (a) 配列番号1と少なくとも95%同一のアミノ酸配列を有する、
- (b) 配列番号1のアミノ酸配列を含む、または
- (c) 配列番号7、配列番号8、もしくは配列番号9のアミノ酸配列を含む、
請求項1に記載のトランスジェニックマウスまたはラット。

【請求項3】

前記キメラTfRポリペプチドが、

- (a) 配列番号3との少なくとも95%のアミノ酸配列同一性を有する、または
- (b) 配列番号3のアミノ酸配列を含む、

請求項1または2に記載のトランスジェニックマウスまたはラット。

【請求項4】

キメラ T f R ポリペプチドの前記異種頂端ドメインをコードし、

(a) 配列番号 2 との少なくとも 9 0 % のヌクレオチド配列同一性を有する、

(b) 配列番号 2 との少なくとも 9 5 % のヌクレオチド配列同一性を有する、または

(c) 配列番号 2 のヌクレオチド配列を含む

ポリヌクレオチドを含む、請求項 1 に記載のトランスジェニックマウスまたはラット。

【請求項 5】

前記キメラ T f R ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含み、前記ポリヌクレオチドが、マウス T f R 遺伝子のエクソン及びイントロン、ならびに、マウス T f R 遺伝子の頂端ドメインに取って代わるように前記マウス T f R 遺伝子の第 4 のエクソンの後に配置された異種頂端ドメインをコードする核酸配列を含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載のトランスジェニックマウス。

10

【請求項 6】

(a) 前記マウスまたはラットのゲノムが、前記キメラ T f R ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む、

(b) 前記キメラ T f R ポリペプチドが、前記マウスまたはラットの脳で発現される、

(c) 脳、肝臓、腎臓、もしくは肺組織において、前記マウスまたはラットが、対応する同種の野生型マウスまたはラットの同じ組織における T f R の発現レベルの 2 0 % 以内のキメラ T f R ポリペプチドのレベルを発現する、

(d) 前記マウスまたはラットが、対応する同種の野生型マウスまたはラットにおける赤血球数、ヘモグロビンのレベル、もしくはヘマトクリットのレベルの 2 0 % 以内の赤血球数、ヘモグロビンのレベル、もしくはヘマトクリットのレベルを含む、かつ / または

20

(e) 前記トランスジェニックマウスまたはラットが、(i) 前記キメラ T f R ポリペプチドをコードする核酸配列についてホモ接合性である、もしくは(ii) 前記キメラ T f R ポリペプチドをコードする核酸配列についてヘテロ接合性である、

請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載のトランスジェニックマウスまたはラット。

【請求項 7】

マウスまたはラット由来の宿主細胞であって、該宿主細胞から生成されたトランスジェニックマウスまたはラットにおける血液脳関門 (BBB) 輸送を媒介することができるキメラトランスフェリン受容体 (T f R) ポリペプチドを発現する宿主細胞であり、ここで、該宿主細胞は、配列番号 1 と少なくとも 9 0 % 同一のアミノ酸配列を有する異種頂端ドメインと、前記マウスまたはラットの天然 T f R ポリペプチドのトランスフェリン結合部位とを含み、ここで、該キメラ T f R ポリペプチドは、該宿主細胞から生成される該トランスジェニックマウスまたはラットの脳で発現する、宿主細胞。

30

【請求項 8】

(a) 前記異種頂端ドメインが、

(i) 配列番号 1 と少なくとも 9 5 % 同一のアミノ酸配列を有する、

(ii) 配列番号 1 のアミノ酸配列を含む、もしくは

(iii) 配列番号 7 、配列番号 8 、もしくは配列番号 9 のアミノ酸配列を含む、または

40

(b) 前記宿主細胞が、前記宿主細胞内の前記異種頂端ドメインをコードし、

(i) 配列番号 2 との少なくとも 9 0 % のヌクレオチド配列同一性を有する、

(ii) 配列番号 2 との少なくとも 9 5 % のヌクレオチド配列同一性を有する、もしくは

(iii) 配列番号 2 のヌクレオチド配列を含む

ポリヌクレオチドを含む、

請求項 7 に記載の宿主細胞。

【請求項 9】

(a) 前記宿主細胞がマウス細胞である、

(b) 前記宿主細胞がエクスピボにある、かつ / または

(c) 前記宿主細胞のゲノムが、前記マウスまたはラットの天然 T f R ポリペプチドの

50

頂端ドメインの欠失を含む、
請求項 7 または 8 に記載の宿主細胞。

【請求項 10】

前記宿主細胞がマウス細胞であり、かつ、前記宿主細胞内の前記異種頂端ドメインをコードするポリヌクレオチドが、マウス T f R 遺伝子の第 4 のエクソンの後に配置されている、請求項 9 に記載の宿主細胞。

【請求項 11】

前記宿主細胞がエクスピボにあり、かつ、前記宿主細胞が胚性幹細胞である、請求項 9 または 10 に記載の宿主細胞。

【請求項 12】

血液脳関門を通過する頂端ドメイン結合ポリペプチド (A D B P) をスクリーニングまたはモニタリングする方法であって、

(a) A D B P を、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載のマウスまたはラットに投与するステップと、

(b) 前記マウスまたはラットの脳内の前記 A D B P の存在または活性を測定するステップと
を含む、方法。

【請求項 13】

前記 A D B P が、エフェクター分子と結合している、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

前記エフェクター分子が、小分子、R N A 、D N A 、またはポリペプチドである、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

前記ポリペプチドが、抗体またはその抗原結合フラグメントである、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】

(a) 前記測定するステップが、

(i) 前記マウスまたはラットの脳または脳組織を、前記エフェクター分子に結合する薬剤と接触させることと、脳内に存在する前記エフェクター分子のレベルを決定することを含むか、もしくは

(i i) 前記エフェクター分子の薬力学的 (P D) 効果を測定することを含む、かつ / または

(b) 前記エフェクター分子が、脳内の標的に結合する抗体またはその抗原結合フラグメントである、

請求項 13 ~ 15 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 17】

血液脳関門 (B B B) 輸送を媒介することができるキメラ T f R ポリペプチドを発現するトランスジェニックマウスまたはラット単一細胞胚を、該胚から生成されるトランスジェニックマウスまたはラットにおいて生成する方法であって、前記胚の内因性 T f R 遺伝子の頂端ドメインを、配列番号 1 との少なくとも 90 % の同一性を有する異種頂端ドメインで置換することを含み、ここで、該キメラ T f R ポリペプチドは、該胚から生成される該トランスジェニックマウスまたはラットの脳で発現する、前記方法。

【請求項 18】

(a) 前記頂端ドメインを置換することが、相同組換えによって実施される、

(b) 前記方法が、C a s 9 タンパク質と、少なくとも 1 つの s g R N A と、前記異種頂端ドメインをコードする核酸配列を含むドナー D N A とを接触させることを含み、前記異種頂端ドメインコード配列が、前記胚のゲノム内の前記内因性 T f R 遺伝子の前記頂端ドメインを置換するように、前記異種頂端ドメインは、左の相同アーム及び右の相同アームと隣接している、

(c) 前記異種頂端ドメインが、前記胚での発現のためにコドン最適化されている、か

10

20

30

40

50

つ／または

(d) 前記胚がマウス胚である、
請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

前記胚がマウス胚であり、かつ、前記ドナー D N A が、内因性マウス T f R 遺伝子の第 4 のエクソンの後に配置される、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

血液脳関門 (B B B) 輸送を媒介することができるキメラトランスフェリン受容体 (T f R) ポリペプチドを発現するトランスジェニックマウスまたはラットを生成する方法であって、

(a) 請求項 17 ~ 19 のいずれか 1 項に記載の方法によって得ることができる胚を、前記胚と同じマウスまたはラット種の偽妊娠雌に対して移植するステップと、

(b) 前記雌より生まれた子孫からトランスジェニックマウスまたはラットを選択するステップであって、前記マウスまたはラットは、前記キメラ T f R ポリペプチドを発現する、ステップと

を含む、方法。

【請求項 21】

血液脳関門 (B B B) 輸送を媒介することができるキメラ T f R ポリペプチドを発現するトランスジェニックマウスまたはラットを生成する方法であって、

(a) 配列番号 1 との少なくとも 90 % の同一性を有する頂端ドメインをコードするポリヌクレオチドを、マウスまたはラットの胚細胞内に導入するステップであって、前記ポリヌクレオチドが、内因性 T f R 頂端ドメインをコードする内因性 T f R 遺伝子の領域を標的とし、かつ配列番号 1 との少なくとも 90 % の同一性を有する前記頂端ドメインをコードする前記ポリヌクレオチドが、前記内因性頂端ドメインをコードする前記内因性 T f R 遺伝子の前記領域を置換する、ステップと、

(b) 前記細胞またはその子孫を前記トランスジェニックマウスまたはラットへと発達させるステップと

を含み、ここで、該キメラ T f R ポリペプチドは、該トランスジェニックマウスまたはラットの脳で発現する、方法。

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0001】

発明の背景

血液脳関門 (B B B) は、末梢から脳へのほとんどの高分子の移行を阻止するため、脳への曝露が必要とされる大分子治療薬の使用を制限する。トランスフェリン受容体 (T f R) は、B B B で高度に発現され、受容体媒介性トランスサイトーシスを介して B B B を通過させて上述のような治療薬を輸送するために使用することができる。潜在的な治療薬が B B B を通過する能力を評価する目的で、マウス T f R が完全長のヒト T f R c D N A に置換されたマウスモデルが以前に開発された。しかしながら、これらのトランスジェニックマウスは不健康であり、異常に高い T f R 発現、少ない赤血球数、及び高い血清鉄濃度を示した。Y u e t a l . , S c i e n c e T r a n s . M e d . , 6 (2 6 1) : 2 6 1 r a 1 5 4 (2 0 1 4) (非特許文献 1) 。結果として、これらの既存のマウスモデルは、脳疾患を治療するために B B B を通過することができる治療薬を評価するためのツールとしての使用には適しておらず、内因性 T f R の発現及び表現型をより呈するモデルが必要とされる。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0002】

【文献】 Y u e t a l . , S c i e n c e T r a n s . M e d . , 6 (2 6 1) : 2 6 1 r a 1 5 4 (2 0 1 4)

10

20

30

40

50

【発明の概要】**【0003】****発明の簡単な概要**

一態様では、本開示は、非ヒト哺乳動物トランスフェリン結合部位、及び配列番号1と少なくとも80%同一のアミノ酸配列を有する異種頂端ドメインを含む、キメラトランスフェリン受容体(TfR)ポリペプチドをコードする核酸配列を含むポリヌクレオチドを提供する。いくつかの実施形態では、異種頂端ドメインは、配列番号1のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、異種頂端ドメインは、配列番号7、配列番号8、または配列番号9のアミノ酸配列を含む。

【0004】

いくつかの実施形態では、非ヒト哺乳動物トランスフェリン結合部位は、天然(例えば、TfRの膜貫通及び/または細胞内ドメインと同種由来)トランスフェリン結合部位であり、例えば、天然マウストランスフェリン結合部位である。いくつかの実施形態では、キメラTfRポリペプチドは、配列番号3との少なくとも80%のアミノ酸配列同一性、または少なくとも85%、90%、または95%の同一性を有する。いくつかの実施形態では、キメラTfRポリペプチドは、配列番号3のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、キメラTfRポリペプチドの異種頂端ドメインをコードする核酸配列の領域は、配列番号2との少なくとも70%のヌクレオチド配列同一性を有する。いくつかの実施形態では、キメラTfRポリペプチドの異種頂端ドメインをコードする核酸配列の領域は、配列番号2のヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、キメラTfRをコードするポリヌクレオチドは、マウストランスフェリン受容体遺伝子のエクソンとイントロンとを含み、及び異種頂端ドメインをコードする核酸配列は、マウストランスフェリン受容体遺伝子の頂端結合ドメインに取って代わるようにマウストランスフェリン受容体遺伝子の第4のエクソンの後に配置されている。

10

20

30

【0005】

別の態様では、非ヒト哺乳動物トランスフェリン結合部位と、配列番号1と少なくとも80%同一のアミノ酸配列を有する異種頂端ドメインとを含むキメラTfRポリペプチドが本明細書に提供される。いくつかの実施形態では、キメラTfRポリペプチドは、天然頂端ドメインのみが異種頂端ドメインによって置換されている天然TfRポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、キメラTfRポリペプチドは、天然TfR結合部位と、例えば、頂端ドメインに加えて少なくとも1つのドメインまたはその領域が非天然アミノ酸配列を含む、天然TfR結合部位に対して異種である頂端結合ドメインとを含む。いくつかの実施形態では、異種頂端ドメインは、配列番号1のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、異種頂端ドメインは、配列番号7、配列番号8、または配列番号9のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、キメラTfRは、配列番号3との少なくとも80%、90%、95%、または98%のアミノ酸配列同一性を有する。いくつかの実施形態では、キメラTfRポリペプチドは、配列番号3のアミノ酸配列を含む。

【0006】

さらなる態様では、上記のようなキメラトランスフェリン受容体を発現する宿主細胞が本明細書に提供される。いくつかの実施形態では、宿主細胞は、キメラトランスフェリン受容体ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、宿主細胞は、マウス細胞である。いくつかの実施形態では、宿主細胞によって発現されるキメラTfRポリペプチドは、(a) TfRポリペプチドの内因性頂端ドメインに代わる異種頂端ドメインと、(b) 内因性トランスフェリン結合部位とを含む。いくつかの実施形態では、異種頂端ドメインは、配列番号1と少なくとも80%同一のアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態では、宿主細胞は、内因性TfRの頂端ドメインのみが異種頂端ドメインによって置換されているキメラTfRを発現する。いくつかの態様では、宿主細胞は、内因性TfR結合部位と、例えば、頂端ドメインに加えて少なくとも1つのドメインまたはその領域が非天然アミノ酸配列を含む、異種頂端ドメインとを含むキメラTfRを発現する。いくつかの実施形態では、異種頂端ドメインは、配列番号1のアミノ酸配列

40

50

を含む。いくつかの実施形態では、細胞内の異種頂端ドメインをコードする核酸配列は、配列番号2のスクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、宿主細胞は、マウス細胞である。いくつかの実施形態では、細胞内の頂端ドメインをコードする核酸配列は、マウストラנסフェリン受容体遺伝子の第4のエクソンの後に配置されている。いくつかの実施形態では、宿主細胞はエクスピボにある。いくつかの実施形態では、宿主細胞は胚性幹細胞である。いくつかの実施形態では、宿主細胞のゲノムは、天然TfRの頂端ドメインの欠失を含む。

【0007】

さらなる態様では、本開示は、キメラTfRポリペプチドを発現する非ヒトトランスジェニック動物を提供し、キメラTfRポリペプチドは、非ヒトトランスジェニック動物にとって内因性であるTfRポリペプチドの頂端ドメインに取って代わる異種頂端ドメインを含む。いくつかの実施形態では、非ヒトトランスジェニック動物のゲノムは、非ヒトトランスジェニック動物の内因性TfRの頂端ドメインに代わる異種頂端ドメインをコードするトランسفェリン受容体遺伝子を含む。いくつかの実施形態では、非ヒトトランスジェニック動物は、非ヒトトランスジェニック動物のTfRの天然ドメインに代わる異種頂端ドメインと、天然トランسفェリン結合部位とを含む、キメラTfRを発現する。いくつかの実施形態では、非ヒトトランスジェニック動物は、内因性トランسفェリン受容体の頂端ドメインのみが、異種頂端ドメインによって置換されているキメラトランسفェリン受容体を発現する。いくつかの実施形態では、非ヒトトランスジェニック動物は、内因性TfR結合部位と、例えば、頂端ドメインに加えて少なくとも1つのドメインまたはその領域が非天然アミノ酸配列を含む、内因性TfR結合部位に対して異種である頂端結合ドメインとを含むキメラTfRポリペプチドを発現する。いくつかの実施形態では、非ヒトトランスジェニック動物は、上記のような宿主細胞を含む。いくつかの実施形態では、トランسفェリン受容体は、マウスまたはラットである。いくつかの実施形態では、トランسفェリン受容体は、キメラTfRについてホモ接合性である。いくつかの実施形態では、トランسفェリン受容体は、キメラTfRについてヘテロ接合性である。

【0008】

別の態様では、キメラTfRに結合する頂端ドメイン結合ポリペプチド(ADBP)をスクリーニングする方法が本明細書に提供され、この方法は、候補ADBPを上記のキメラTfRポリペプチドと接触させるステップと、キメラTfRポリペプチドに結合する候補ADBPの量を決定するステップとを含む。いくつかの実施形態では、候補ADBPを、キメラTfRポリペプチドと接触させるステップは、ADBPを、キメラTfRポリペプチドを発現する宿主細胞と接触させることを含む。いくつかの実施形態では、候補ADBPを、キメラTfRポリペプチドと接触させるステップは、ADBPを、キメラTfRポリペプチドを発現する内皮と接触させることを含む。いくつかの実施形態では、内皮は血液脳関門内皮である。いくつかの実施形態では、キメラTfRポリペプチドに結合する候補ADBPの量は、イムノアッセイによって決定される。いくつかの実施形態では、キメラTfRポリペプチドに結合する候補ADBPの量は、表面プラズモン共鳴によって決定される。いくつかの実施形態では、接触させるステップは、インビボで実施される。いくつかの実施形態では、候補ADBPは、エフェクター分子と結合している。いくつかの実施形態では、エフェクター分子は、小分子、RNA、DNA、またはポリペプチドである。いくつかの実施形態では、エフェクター分子は、ポリペプチドである。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、抗体またはその抗原結合フラグメントである。

【0009】

さらに別の態様では、キメラTfRポリペプチドに結合するADBPの量を測定する方法が本明細書に提供され、この方法は、ADBPを上記に開示されたキメラTfRポリペプチドと接触させるステップと、キメラTfRポリペプチドに結合したADBPの量をイムノアッセイまたは表面プラズモン共鳴によって決定するステップとを含む。

【0010】

10

20

30

40

50

さらに別の態様では、血液脳関門を通過する A D B P をスクリーニングする方法が本明細書に提供され、この方法は、(a) 配列番号 1 との少なくとも 80 % のアミノ酸配列同一性を有する頂端ドメインに結合する A D B P を、本明細書に開示される非ヒトトランスジェニック動物に投与するステップと、(b) 非ヒトトランスジェニック動物の脳内の A D B P の存在または活性を測定するステップとを含む。いくつかの実施形態では、A D B P は、エフェクター分子と結合している。いくつかの実施形態では、エフェクター分子は、小分子、R N A 、D N A 、またはポリペプチドである。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、抗体またはその抗原結合フラグメントである。いくつかの実施形態では、決定するステップは、定量的イムノアッセイを実施することを含む。いくつかの実施形態では、測定するステップは、脳内のエフェクター分子のレベルを決定するために、動物の脳または脳組織を、エフェクター分子に結合する薬剤と接触させることを含む。いくつかの実施形態では、測定するステップは、エフェクター分子の薬力学的 (P D) 効果を測定することを含む。いくつかの実施形態では、エフェクター分子は、抗 B A C E 1 抗体またはその抗原結合フラグメントであり、測定するステップは、脳内の可溶性 A B e t a 4 0 のレベルを測定することを含む。いくつかの実施形態では、エフェクター分子は、脳内の標的に結合する抗体またはその抗原結合フラグメントである。

【 0 0 1 1 】

別々の態様では、血液脳関門を通過する A D B P をモニタリングする方法が本明細書に提供され、この方法は、(a) 配列番号 1 との少なくとも 80 % のアミノ酸配列同一性を有する頂端ドメインに結合する A D B P を、本明細書に開示される非ヒトトランスジェニック動物に投与するステップと、(b) 非ヒトトランスジェニック動物の脳内の A D B P の存在または活性を測定するステップとを含む。いくつかの実施形態では、A D B P は、エフェクター分子と結合している。いくつかの実施形態では、エフェクター分子は、小分子、R N A 、D N A 、またはポリペプチドである。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、抗体またはその抗原結合フラグメントである。いくつかの実施形態では、決定するステップは、定量的イムノアッセイを実施することを含む。いくつかの実施形態では、決定するステップは、エフェクター分子を、エフェクター分子に結合する薬剤と接触させることと、脳内に存在するエフェクター分子のレベルを決定することとを含む。いくつかの実施形態では、エフェクター分子は、脳内の標的に結合する抗体またはその抗原結合フラグメントである。いくつかの実施形態では、測定するステップは、標的に結合するエフェクター分子の P D 効果を測定することを含む。いくつかの実施形態では、エフェクター分子は、抗 B A C E 1 抗体またはその抗原結合フラグメントであり、測定するステップは、脳内の可溶性 A B e t a 4 0 のレベルを測定することを含む。

【 0 0 1 2 】

さらに別の態様では、キメラトランスフェリン受容体 (T f R) ポリペプチドを発現するトランスジェニック非ヒト単一細胞胚を生成する方法が本明細書に提供され、この方法は、非ヒト単一細胞胚の内因性 T f R の頂端ドメインを、配列番号 1 との少なくとも 80 % の同一性を有する異種頂端ドメインで置換することを含む。いくつかの実施形態では、頂端ドメインを置換することは、相同組換えによって実施される。いくつかの実施形態では、この方法は、C a s 9 タンパク質、少なくとも 1 つの單一ガイド R N A (s g R N A) 、及び異種頂端ドメインをコードする核酸配列を含むドナー D N A を接触させることを含み、異種頂端ドメインコード配列が、非ヒト単一細胞胚のゲノム内の内因性 T f R の頂端ドメインを置換するように、異種頂端ドメインは、左の相同アーム及び右の相同アームと隣接している。いくつかの実施形態では、異種頂端ドメインは、非ヒト単一細胞胚での発現のためにコドン最適化されている。いくつかの実施形態では、非ヒト単一細胞胚は、マウス胚である。いくつかの実施形態では、ドナー D N A は、マウストランスフェリン受容体遺伝子の第 4 のエクソンの後に配置される。

【 0 0 1 3 】

さらに別の態様では、非ヒトトランスジェニック動物を生成する方法が本明細書に提供され、この方法は、(a) 上記に開示されたトランスジェニック非ヒト単一細胞胚を、非

ヒト単一細胞胚と同じ動物種の偽妊娠雌に対して移植するステップと、(b)雌より生まれた子孫から非ヒトランスジェニック動物を選択するステップであって、非ヒトランスジェニック動物が、内因性TfRの頂端ドメインが配列番号1との少なくとも80%の同一性のアミノ酸配列を有する異種頂端ドメインで置換されたキメラトランスフェリン受容体(TfR)ポリペプチドを含む、ステップとを含む。

【0014】

さらに別の態様では、キメラトランスフェリン受容体(TfR)ポリペプチドを発現する非ヒトランスジェニック動物を生成する方法が本明細書に提供され、この方法は、(a)配列番号1との少なくとも80%の同一性を有する頂端ドメインをコードするポリヌクレオチドを動物の胚細胞内に導入するステップであって、ポリヌクレオチドが、内因性TfR頂端ドメインをコードする内因性TfR遺伝子の領域を標的とし、配列番号1との少なくとも80%の同一性を有する頂端ドメインをコードするポリヌクレオチドが、内因性頂端ドメインをコードする内因性TfR遺伝子の領域を置換する、ステップと、(b)細胞またはその子孫を非ヒトランスジェニック動物へと発達させるステップとを含む。

10

【0015】

[本発明1001]

前記異種頂端ドメインが、配列番号1のアミノ酸配列を含む、本発明1001のポリヌクレオチド。

[本発明1002]

20

前記異種頂端ドメインが、配列番号1のアミノ酸配列を含む、本発明1001のポリヌクレオチド。

[本発明1003]

前記異種頂端ドメインが、配列番号7、配列番号8、または配列番号9のアミノ酸配列を含む、本発明1001のポリヌクレオチド。

[本発明1004]

前記非ヒト哺乳動物トランスフェリン結合部位が、天然マウストランスフェリン結合部位である、本発明1001～1003のいずれかのポリヌクレオチド。

[本発明1005]

前記キメラTfRポリペプチドが、配列番号3との少なくとも80%のアミノ酸配列同一性を有する、本発明1001～1004のいずれかのポリヌクレオチド。

30

[本発明1006]

前記キメラTfRポリペプチドが、配列番号3のアミノ酸配列を含む、本発明1005のポリヌクレオチド。

[本発明1007]

前記キメラTfRポリペプチドの前記異種頂端ドメインをコードする前記核酸配列の領域が、配列番号2との少なくとも70%のヌクレオチド配列同一性を有する、本発明1001のポリヌクレオチド。

[本発明1008]

前記キメラTfRポリペプチドの前記異種頂端ドメインをコードする前記核酸配列の領域が、配列番号2のヌクレオチド配列を含む、本発明1007のポリヌクレオチド。

40

[本発明1009]

前記キメラTfRをコードする前記ポリヌクレオチドが、マウストランスフェリン受容体遺伝子のエクソンとイントロンとを含み、かつ前記異種頂端ドメインをコードする前記核酸配列が、マウストランスフェリン受容体遺伝子の頂端結合ドメインに取って代わるように前記マウストランスフェリン受容体遺伝子の第4のエクソンの後に配置されている、本発明1001～1008のいずれかのポリヌクレオチド。

[本発明1010]

本発明1001～1009のいずれかのポリヌクレオチドによってコードされるキメラトランスフェリン受容体(TfR)ポリペプチド。

50

[本発明1011]

本発明1001～1009のいずれかのポリヌクレオチドを含む、宿主細胞。

[本発明1012]

マウス細胞である、本発明1011の宿主細胞。

[本発明1013]

キメラトランスフェリン受容体（T f R）ポリペプチドを発現する宿主細胞であって、前記キメラT f Rポリペプチドが、（a）T f Rポリペプチドの内因性頂端ドメインに代わる異種頂端ドメインと、（b）内因性トランスフェリン結合部位とを含む、宿主細胞。

[本発明1014]

前記異種頂端ドメインが、配列番号1と少なくとも80%同一のアミノ酸配列を有する、本発明1013の宿主細胞。

10

[本発明1015]

前記異種頂端ドメインが、配列番号1のアミノ酸配列を含む、本発明1013の宿主細胞。

[本発明1016]

前記細胞内の前記異種頂端ドメインをコードする核酸配列が、配列番号2のヌクレオチド配列を含む、本発明1013、1014、または1015のいずれかの宿主細胞。

[本発明1017]

マウス細胞である、本発明1013～1016のいずれかの宿主細胞。

[本発明1018]

前記細胞内の前記頂端ドメインをコードする前記核酸配列が、マウストランスフェリン受容体遺伝子の第4のエクソンの後に配置されている、本発明1017の宿主細胞。

20

[本発明1019]

エクスピボにある、本発明1011～1018のいずれかの宿主細胞。

[本発明1020]

胚性幹細胞である、本発明1019の宿主細胞。

[本発明1021]

前記宿主細胞のゲノムが、内因性T f Rの頂端ドメインの欠失を含む、本発明1011～1020のいずれかの宿主細胞。

[本発明1022]

キメラT f Rポリペプチドを発現する非ヒトトランスジェニック動物であって、前記キメラT f Rポリペプチドが、前記非ヒトトランスジェニック動物にとって内因性であるT f Rポリペプチドの頂端ドメインに取って代わる異種頂端ドメインを含む、前記非ヒトトランスジェニック動物。

30

[本発明1023]

前記非ヒトトランスジェニック動物のゲノムが、前記非ヒトトランスジェニック動物の天然T f Rの頂端ドメインに代わる異種頂端ドメインを含む、本発明1022の非ヒトトランスジェニック動物。

[本発明1024]

本発明1011～1021のいずれかの宿主細胞を含む、非ヒトトランスジェニック動物。

[本発明1025]

げっ歯類である、本発明1022、1023、または1024のいずれかの非ヒトトランスジェニック動物。

40

[本発明1026]

マウスである、本発明1025の非ヒトトランスジェニック動物。

[本発明1027]

ラットである、本発明1025の非ヒトトランスジェニック動物。

[本発明1028]

前記キメラT f Rについてホモ接合性である、本発明1022～1027のいずれかの非ヒトトランスジェニック動物。

[本発明1029]

50

前記キメラ T f R についてヘテロ接合性である、本発明1022～1027のいずれかの非ヒトトランスジェニック動物。

[本発明1030]

キメラ T f R に結合する頂端ドメイン結合ポリペプチド (A D B P) をスクリーニングする方法であって、

候補 A D B P を、本発明1010のキメラ T f R ポリペプチドと接触させるステップと、前記キメラ T f R ポリペプチドに結合する候補 A D B P の量を決定するステップとを含む、方法。

[本発明1031]

前記候補 A D B P を前記キメラ T f R ポリペプチドと接触させる前記ステップが、前記 A D B P を、前記キメラ T f R ポリペプチドを発現する宿主細胞と接触させることを含む、本発明1030の方法。

10

[本発明1032]

前記候補 A D B P を前記キメラ T f R ポリペプチドと接触させる前記ステップが、前記 A D B P を、前記キメラ T f R ポリペプチドを発現する内皮と接触させることを含む、本発明1030の方法。

[本発明1033]

前記内皮が血液脳関門内皮である、本発明1032の方法。

[本発明1034]

前記キメラ T f R ポリペプチドに結合する前記候補 A D B P の量が、イムノアッセイによって決定される、本発明1030～1033のいずれかの方法。

20

[本発明1035]

前記キメラ T f R ポリペプチドに結合する前記候補 A D B P の量が、表面プラズモン共鳴によって決定される、本発明1030の方法。

[本発明1036]

前記接触させるステップが、インビオで実施される、本発明1030～1034のいずれかの方法。

[本発明1037]

前記候補 A D B P が、エフェクター分子と結合している、本発明1030～1036のいずれかの方法。

30

[本発明1038]

前記エフェクター分子が、小分子、R N A 、D N A 、またはポリペプチドである、本発明1037の方法。

[本発明1039]

前記エフェクター分子がポリペプチドである、本発明1038の方法。

[本発明1040]

前記ポリペプチドが、抗体またはその抗原結合フラグメントである、本発明1039の方法

—

[本発明1041]

キメラ T f R に結合する A D B P の量を測定する方法であって、

40

A D B P を、本発明1010のキメラ T f R ポリペプチドと接触させるステップと、

前記キメラ T f R ポリペプチドに結合した A D B P の量をイムノアッセイまたは表面プラズモン共鳴によって決定するステップとを含む、方法。

[本発明1042]

血液脳関門を通過する A D B P をスクリーニングする方法であって、

(a) 配列番号1との少なくとも80%のアミノ酸配列同一性を有する頂端ドメインに結合する A D B P を、本発明1022～1029のいずれかの非ヒトトランスジェニック動物に投与するステップと、

(b) 前記非ヒトトランスジェニック動物の脳内の前記 A D B P の存在または活性を測

50

定するステップと
を含む、方法。

[本発明1043]

前記A D B Pが、エフェクター分子と結合している、本発明1042の方法。

[本発明1044]

前記エフェクター分子が、小分子、R N A、D N A、またはポリペプチドである、本発明1043の方法。

[本発明1045]

前記ポリペプチドが、抗体またはその抗原結合フラグメントである、本発明1044の方法

—

[本発明1046]

前記決定するステップが、定量的イムノアッセイを実施することを含む、本発明1042～1045のいずれかの方法。

[本発明1047]

前記測定するステップが、前記動物の脳または脳組織を、前記エフェクター分子に結合する薬剤と接触させることと、脳内に存在する前記エフェクター分子のレベルを決定することとを含む、本発明1043の方法。

[本発明1048]

前記測定するステップが、前記エフェクター分子の薬力学的(P D)効果を測定することを含む、本発明1042の方法。

[本発明1049]

前記エフェクター分子が、抗B A C E 1抗体またはその抗原結合フラグメントであり、かつ前記測定するステップが、脳内の可溶性A B e t a 40のレベルを測定することを含む、本発明1048の方法。

[本発明1050]

前記エフェクター分子が、脳内の標的に結合する抗体またはその抗原結合フラグメントである、本発明1043の方法。

[本発明1051]

血液脳関門を通過するA D B Pをモニタリングする方法であって、

(a) 配列番号1との少なくとも80%のアミノ酸配列同一性を有する頂端ドメインに結合するA D B Pを、本発明1022～1029のいずれかの非ヒトransジェニック動物に投与するステップと、

(b) 前記非ヒトtransジェニック動物の脳内の前記A D B Pの存在または活性を測定するステップと
を含む、方法。

[本発明1052]

前記A D B Pが、エフェクター分子と結合している、本発明1051の方法。

[本発明1053]

前記エフェクター分子が、小分子、R N A、D N A、またはポリペプチドである、本発明1052の方法。

[本発明1054]

前記ポリペプチドが、抗体またはその抗原結合フラグメントである、本発明1053の方法

—

[本発明1055]

前記決定するステップが、定量的イムノアッセイを実施することを含む、本発明1051～1054のいずれかの方法。

[本発明1056]

前記決定するステップが、前記エフェクター分子を、前記エフェクター分子に結合する薬剤と接触させることと、脳内に存在する前記エフェクター分子のレベルを決定することとを含む、本発明1055の方法。

10

20

30

40

50

[本発明1057]

前記エフェクター分子が、脳内の標的に結合する抗体またはその抗原結合フラグメントである、本発明1052の方法。

[本発明1058]

前記測定するステップが、前記標的に結合する前記エフェクター分子のP D効果を測定することを含む、本発明1057の方法。

[本発明1059]

前記エフェクター分子が、抗B A C E 1抗体またはその抗原結合フラグメントであり、かつ前記測定するステップが、脳内の可溶性A B e t a 40のレベルを測定することを含む、本発明1057の方法。

10

[本発明1060]

キメラトランスフェリン受容体(T f R)ポリペプチドを発現するトランスジェニック非ヒト単一細胞胚を生成する方法であって、前記非ヒト単一細胞胚の内因性T f Rの頂端ドメインを、配列番号1との少なくとも80%の同一性を有する異種頂端ドメインで置換することを含む、方法。

[本発明1061]

前記頂端ドメインを置換することが、相同組換えによって実施される、本発明1060の方法。

[本発明1062]

前記方法が、C a s 9タンパク質と、少なくとも1つのs g R N Aと、前記異種頂端ドメインをコードする核酸配列を含むドナーD N Aとを接触させることを含み、

20

前記異種頂端ドメインコード配列が、前記非ヒト単一細胞胚のゲノム内の前記内因性T f Rの前記頂端ドメインを置換するように、前記異種頂端ドメインは、左の相同アーム及び右の相同アームと隣接している、

本発明1060または1061の方法。

[本発明1063]

前記異種頂端ドメインが、前記非ヒト単一細胞胚での発現のためにコドン最適化されている、本発明1060～1062のいずれかの方法。

[本発明1064]

前記非ヒト単一細胞胚がマウス胚である、本発明1060～1063のいずれかの方法。

30

[本発明1065]

前記ドナーD N Aが、マウストランスフェリン受容体遺伝子の第4のエクソンの後に配置される、本発明1064の方法。

[本発明1066]

非ヒトトランスジェニック動物を生成する方法であって、

(a) 本発明1060～1065のいずれかのトランスジェニック非ヒト単一細胞胚を、前記非ヒト単一細胞胚と同じ動物種の偽妊娠雌に対して移植するステップと、

(b) 前記雌より生まれた子孫から非ヒトトランスジェニック動物を選択するステップであって、前記非ヒトトランスジェニック動物は、内因性T f Rの頂端ドメインが配列番号1との少なくとも80%の同一性のアミノ酸配列を有する異種頂端ドメインで置換されたキメラトランスフェリン受容体(T f R)ポリペプチドを含む、ステップとを含む、方法。

40

[本発明1067]

キメラトランスフェリン受容体(T f R)ポリペプチドを発現する非ヒトトランスジェニック動物を生成する方法であって、

(a) 配列番号1との少なくとも80%の同一性を有する頂端ドメインをコードするポリヌクレオチドを、動物の胚細胞内に導入するステップであって、前記ポリヌクレオチドが内因性T f R頂端ドメインをコードする内因性T f R遺伝子の領域を標的とし、かつ配列番号1との少なくとも80%の同一性を有する前記頂端ドメインをコードする前記ポリヌクレオチドが、前記内因性頂端ドメインをコードする前記内因性T f R遺伝子の前記領域

50

を置換する、ステップと、

(b) 前記細胞またはその子孫を非ヒトトランスジェニック動物へと発達させるステップと
を含む、方法。

前述の概略な記載及び以下の詳細な記載は、例示的及び説明的であり、請求される本発明のさらなる説明を提供することが意図される。他の目的、利点、及び新規の特徴は、本発明の以下の詳細な記載から当業者には容易に明らかになるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0016】

【図1】図1A～1Cは、野生型、 $h u T f R$ 頂端^{+/−}、及び $h u T f R$ 頂端^{+/+}マウスの全血球算定分析の結果を示す。遺伝子型特異的な違いは、総赤血球、ヘモグロビン、またはヘマトクリットにおいて観察されなかった。図内のグラフは、グループごとの平均値±標準偏差、n=3であることを表す。

【図2】図2A～2Bは、 $h u T f R$ 頂端^{+/−}マウスに全身投与された抗TfRの脳血管局在を示す。5mg/kgのヒト頂端特異的抗TfRは、C57BL/6野生型またはキメラ $h u T f R$ 頂端^{+/−}ヘテロ接合性マウスのいずれかに静脈内投与された。1時間後、マウスは、PBSを灌流され、脳は、抗体分布のために染色された。代表的な画像は、 $h u T f R$ 頂端^{+/−}ヘテロ接合体に全身注入された抗TfR（頂端ドメイン特異的）は顕著に血管局在であるが、野生型マウスはそうではないことを示す。これは、キメラ $h u T f R$ タンパク質が BBBで発現されていることを表す。

【図3】図3A～3Bは、 $h u T f R$ 頂端^{+/+}マウスに全身投与された抗TfR/BACE1の脳実質分布を示す。 $h u T f R$ マウスの脳皮質切片の代表的な画像は、静脈注射された抗TfR/BACE1(50mg/kg、投与後24時間)の広範な実質分布を示す。対照的に、抗BACE1を注入した $h u T f R$ 頂端^{+/+} $h u T f R$ マウスの脳切片では、明らかな染色は観察されなかった。

【図4A】図4A～4Dは、抗TfR/BACE1二重特異的抗体の脳への取り込み、及び $h u T f R$ 頂端^{+/+}マウスの二重特異的抗体の投与後のAベータの減少を示す。図4Aは、マウスが、50mg/kgの抗TfR/BACE1または抗BACE1を投与され、24時間後の $h u T f R$ 頂端^{+/+}マウスの血漿 $h u I g G 1$ 濃度を示す。結果は、抗TfR/BACE1のTfRを介したクリアランスが、抗BACE1のクリアランスと比較して増強されたことを示した。グラフは、グループごとの平均±標準偏差、n=8(未処理の野生型マウスではn=2)であることを表す。

【図4B】図4A～4Dは、抗TfR/BACE1二重特異的抗体の脳への取り込み、及び $h u T f R$ 頂端^{+/+}マウスの二重特異的抗体の投与後のAベータの減少を示す。図4Bは、抗体の全身投与後の抗TfR/BACE1の脳への取り込みの平均を示す。結果は、マウス脳内の抗BACE1の蓄積と比較して、抗TfR/BACE1の蓄積が約28倍の増加を示した。グラフは、グループごとの平均±標準偏差、n=8(未処理の野生型マウスではn=2)であることを表す。

【図4C】図4A～4Dは、抗TfR/BACE1二重特異的抗体の脳への取り込み、及び $h u T f R$ 頂端^{+/+}マウスの二重特異的抗体の投与後のAベータの減少を示す。図4Cは、抗BACE1で処理したマウスと比較して、抗TfR/BACE1で処理したマウスは、脳内のAベータが49%減少したことを示す。グラフは、グループごとの平均±標準偏差、n=8(未処理の野生型マウスではn=2)であることを表す。

【図4D】図4A～4Dは、抗TfR/BACE1二重特異的抗体の脳への取り込み、及び $h u T f R$ 頂端^{+/+}マウスの二重特異的抗体の投与後のAベータの減少を示す。図4Dは、未処理の野生型マウスと比較して、抗BACE1または抗TfR/BACE1で処理された $h u T f R$ 頂端^{+/+}マウスの血漿Aベータレベルの低下を示す。グラフは、グループごとの平均±標準偏差、n=8(未処理の野生型マウスではn=2)であることを表す。

【図5A】図5A～5Dは、野生型マウスと比較した、 $h u T f R$ 頂端^{+/+}マウスの様々な組織におけるTfRの発現を示す。脳(図5A)の総TfR発現に顕著な差は観察され

10

20

30

40

50

なかった。グラフは、グループごとの平均±標準偏差、n = 4 ~ 8であることを表す。

【図5B】図5A ~ 5Dは、野生型マウスと比較した、h u T f R 頂端+/+マウスの様々な組織におけるT f Rの発現を示す。肝臓(図5B)の総T f R発現に顕著な差は観察されなかった。グラフは、グループごとの平均±標準偏差、n = 4 ~ 8であることを表す。

【図5C】図5A ~ 5Dは、野生型マウスと比較した、h u T f R 頂端+/+マウスの様々な組織におけるT f Rの発現を示す。腎臓(図5C)の総T f R発現に顕著な差は観察されなかった。グラフは、グループごとの平均±標準偏差、n = 4 ~ 8であることを表す。

【図5D】図5A ~ 5Dは、野生型マウスと比較した、h u T f R 頂端+/+マウスの様々な組織におけるT f Rの発現を示す。肺(図5D)の総T f R発現に顕著な差は観察されなかった。グラフは、グループごとの平均±標準偏差、n = 4 ~ 8であることを表す。

10

【発明を実施するための形態】

【0017】

発明の詳細な説明

非ヒト(例えば、マウス)の哺乳動物トランスフェリン結合部位と、トランスフェリン結合部位を含むドメインとは異種である頂端ドメインとを含む、トランスフェリン受容体のキメラ型を開発した。これらのキメラ受容体は、特にトランスフェリン結合部位がトランスジェニック動物種に由来し、頂端ドメインが靈長類(例えば、ヒトまたはサル)に由来するトランスジェニック動物で発現させることができる。したがって、本発明は、非ヒト哺乳動物トランスフェリン結合部位と、配列番号1と少なくとも80%同一のアミノ酸配列を有する頂端ドメインとを含む、キメラトランスフェリン受容体をコードするポリヌクレオチドを提供する。本発明はまた、非ヒト、例えば、そのようなキメラT f Rを発現する非靈長類のトランスジェニック動物、及びインビボでヒトトランスフェリン受容体(h u T f R)に結合することによりBBBを通過できるポリペプチドをスクリーニングするための非ヒトトランスジェニック動物の使用も提供する。いくつかの実施形態では、非ヒトトランスジェニック動物は、天然トランスフェリン受容体(マウストランスフェリン受容体(m T f R)など)を含み、その頂端ドメインは、配列番号1と少なくとも80%同一のアミノ酸配列を有するオーソロガスな頂端ドメインで置換され、それにより、天然トランスフェリン結合部位と、トランスフェリン受容体をコードする配列の大部分、例えば、少なくとも70%、または少なくとも75%とをそのままに残す。したがって、この非ヒトトランスジェニック動物は、トランスフェリンに結合して輸送するだけでなく、適切な鉄恒常性を維持する能力も含む非ヒト動物の内因性トランスフェリン受容体のトランスフェリン結合機能を最大限保持する。結果として、トランスジェニック動物は健康であり、脳疾患を治療するための治療薬の発見及び開発での使用に好適である。

20

【0018】

用語

本明細書で使用する場合、文脈上明らかに別段に示されている場合を除き、「1つの(a)」、「1つの(an)」及び「その(the)」という単数形には、複数の言及物が含まれる。したがって、例えば、「1つの抗体」への言及は、2つ以上のかかる分子の組み合わせが任意に含まれる、などである。

30

【0019】

本明細書で使用される用語「約」と及び「およそ」は、数値または範囲で指定された量を変更するために使用される場合、数値及び当業者に即知である値からの合理的な偏差を示し、例えば、±20%、±10%、または±5%は、記載された値の意図した範囲内である。

40

【0020】

本明細書で使用される「トランスフェリン受容体」は、トランスフェリン受容体タンパク質1を指す。ヒトトランスフェリン受容体1ポリペプチド配列は、配列番号6に記載されている。他の種からのトランスフェリン受容体タンパク質1配列も知られている(例えば、チンパンジー、受託番号XP_003310238.1; アカゲザル、NP_001244232.1; イヌ、NP_001003111.1; ウシ、NP_0011935

50

06.1；マウス、NP_035768.1；ラット、NP_073203.1；及びニワトリ、NP_990587.1）。用語「トランスフェリン受容体」は、例示的な参照配列の対立遺伝子バリエント、例えば、トランスフェリン受容体タンパク質1染色体座の遺伝子によってコードされるヒト配列も包含する。完全長のトランスフェリン受容体タンパク質には、短いN末端細胞内領域、膜貫通領域、及び大きな細胞外ドメインが含まれる。細胞外ドメインは、プロテアーゼ様ドメイン、ヘリカルドメイン、及び頂端ドメインの3つのドメインによって特徴付けられる。

【0021】

本明細書で使用される用語「キメラTfR」は、頂端ドメインの全て、またはサブ領域が、異種トランスフェリン受容体からの対応する頂端ドメイン領域で置換されている、トランセフェリン受容体タンパク質を指す。10

【0022】

本明細書で使用される「トランスフェリン結合部位」は、トランスフェリン、例えば鉄結合トランスフェリンの受容体への結合を媒介するTfRタンパク質のヘリカル及びプロテアーゼ様ドメイン内の領域を指す。トランスフェリン結合部位は、頂端ドメインに対して遠位である。

【0023】

本明細書で使用される「非ヒト哺乳動物トランスフェリン結合部位」は、非ヒト哺乳動物の天然トランスフェリン受容体のトランスフェリン結合部位からの配列、または天然非ヒト哺乳動物トランスフェリンに結合することができるその機能的誘導体を指す。いくつかの実施形態では、非ヒト哺乳動物のトランスフェリン結合部位は、非ヒト哺乳動物の天然トランスフェリン受容体のトランスフェリン結合部位と少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも98%同一のアミノ酸配列を含む。非ヒト哺乳動物の例は、マウス、ラット、ウサギ、ウシ、ヒツジ、イヌ、ネコ、ウマ、ブタ、非ヒト霊長類などが含まれる。20

【0024】

本明細書で使用される「huTfR_{頂端+/-}マウス」は、マウストransferrin受容体の頂端ドメインがヒトトランスフェリン受容体の頂端ドメインで置換されたトランスジェニックマウスであり、トランスジェニックマウスは導入遺伝子についてホモ接合性であることを指す。30

【0025】

本明細書で使用される「huTfR_{頂端+/-}マウス」は、マウストransferrin受容体の頂端ドメインがヒトトランスフェリン受容体の頂端ドメインで置換されたトランスジェニックマウスであり、トランスジェニックマウスは導入遺伝子についてヘテロ接合性であることを指す。

【0026】

本明細書で使用する場合、トランスフェリン受容体またはそのドメインに関する用語「野生型」、「天然」、及び「自然発生」は、天然に存在する配列を有するトランスフェリン受容体またはそのドメインを指す。

【0027】

本明細書で使用される「内因性」トランスフェリン受容体またはそのドメインは、細胞または非ヒト動物で自然に生じる、すなわち、細胞または動物に対する遺伝子修飾が存在しないトランスフェリン受容体を指す。40

【0028】

本明細書で使用する場合、トランスフェリン受容体のあるドメイン、例えば、頂端ドメインに関して「異種」という用語は、トランスフェリン受容体のあるドメインが、その天然の状況の外で発現されるものであり、例えば、通常天然では近接しているトランスフェリン受容体配列から分離されているか、または、通常は近接していないトランスフェリン受容体配列に隣接している（または連続している）ことを指す。

【0029】

10

20

30

40

50

用語「アミノ酸」は、自然発生及び合成のアミノ酸、ならびに自然発生アミノ酸と類似する挙動で機能するアミノ酸類似体及びアミノ酸模倣物を指す。

【0030】

自然発生アミノ酸は、それらが遺伝暗号によってコードされたアミノ酸、及びそれらが後で修飾されるアミノ酸であり、例えば、ヒドロキシプロリン、D-カルボキシグルタミン酸、及びD-ホスホセリンである。自然発生L-アミノ酸は、限定されないが、アラニン(A1a)、システイン(Cys)、アスパラギン酸(Asp)、グルタミン酸(Glu)、フェニルアラニン(Phe)、グリシン(Gly)、ヒスチジン(His)、イソロイシン(Ile)、アルギニン(Arg)、リジン(Lys)、ロイシン(Leu)、メチオニン(Met)、アスパラギン(Asn)、プロリン(Pro)、グルタミン(Gln)、セリン(Ser)、スレオニン(Thr)、バリン(Val)、トリプトファン(Trp)、チロシン(Tyr)、及びこれらの組み合わせを含む。自然発生D-アミノ酸の立体異性体は、限定されないが、D-アラニン(D-A1a)、D-システイン(D-Cys)、D-アスパラギン酸(D-Asp)、D-グルタミン酸(D-Glu)、D-フェニルアラニン(D-Phe)、D-ヒスチジン(D-His)、D-イソロイシン(D-Ile)、D-アルギニン(D-Arg)、D-リジン(D-Lys)、D-ロイシン(D-Leu)、D-メチオニン(D-Met)、D-アスパラギン(D-Asn)、D-プロリン(D-Pro)、D-グルタミン(D-Gln)、D-セリン(D-Ser)、D-スレオニン(D-Thr)、D-バリン(D-Val)、D-トリプトファン(D-Trp)、D-チロシン(D-Tyr)、及びこれらの組み合わせを含む。10

【0031】

本明細書では、アミノ酸は、それらの一般的に知られている3文字記号またはIUPAC-IUB生物学命名法委員会が推奨する1文字記号のいずれかで言及され得る。

【0032】

用語「ポリペプチド」、「ペプチド」、及び「タンパク質」は、アミノ酸残基のポリマーを指すために本明細書で互換的に使用される。この用語は、1つまたは複数のアミノ酸残基が、対応する自然発生アミノ酸の人工的な化学模倣体であるアミノ酸ポリマー、ならびに自然発生アミノ酸ポリマー及び非自然発生アミノ酸ポリマーに適用される。アミノ酸ポリマーは、完全なL-アミノ酸、完全なD-アミノ酸、またはLアミノ酸とDアミノ酸との混合物を含み得る。20

【0033】

「保存的に修飾されたバリエント」は、同様の特徴を有すると分類できる別のアミノ酸によるアミノ酸の置換をもたらす変化を指す。この方法で定義された保存的アミノ酸グループのカテゴリの例は、Glu(グルタミン酸またはE)、Asp(アスパラギン酸またはD)、Asn(アスパラギンまたはN)、Gln(グルタミンまたはQ)、Lys(リジンまたはK)、Arg(アルギニンまたはR)、及びHis(ヒスチジンまたはH)を含む「荷電/極性グループ」、Phe(フェニルアラニンまたはF)、Tyr(チロシンまたはY)、Trp(トリプトファンまたはW)、及び(HisチジンまたはH)を含む「芳香族グループ」、ならびにGly(グリシンまたはG)、Ala(アラニンまたはA)、Val(バリンまたはV)、Leu(ロイシンまたはL)、Ile(イソロイシンまたはI)、Met(メチオニンまたはM)、Ser(セリンまたはS)、Thr(スレオニンまたはT)、及びCys(システインまたはC)を含む「脂肪族グループ」を含む。それぞれのグループのなかで、サブグループも識別できる。例えば、荷電または極性アミノ酸のグループは、Lys、Arg及びHisを含む「正電荷サブグループ」、Glu及びAspを含む「負電荷サブグループ」、ならびにAsn及びGlnを含む「極性サブグループ」を含むサブグループに細分化できる。別の例では、芳香族グループまたは環状グループは、Pro、His及びTrpを含む「窒素環サブグループ」、ならびにPhe及びTyrを含む「フェニルサブグループ」を含むサブグループに細分化できる。別のさらなる例は、脂肪族グループは、例えば、Val、Leu、Gly、及びAlaを含む「脂肪族非極性サブグループ」、ならびにMet、Ser、Thr、及びCysを含む「脂肪族

10

20

30

40

50

微極性のサブグループ」のサブグループに分割できる。保存的変異のカテゴリの例は、上記のサブグループ内のアミノ酸のアミノ酸置換、例えば、これらに限定されないが、正電荷を維持できるような、Argに対してLysまたはLysに対してArg、負電荷を維持できるような、Aspに対してGluまたはGluに対してAsp、遊離-OHを維持できるような、Thrに対してSerまたはSerに対してThr、及び遊離-NH₂を維持できるような、Asnに対してGlnまたはGlnに対してAsnを含む。いくつかの実施形態では、疎水性アミノ酸は、疎水性を維持するために、例えば、活性部位で自然発生疎水性アミノ酸の代わりに用いられる。

【0034】

2つ以上のポリペプチド配列の文脈における用語「同一」またはパーセントの「同一性」は、同じであるまたは指定された割合のアミノ酸残基を有する2つ以上の配列または部分配列、例えば、少なくとも60%の同一性、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、または少なくとも95%またはそれを超え、比較ウインドウ、もしくは配列比較アルゴリズムを使用して、または手動アライメント及び目視検査で測定された指定された領域で、最大の相応性のために比較及び整列された場合、特定の領域で同じであることを指す。10

【0035】

ポリペプチドの配列比較では、通常、1つのアミノ酸配列が参照配列として機能し、候補配列と比較される。アライメントは、当業者が利用可能な様々な方法、例えば、視覚的なアライメントを使用して、または最大のアライメントを達成するために既知のアルゴリズムを使用する公的に利用可能なソフトウェアを使用して実行できる。そのようなプログラムは、BLASTプログラム、ALIGN、ALIGN-2 (Genentech, South San Francisco, Calif.)、またはMegalign (DNA STAR) が含まれる。最大のアライメントを達成するためにアライメントに使用されるパラメータは、当業者によって決定され得る。この用途の目的のためのポリペプチド配列の配列比較のために、2つのタンパク質配列を既定のパラメータと整列させるためのBLASTPアルゴリズム標準タンパク質BLASTが使用される。20

【0036】

用語「含む」は、組成物及び方法に示されている要素が含まれているが、他の要素が排除されないことを意味するように意図されている。組成物及び方法を定義するために使用される場合、「から本質的になる」とは、特定の材料またはステップ、及び特許請求される発明の基本的及び新規特性（複数可）に実質的に影響しないものを指す。「からなる」とは、微量を超える他の成分及び記載されている実質的な方法ステップを除外することを意味する。これらの移行用語のそれぞれによって定義される実施形態は、本発明の範囲内である。30

【0037】

用語「ポリヌクレオチド」、「核酸」、及び「オリゴヌクレオチド」は、互換的に使用され、デオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチドまたはその類似体のいずれかの任意の長さのヌクレオチドのポリマー形態を指す。ポリヌクレオチドは、任意の3次元構造を持つことができ、既知または未知の任意の機能を実行できる。以下は、ポリヌクレオチドの非限定的な例である：遺伝子または遺伝子フラグメント（例えば、プローブ、プライマー、ESTまたはSAGEタグ）、エクソン、イントロン、メッセンジャーRNA (mRNA)、トランスクレア RNA、リボソームRNA、リボザイム、cDNA、組換えポリヌクレオチド、分岐ポリヌクレオチド、プラスミド、ベクター、任意の配列の単離されたDNA、任意の配列の単離されたRNA、核酸プローブ及びプライマー。ポリヌクレオチドは、メチル化ヌクレオチド及びそれらの類似体などの修飾されたヌクレオチドを含むことができる。存在する場合、ヌクレオチド構造への修飾は、ポリヌクレオチドのアセンブリの前または後に付与され得る。ヌクレオチドの配列は、非ヌクレオチド成分によって遮られ得る。ポリヌクレオチドは、例えば標識成分とのコンジュゲーションにより、重合化後にさらに修飾され得る。この用語はまた、二本鎖分子及び一本鎖分子の両方を指す40

。別途明記または要求されない限り、ポリヌクレオチドである本発明の任意の実施形態は、二本鎖形態と、その二本鎖形態を構成することで知られているか、または構成すると予想される2つの相補的な一本鎖形態のそれぞれとの両方を包含する。

【0038】

ポリヌクレオチドは、4つのヌクレオチド塩基の特定の配列で構成されている：アデニン（A）；シトシン（C）；グアニン（G）；チミン（T）；ポリヌクレオチドがRNAの場合、チミンに対してウラシル（U）。したがって、用語「ポリヌクレオチド配列」は、ポリヌクレオチド分子のアルファベットによる表示である。

【0039】

用語「ノックイン」は、所定の遺伝子座におけるDNA配列情報の1対1の置換、または座内に見られない配列情報の挿入を指す。当業者は、様々な遺伝的アプローチ、例えば、CRISPR/Cas9システム、ZFN、TALEN、トランスポゾン媒介挿入を使用して、ゲノムの特定の遺伝子座の標的ポリヌクレオチド配列をノックインする方法を容易に理解するであろう。

【0040】

用語「血液脳関門」または「BBB」は、中枢神経系（CNS）の脳細胞外液から循環血液を分離する高度に選択性の半透膜障壁を指す。血液脳関門は、タイトジャンクションによって接続されている脳内皮細胞によって形成される。

【0041】

トランスフェリン受容体

トランスフェリン受容体は、リガンドが占有するトランスフェリン受容体の受容体媒介性エンドサイトーシスを介して鉄の細胞への取り込みをもたらす。TfRは、ヒトならびに靈長類及びげっ歯類などの非ヒト種の両方に存在する。天然ヒトTfR（huTfR）、Uniprot P02786、配列番号6は、ホモ二量体II型膜貫通タンパク質であり、細胞質ドメイン、膜貫通領域、及び頂端ドメインとトランスフェリン結合ドメインとを含む細胞外ドメインを持つ。huTfRの各モノマーは、構造的に異なる3つのドメイン、膜に近接したプロテアーゼ様ドメイン、全ての二量体の接触を担うヘリカルドメイン、及び膜遠位頂端ドメイン（Lawrence et al., Science, 286 (1999), pp. 779-782）を有する。HuTfRダイマーは、約190,000ダルトンの分子量を有する。配列番号1の配列（配列番号2によりコードされる）を有するhuTfRの頂端ドメインは、トランスフェリンとTfRとの間の相互作用に関与しない。このドメインは、他のタンパク質がTfRに結合するための接触面を提供し得ると推測される。天然カニクイザル、天然アカゲザル、及び天然チンパンジーのTfRもまた、例えば、受託番号XP_005545315、NP_001244232.1、及びXP_003310238.1のそれぞれで言及されるように即知である。天然カニクイザル、天然アカゲザル、及び天然チンパンジーのTfRの頂端ドメインは、それぞれ配列番号1の天然ヒトTfRの頂端ドメインとの約96%、95%、及び98%の配列同一性を共有する。

【0042】

天然マウスTfR（mTfR）、Uniprot Q62351、配列番号5は、huTfRとの約77%のアミノ酸配列同一性を有する。天然mTfRの頂端ドメインは、天然huTfRの頂端ドメインと約74%同一である。mTfRは、ヒトの対応物に類似した3つの構造的に異なるドメインを含む。注釈されたエクソンとイントロンとを含むマウスTfRの完全な遺伝子配列は、NCBIデータベース（遺伝子ID：22042）から見出すことができる。マウスTfRは、16番染色体（NCBI参照配列NC_000082.6）上で見出される。

【0043】

一態様では、キメラTfRポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、キメラTfRは、非ヒト哺乳動物トランスフェリン結合部位と、huTfRの頂端ドメイン、配列番号1との例え、少なくとも75%、少なくとも77%、少なくとも80%、少なくとも

10

20

30

40

50

85%、少なくとも90%、または少なくとも95%のアミノ酸配列同一性を共有する異種頂端ドメインとを含む。いくつかの実施形態では、異種頂端ドメインは、配列番号1、配列番号7、配列番号8、または配列番号9の配列を有する。

【0044】

キメラTfRの非ヒト哺乳動物トランスフェリン結合部位は、非哺乳動物トランスフェリンのキメラTfRへの特異的結合を可能とする。いくつかの実施形態では、非ヒト哺乳動物トランスフェリン結合部位は、天然トランスフェリン結合部位、例えばマウストランスフェリン受容体結合部位である。

【0045】

いくつかの実施形態では、キメラTfRポリペプチドは、天然頂端ドメインのみが異種頂端ドメインによって置換されている天然TfRポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、キメラTfRポリペプチドは、天然TfR結合部位と、例えば、頂端ドメインに加えて少なくとも1つのドメインまたはその領域が非天然アミノ酸配列を有する、天然TfR結合部位に対して異種である頂端結合ドメインとを含む。

10

【0046】

いくつかの実施形態では、キメラTfRポリペプチドは、配列番号3との少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも85%、少なくとも92%、少なくとも95%、または少なくとも98%のアミノ酸配列同一性を有する。一実施形態では、キメラTfRポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、マウストランスフェリン受容体遺伝子のエクソン及びイントロンと、h u T f R 頂端ドメインをコードする核酸配列とを含む。一実施形態では、例えば、非ヒト哺乳動物TfR遺伝子の対応するエクソンをh u T f R 頂端ドメイン配列で置換することにより、非ヒト哺乳動物TfR頂端ドメインはh u T f R 頂端ドメインコード配列で置換される。例示的な実施形態では、非ヒト哺乳動物TfR遺伝子は、マウスTfR遺伝子である。一実施形態では、m T f R 頂端ドメインは、h u T f R 頂端ドメインコード配列により置換され、これは、例えば、キメラTfRを生成するために、マウストランスフェリン受容体遺伝子の第4のエクソンの後に配置される。

20

【0047】

いくつかの態様では、本発明は、本明細書に記載のキメラTfRポリペプチドを含むポリペプチドのいずれかをコードする核酸配列を含む単離された核酸を提供する。いくつかの実施形態では、キメラTfRポリペプチドの異種頂端ドメインをコードする核酸配列の領域は、天然h u T f R の頂端ドメインのコード配列、配列番号2との少なくとも75%、少なくとも77%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、または少なくとも95%の核酸配列同一性を共有する。

30

【0048】

別の態様では、本明細書に記載のキメラトランスフェリン受容体をコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドが提供される。ポリヌクレオチドは、一本鎖または二本鎖であり得る。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドはDNAである。特定の実施形態では、ポリヌクレオチドはcDNAである。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドはRNAである。

【0049】

40

コドン最適化

いくつかの実施形態では、キメラTfRのコード配列、特にh u T f R 頂端ドメインをコードする配列は、マウスでのキメラTfRの発現を改善するためにコドン最適化されている。コドン最適化の方法は、例えば、<http://genomes.urv.es/OPTIMIZER>よりアクセスできるオプティマイザ、及びDNA 2.0 (Newark, California)のGeneGPS (登録商標) Expression Optimization Technologyなど、容易に利用可能である。好ましい実施形態では、コード配列は、GenScript (Piscataway, New Jersey)のOptimumGene (商標) アルゴリズムを使用して、マウスでの発現のためにコドン最適化される。

50

【0050】

非ヒト哺乳動物トランスフェリン受容体の頂端ドメインを所望の頂端ドメインに置換する方法

本明細書に開示される異種頂端ドメインのノックインを含む非ヒトトランスジェニック動物は、様々な方法、例えば、ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ZFN）、テールエフェクタードメインヌクレアーゼ（TALEN）、トランスポゾン媒介システム、及びCRIPSR/Cas9システムを使用して生成することができる。これらの方法は、典型的には、1つまたは複数のヌクレアーゼをコードする1つまたは複数のポリヌクレオチドを細胞に投与し、DNAが切断されてDNA鎖に5'及び3'切断末端が生じることにより内因性遺伝子の修飾を媒介することを含む。5'末端から5'方向に伸びる配列及び3'末端から3'方向に伸びる配列に実質的に相同的な左右の相同アームと隣接しているドナー配列の存在下で、該ドナーは、相同性指向修復（homology-directed repair、HDR）を介してヌクレアーゼの標的となる内因性遺伝子に組み込まれる。いくつかの実施形態では、ノックインは、CRISPR/Cas9システムを使用して実施される。例えば、異種頂端ドメインをコードする核酸配列が、内因性TfR遺伝子に導入され、キメラTfRを生成し、その結果、頂端ドメインをコードする自然発生の配列が置換されるが、遺伝子の全体的な構造は維持される。
10

【0051】

CRISPR

いくつかの実施形態では、配列番号1と少なくとも80%同一である頂端ドメインのノックインは、CRIPSR/Cas9システムを使用して実施される。CRISPR/Cas9システムにはCas9タンパク質、及び置換されるトランスフェリン受容体の頂端ドメイン内の標的モチーフにCas9タンパク質を向けて、この標的モチーフにハイブリダイズできる少なくとも1つまたは2つのリボ核酸が含まれる。これらのリボ核酸は、一般に「シングルガイドRNA」または「sgRNA」と呼ばれる。次に、Cas9タンパク質が標的モチーフを切斷し、二本鎖切斷または一本鎖切斷を引き起こす。2つの相同アームと隣接しているhutfR頂端ドメインコード配列を含むドナーDNAの存在下で、該ドナーDNAが標的トランスフェリン受容体DNAに挿入され、頂端ドメインが置換される。
20

【0052】

本発明で使用されるCas9タンパク質は、自然発生Cas9タンパク質またはその機能的誘導体であり得る。天然配列ポリペプチドの「機能的誘導体」は、天然配列ポリペプチドと共に定性的な生物学的特性を有する化合物である。「機能的誘導体」には、対応する天然配列ポリペプチドと共に生物学的活性を有するという条件で、天然配列のフラグメント、ならびに天然配列ポリペプチド及びそのフラグメントの誘導体が含まれるが、これらに限定されない。本明細書で企図される生物活性は、Cas9の機能的誘導体がDNA基質を加水分解してフラグメントにする能力である。Cas9ポリペプチドまたはそのフラグメントの好適な機能的誘導体は、Cas9タンパク質またはそのフラグメントの変異体、融合体、共有結合修飾を含むが、これらに限定されない。
30

【0053】

いくつかの態様において、Cas9タンパク質はStreptococcus pyogenes由来である。Cas9は、sgRNAに非相補的な標的DNAを切斷するRuvC様ドメインと、sgRNAに相補的な標的DNAを切斷するHNHヌクレアーゼドメインとを含む、2つのエンドヌクレアーゼドメインを含む。Cas9の二本鎖エンドヌクレアーゼ活性は、プロトスペーサー関連モチーフ（PAM）として知られる短い保存配列（2~5ヌクレオチド）が、標的配列内の標的モチーフの3'の直後に続くことも必要とする。いくつかの実施形態では、PAMモチーフはNGGモチーフである。例示的な一実施形態では、マウス遺伝子のエクソン4と9との間の領域に対してsgRNAによって指向されるCas9タンパク質を使用することによって、マウスの頂端ドメインが置換される。ドナーDNAは、反応に対して導入される。ドナーDNAは、エクソン4の上流から始
40

まるマウス T f R 配列に相同な左の相同アームとエクソン 9 内で始まるマウス T f R 配列に相同な右の相同アームとの間にある、ヒト頂端ドメインコード配列を含む。ある特定の実施形態では、左の相同アームは、エクソン 4 の上流から始まる 8 1 7 ヌクレオチドがマウス T f R 配列と重複し、右の相同アームは、エクソン 9 内で始まる 8 0 7 ヌクレオチドがマウス T f R 配列と重複する。結果として、配列番号 1 と少なくとも 8 0 % 同一のアミノ酸配列を有するような所望の頂端ドメインをコードするヌクレオチド配列は、第 4 のマウスのエクソンの後に挿入することができ、挿入されたヌクレオチド配列は、その 3' 末端に、適切に続くマウスエクソンが隣接する。いくつかの実施形態では、マウス T f R 遺伝子に挿入されるヒト頂端ドメインコード配列は、マウス発現のためにコドン最適化されている。

10

【 0 0 5 4 】

s g R N A は、使用する特定の C R I S P R / C a s 9 システム及び標的ポリヌクレオチドの配列に応じて選択できる。いくつかの実施形態では、1 ~ 2 つのリボ核酸は、C a s 9 タンパク質によって認識されるデオキシリボ核酸モチーフに直接隣接する標的モチーフにハイブリダイズするように設計されている。いくつかの実施形態では、1 ~ 2 個のリボ核酸のそれぞれは、C a s 9 タンパク質によって認識されるデオキシリボ核酸モチーフに直接隣接する標的モチーフにハイブリダイズするように設計され、標的モチーフは、置換されるゲノム配列に隣接する。ガイド R N A は、例えば、h t t p : / / c r i s p r . m i t . e d u などの簡単に入手できるソフトウェアを使用して設計できる。キメラ T f R トランスジェニックマウスを生成するために使用できる例示的な s g R N A には、配列番号 1 0 ~ 1 1 が含まれる。

20

【 0 0 5 5 】

本明細書に開示されるドナー D N A は、配列番号 1 と少なくとも 7 5 % 同一のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、ドナー D N A は、配列番号 1 をコードする配列、または配列番号 1 との少なくとも 7 5 %、少なくとも 7 7 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、または少なくとも 9 5 % のアミノ酸配列同一性を共有する配列をコードする配列を含む。いくつかの実施形態では、ドナー D N A は、配列番号 2 のヌクレオチド配列、または配列番号 2 との少なくとも 6 0 %、少なくとも 7 0 %、少なくとも 7 7 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、または少なくとも 9 5 % の配列同一性を共有する配列を含む。本明細書で開示されるドナー D N A は、頂端ドメインコード配列に隣接し、C a s 9 タンパク質による切断部位に対して 5' 及び 3' エクソン配列と重複するように設計された左の相同アーム及び右の相同アームをさらに含む。相同アームは、5' 及び 3' エクソン配列を超えて伸び得、各相同アームは少なくとも 2 0 、 3 0 、 4 0 、 5 0 、 1 0 0 、または 1 5 0 ヌクレオチド長であり得る。当業者は、実験に必要な相同アームの最適な長さを容易に決定できる。例示的な一実施形態では、ドナー D N A の左相同アームは配列番号 4 のヌクレオチド 1 ~ 8 1 7 に及び、右相同アームは配列番号 4 のヌクレオチド 1 5 2 3 ~ 2 3 2 9 に及ぶ。いくつかの実施形態では、左相同アームは、配列番号 4 のヌクレオチド 1 ~ 8 1 7 との少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、または少なくとも 9 8 % の配列同一性を共有する。いくつかの実施形態では、右相同アームは、配列番号 4 のヌクレオチド 1 5 2 3 ~ 2 3 2 9 との少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、または少なくとも 9 8 % の配列同一性を共有する。

30

【 0 0 5 6 】

いくつかの実施形態では、s g R N A はまた、標的ポリヌクレオチド配列以外の核酸配列とのハイブリダイゼーションを最小化するように選択できる。いくつかの実施形態では、C R I S P R / C a s 9 システムのオフターゲット効果を最小限に抑えるために、1 ~ 2 つのリボ核酸は、細胞内の他の全てのゲノムヌクレオチド配列と比較したときに少なくとも 2 つの不一致を含む標的モチーフにハイブリダイズするように設計されている。当業者は、オフターゲット効果を最小化するための好適な標的モチーフを選択するために様々な技術（例えば、バイオインフォマティクス分析）が使用できることを理解するであろう

40

50

。 C R I S P R / C a s 9 システムを使用して遺伝子発現を低減する方法は、様々な出版物、例えば、米国特許公開第 2 0 1 4 / 0 1 7 0 7 5 3 号、及び第 2 0 1 6 / 0 2 5 7 9 7 4 号に記載されており、その開示はその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【 0 0 5 7 】

ジンクフィンガーヌクレアーゼ (Z F N)

いくつかの実施形態では、キメラ T f R は、 Z F N を使用して h u T f R 頂端ドメインをノックインすることによって生成される。 Z F N は、 F o k I エンドヌクレアーゼの非特異的切断ドメイン (N) とジンクフィンガータンパク質 (Z F P) とを含む融合タンパク質である。 Z N F のペアは、標的遺伝子の特定の遺伝子座を認識するために関与しており、一方は修飾される部位の上流の配列を認識し、もう一方は修飾される部位の下流の配列を認識する。 Z F N のヌクレアーゼ部分は、特定の遺伝子座で切斷する。次に、上記のようなドナー D N A は、特定の遺伝子座に挿入できる。 Z F N を使用して遺伝子発現を低減する方法は、例えば、米国特許第 9 , 0 4 5 , 7 6 3 号、及びさらに D u r a i e t a l . , " Zinc Finger Nucleases : Custom - Designed Molecular Scissors for Genome Engineering of Plant and Mammalian cells , " Nucleic Acid Research , 3 3 (1 8) : 5 9 7 8 - 5 9 9 0 (2 0 0 5) にも開示されているように周知であり、その開示はその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

10

【 0 0 5 8 】

転写活性化因子様エフェクタースクレアーゼ (T A L E N)

いくつかの実施形態では、キメラ T f R は、 h u T f R 頂端ドメインを T A L E N と共にノックインすることにより生成される。 T A L E N は、ゲノム部位の周囲にペアとして結合し、同じ非特異的ヌクレアーゼ F o k I に指示して特定の部位でゲノムを切斷するという点で Z F N と類似するが、 D N A の三塩基を認識する代わりに、各ドメインが単一のヌクレオチドを認識する。 Z F N を使用して遺伝子発現を低減する方法は、例えば、米国特許第 9 , 0 0 5 , 9 7 3 号、及びさらに C h r i s t i a n e t a l . , " Targeting DNA Double - Strand Breaks with T A L E f f e c t o r N u c l e a s e s , " Genetics , 1 8 6 (2) : 7 5 7 - 7 6 1 (2 0 1 0) にも開示されているように周知であり、その開示はその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

20

【 0 0 5 9 】

キメラ T F R を発現する宿主細胞 / トランスジェニック動物

いくつかの実施形態では、本発明は、例えば、上記のキメラトランスフェリン受容体をコードする核酸配列を含むキメラ T f R を発現する宿主細胞を提供する。いくつかの実施形態では、宿主細胞は非ヒト哺乳動物細胞である。上記のノックイン方法のいずれか、すなわち、 C R I S P R 、 T A L E N 、ジンクフィンガーヌクレアーゼを使用して、宿主細胞内の天然トランスフェリン受容体の頂端ドメインを、配列番号 1 と少なくとも 8 0 % 同一のアミノ酸配列を有する異種頂端ドメインで置換することができる。いくつかの実施形態では、宿主細胞は真核生物、例えば、配列番号 1 と少なくとも 8 0 % 同一のマウス細胞である。いくつかの場合では、宿主細胞は、 s g R N A 及び C a s 9 、異種頂端ドメインをコードする核酸配列を含むドナー D N A と接触され、該核酸配列は、左右の相同アームと隣接している。 s g R N A 及び相同アームは、異種頂端ドメインコード配列がゲノム内の位置に挿入され、宿主細胞の天然トランスフェリン受容体の頂端ドメインのコード配列を置換するような配列を有する。いくつかの実施形態では、宿主細胞は、マウス、ラット、ウサギ、ウシ、ヒツジ、イヌ、ネコ、ウマ、ブタなどの非靈長類哺乳動物由来の細胞である。

30

【 0 0 6 0 】

いくつかの実施形態では、キメラトランスフェリン受容体ポリペプチドを発現する胚性幹 (E S) 細胞を產生するために、 E S 細胞でノックインする方法が実施される。次いで、胚性幹細胞は、ゲノムがキメラトランスフェリン受容体ポリペプチドをコードする核酸

40

50

を含む子孫細胞または非ヒトトランスジェニック動物へと発達し得る。いくつかの実施形態では、E S 細胞は、胚盤胞に導入され、偽妊娠雌に移植される。いくつかの場合では、導入遺伝子を保有する始祖の雄が選択され、野生型の雌と交配させてF 1 ヘテロ接合マウスを生成できる。ホモ接合の非ヒト動物は、F 1 世代のヘテロ接合の非ヒト動物の繁殖から引き続き生成することができる。E S 細胞を培養し、ヌクレオチド配列を導入してE S 細胞のゲノムを標的にしてトランスジェニック動物を生成する方法は、例えば、Ramirez-Solis et al., "Gene targeting in mouse embryonic stem cells," Methods Enzymol., 225: 855 - 878 (1993)、及び米国特許公開第2013/0318643号に開示されているように周知であり、その開示はその全体が参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、本発明のキメラT f R を有するトランスジェニック動物由来の胚性幹細胞は、トランスジェニック動物の子孫を提供するための供給源として使用することができる。

【0061】

いくつかの実施形態では、ノックインの方法は、単一細胞の非ヒト動物で実行される。例示的な一実施形態では、sg RNA、Cas 9、及びドナーポリヌクレオチドは、配列番号1と少なくとも80%同一である頂端ドメインコード配列を含み、コード配列は、左の相同アーム及び右の相同アームと隣接しており、前核マイクロインジェクションを介して単一細胞胚に導入される。その後、レシピエントの胚は偽妊娠雌に移植される。sg RNAは、Cas 9タンパク質と複合体を形成し、非ヒト動物胚のトランスフェリン受容体の頂端ドメインのコード配列を標的にする。結果として、非ヒト動物のトランスフェリン受容体頂端ドメインは切断され、ドナーポリヌクレオチドからのトランスフェリン受容体頂端ドメインコード配列で置換される。いくつかの場合では、導入遺伝子を保有する始祖の雄が選択され、野生型の雌と交配させてF 1 ヘテロ接合マウスを生成できる。ホモ接合の非ヒト動物は、F 1 世代のヘテロ接合の非ヒト動物の繁殖から引き続き生成することができる。本明細書に開示されるトランスジェニック動物はげっ歯類、例えばマウスまたはラットであり得る。

【0062】

例示的な一実施形態では、非ヒトトランスジェニック動物、例えば非靈長類哺乳動物がイントロン及び天然T f R のトランスフェリン結合ドメインを保持するという事実に一部起因し、配列番号1と少なくとも80%同一のアミノ酸配列を有する頂端ドメインをノックインすることによって生成されたトランスジェニック動物は、一般的に健康であり、同種の野生型マウスの生理的状態と同様の生理的状態を示す。一実施形態では、T f R の頂端ドメイン外の全てのイントロンが保持される。例えば、T f R の発現レベルは、同種の野生型動物に類似し、トランスジェニックマウスの発現レベルは、野生型マウスの発現レベルよりも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、または90%以内低く、または野生型マウスよりも10%、20%、30%、40%、50%、75%、100%、150%、200%、300%、または500%以内高い。赤血球数、ヘモグロビンのレベル、及び/またはヘマトクリットのレベルも、同種の野生型動物と同様であり、差は50%未満、例えば40%未満、30%未満、20%未満、または10%未満である。典型的な実施形態では、本発明によるトランスジェニック動物は、栄養素及びタンパク質の取り込みを可能にする選択的B B B 輸送を保持し、毒素からC NS を保護する能力を保持し、導入遺伝子の存在は、下記の頂端ドメインに結合する抗体へのトランスフェリン結合またはFc R n 結合を阻害しない。通常、トランスジェニック動物でのT f R を介した細胞輸送は、これらの野生型動物にも類似する。本発明によるトランスジェニック動物は、ヒトT f R を完全に欠く野生型マウスまたはh u T f R 細胞外ドメイン全体を発現する（例えば、h u T f R タンパク質全体を発現する）トランスジェニック動物モデルよりも、ヒトB B B 浸透性薬物の薬物動態または薬力学的研究のモデルとしてより好適である。

【0063】

10

20

30

40

50

本発明は、実施例に示されるようにマウスで説明されているが、当業者には、他の非ヒト哺乳動物、例えば、げっ歯類、ウサギ、ウシ、ヒツジ、イヌ、ネコ、ウマ、ブタ、ラクダ科動物、非ヒト靈長類、及び他の哺乳動物も同様に操作してキメラT f Rを発現させることができることが理解され、これらのトランスジェニック動物は、本明細書に開示される用途にも使用できる。

【0064】

頂端ドメイン結合ポリペプチド

本明細書で使用される「頂端ドメイン結合ポリペプチド」または「A D B P」は、配列番号1と少なくとも80%同一のアミノ酸配列を有する頂端ドメインに結合するポリペプチドを指す。A D B Pは、キメラT f Rのh u T f Rの頂端ドメインに結合することができる抗体または任意のポリペプチドであり得る。いくつかの実施形態では、A D B Pは、血液脳関門を通過して送達される薬剤である。いくつかの実施形態では、A D B Pは、例えば共有結合によりそれに結合したエフェクター分子をさらに含む。エフェクター分子は、治療薬、標識薬、または診断薬であり得る。ある特定の実施形態では、エフェクター分子は、治療用または診断用抗体などのポリペプチド、または酵素もしくはシグナル伝達分子に対して酵素活性もしくは阻害活性を有するポリペプチドである。ある特定の実施形態では、エフェクター分子は、小分子、R N A、D N A、またはタンパク質を含む。

10

【0065】

いくつかの実施形態では、A D B Pは二重特異的抗体であり、頂端ドメイン結合領域は頂端ドメインを認識する抗体、エフェクター分子は異なる抗原、例えば酵素またはシグナル伝達分子を認識する抗体であり、エフェクター部分の結合は、酵素またはシグナル伝達分子を活性化または阻害する。

20

【0066】

キメラT f Rに結合するA D B Pのスクリーニング

本明細書に開示されるキメラT f Rを使用して、T f Rに結合することができるA D B Pをスクリーニングすることができる。スクリーニングする方法は、候補A D B Pを上記に開示されたキメラT f Rと接触させるステップと、キメラT f Rに結合する候補A D B Pの量を決定するステップとを含む。いくつかの実施形態では、候補A D B PをキメラT f Rと接触させるステップは、A D B Pを、キメラT f Rを発現する宿主細胞と接触させることを含む。いくつかの場合では、候補A D B PをキメラT f Rと接触させるステップは、A D B Pを、キメラT f Rを発現する内皮と接触させることを含む。いくつかの実施形態では、内皮はB B B内皮である。

30

【0067】

候補A D B PとT f Rとの間の相互作用は、当技術分野で周知の方法、例えばイムノアッセイまたはS P Rを使用して測定することができる。いくつかの実施形態では、候補A D B PのキメラT f Rへの結合は、E L I S A、B i a c o r e(商標)システム、または免疫共沈降によって測定される。

【0068】

B B Bを通過できるA D B Pのスクリーニング

上記のキメラT f Rを発現する非ヒトトランスジェニック動物を使用して、キメラT f Rの頂端ドメインに結合するA D B Pの能力、及び最終的にB B Bを通過する能力を特徴付けることができる。

40

【0069】

典型的に、A D B PがB B Bを通過する能力を評価するために、好ましくは静脈注射により、A D B Pは、本明細書に開示されるキメラT f Rを保有するトランスジェニック動物に投与される。一定時間後、例えば、少なくとも10分、少なくとも20分、少なくとも30分、少なくとも60分、少なくとも90分、少なくとも120分、少なくとも180分、または少なくとも240分、トランスジェニック動物は殺され、脳組織が分析されてA D B Pの存在を決定する。A D B Pの存在は、A D B P及び/またはそれに結合したエフェクター分子の存在についてアッセイすることにより決定することができる。いく

50

つかの実施形態では、脳組織は生理食塩水、例えばP B Sで灌流され、検出前に固定される。切片内のエフェクター分子の存在は、標準的な撮像法、例えば免疫組織化学法または免疫蛍光法を使用して検出できる。脳組織内のエフェクター分子の陽性検出は、エフェクター分子がB B Bを通過できることを示す。いくつかの場合では、脳内のA D B Pの存在の決定は、定量的イムノアッセイの実施が含まれる。キメラT f Rトランスジェニックマウスを使用してB B Bを通過する輸送を測定するアッセイは強固であり、A D B Pの取り込みの10倍、20倍、30倍、40倍、または50倍を超える改善を測定できる。

【0070】

いくつかの実施形態では、脳内のA D B Pの存在を検出するための撮像法またはイムノアッセイの使用に加えて、エフェクター分子の基質の変化を検出する方法も使用して、エフェクター分子の脳への取り込みを評価することができる。例示的な一実施形態では、A D B Pは、脳内の酵素の酵素活性を阻害することができるエフェクター分子を含む。いくつかの実施形態では、A D B Pの脳への取り込み、すなわち、B B B輸送の能力を示すのは、A D B Pまたはそれに結合したエフェクター分子のいずれかによって調節される酵素の酵素活性を評価することにより測定できる。

【0071】

いくつかの実施形態では、候補A D B Pの脳への取り込みは、脳内で測定される。血漿もモニタリングでき、薬物動態プロファイルを評価できる。候補エフェクター分子の投与後、非B B B通過性分子と比較した脳対血漿比の増加は、候補A D B PがB B Bを通過できることを示す。

【0072】

いくつかの場合では、キメラT f Rをコードするポリヌクレオチドを含む非ヒトトランスジェニック動物を、ある特定の疾患表現型を示すように操作された非ヒトトランスジェニック動物と交配させることができる。いくつかの場合では、非ヒトトランスジェニック動物は、様々なマウスマodel、例えば米国特許第8,476,485号に記載されるようなA L Sマウスマodel、米国特許第5,898,094号及び米国特許第6,175,057号に記載されるようなA Dマウスマodel、米国特許公開第2016/0050895号に記載されるようなT S P Oマウスマodel、米国特許公開第2014/0041062号に記載されるような自閉症スペクトラム障害(A S D)マウスマodelと交配できるトランジェニックマウスである。これらの前述の特許及び特許出願の全内容は、参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの場合では、そのような交配によって生成されたハイブリッドマウスを使用して、脳内のエフェクター分子を含むA D B Pの分布と、脳疾患の治療におけるA D B Pまたはエフェクター分子の有効性との両方を評価できる。

【0073】

キット

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のキメラトランスフェリン受容体ポリヌクレオチドまたはポリペプチド、またはそのようなポリペプチドを発現する細胞を含むキットが提供される。いくつかの実施形態では、キットは、上記のA D B Pのスクリーニングに使用するためのものである。

【0074】

いくつかの実施形態では、キットは、キメラT f Rポリペプチドと候補A D B Pとの間の結合を検出するアッセイで使用できる緩衝液及び容器をさらに含む。いくつかの実施形態では、キットは、本明細書に記載の方法の実施のための指示(すなわち、プロトコル)を含む説明資料(例えば、血液脳関門を通過して組成物を投与するためのキットの使用説明書)をさらに含む。通常、説明書は文書または印刷物を含むが、これに限定されない。そのような指示を保存し、それらをエンドユーザーに伝えることができる任意の媒体が、本発明によって企図される。そのような媒体は、電子記憶媒体(例えば、磁気ディスク、テープ、カートリッジ、チップ)、光学媒体(例えば、C D - R O M)などが含まれるが、これらに限定されない。そのような媒体は、そのような説明書を提供するインターネットサイトのアドレスが含まれ得る。

10

20

30

40

50

【実施例】**【0075】**

以下の実施例は、例示のみを目的とするものであり、特許請求される発明の限定として解釈されるべきではない。同様に、意図する発明を首尾よく実行することを可能にする、当業者が利用可能な様々な代替技術及び手順がある。

【0076】**実施例1：h u T f R マウスの生成及び特徴付け**

ノックイン／ノックアウトマウスを生成する方法は文献に発表されており、当業者には周知である。簡単に説明すると、C 5 7 B 1 6 マウスを使用して、単細胞胚への前核マイクロインジェクションを介してヒトの頂端T f R マウス系統のノックインを生成し、続いて偽妊娠雌へ胚移植した。具体的には、C a s 9 、s g R N A 、配列番号10～11、及びドナーD N A 、配列番号4が胚に導入された。ドナーD N A は、マウスでの発現のためにコドン最適化されたヒト頂端ドメインコード配列、配列番号2を含んでいた。頂端ドメインコード配列は、左の相同アーム（配列番号4のヌクレオチド1～817）及び右の相同アーム（配列番号4のヌクレオチド1523～2329）と隣接していた。ドナー配列は、この方法で設計され、頂端ドメインが第4のマウスエクソンの後に挿入され、その3'末端に第9のマウスエクソンが直接隣接した。胚を移植された雌の子孫からの始祖の雄は、野生型の雌と交配させて、F 1 ヘテロ接合マウスを生成した。続けて、ホモ接合マウスは、F 1 世代のヘテロ接合マウスの繁殖から生成された。

10

【0077】**実施例2：抗体の脳への取り込みをモニタリングするためのツール抗体の生成**

ヒトT f R またはヒト／マウスB A C E 1を標的とするツール抗体は、重鎖と軽鎖とをコードするD N A を含む発現プラスミドでE x p i 2 9 3 またはE x p i C H O 細胞を形質転換し、当業者に周知のプロトコルを使用して生成された。二重特異的抗体は、「k n o b s - i n t o - h o l e s」技術を使用して生成され、k n o b とh o l e とのハーフ抗体は別々に発現され、公開された方法を使用して結合された。抗体は、最初にプロテインAで精製し、次にサイズ排除クロマトグラフィで精製された。これらの研究のために生成された抗体は以下である：

20

抗T f R : ヒトT f R 頂端ドメインに結合するヒトI g G 1 抗体。

抗B A C E 1 : ヒトB A C E 1に結合し、マウスB A C E 1と交差反応するヒトI g G 1 抗体。この抗体は、B A C E 1の酵素活性を阻害する。

30

抗T f R / B A C E 1 : ヒトT f R 頂端ドメインならびにヒト及びマウスB A C E 1に結合するヒトI g G 1 k n o b s - i n t o - h o l e s 二重特異的抗体。k n o b ハーフ抗体は、抗B A C E 1 抗体からの可変ドメインを有し、h o l e ハーフ抗体は、抗T f R 抗体からの可変ドメインを有する。

40

【0078】**実施例3：h u T f R 頂端+/- 及びh u T f R 頂端+//+ マウスの血液分析**

血液は、野生型C 5 7 B 1 6 、h u T f R 頂端+/- 、h u T f R 頂端+//+ マウス（n = 3 / グループ）から採取され、標準的な全血球算定（C B C ）分析が実施された。遺伝子型特異的な違いは、総赤血球、ヘモグロビン、及びヘマトクリットレベルを含む全ての赤血球パラメータにおいて観察されなかった（図1）。

40

【0079】**実施例4：h u T f R 頂端+/- 及びh u T f R 頂端+//+ マウスにおけるT F R 標的抗体の脳局在**

この例では、抗T f R 抗体は、h u T f R 頂端+/- マウスにおけるT f R 標的治療薬の脳への取り込みを評価するために生成された。h u T f R 頂端+/- マウスまたは野生型C 5 7 B 1 6 は、5 m g / k g の抗T f R 抗体を静脈注射された。1時間後、マウスは殺され、P B S で灌流された。半脳は、4 % P F A 内に一晩入れて固定した後、3 0 % スクロースで保存した。矢状脳切片（3 5 μ m ）はミクロトームを使用して切断され、5 % B S A + 0 . 3 % T r i t o n X - 1 0 0 でブロックされた後、A l e x a 4 8 8 抗h u

50

IgG1(1:500)で蛍光二次染色した。脳画像は、20倍の対物レンズを備えたZeissの広視野顕微鏡を使用して撮影された。有意な血管染色がhuTfR頂端+/+マウスで観察され、TfRが高度に発現している BBB の脳内皮細胞上のヒト頂端特異的抗TfRの強固な結合が示された(図2)。対照的に、ごく少量の染色が野生型マウスで観察された。

【0080】

TfR特異的 BBB 輸送を確認するために、抗BACE1抗体及び抗TfR/BACE1二重特異性抗体は、上記と同様のアプローチを使用して試験された。huTfR頂端+/+マウスは、50mg/kgのどちらかの一方の抗体を静脈注射された。24時間後、マウスはPBSで灌流され、huTfR頂端+/+マウスについて上記のように、半脳を処理して染色した。広範な脳実質の染色が抗TfR/BACE1で観察されたが、抗BACE1では染色は観察されず、TfR頂端ドメイン結合ポリペプチドが、これらのマウスの BBB のトランスサイトーシスに必要とされることを示した(図3)。

10

【0081】

実施例5：huTfR頂端+/+マウスにおける抗体の脳及び血漿のPK/PD

この実施例では、huTfR頂端+/+マウスは、50mg/kgの抗BACE1抗体または抗TfR/BACE1二重特異的抗体のどちらか一方を静脈注射された。24時間後、血液は心臓穿刺を介して採取され、マウスはPBSで灌流された。脳組織は、10倍の組織重量のPBS中に1%NP-40を含有する溶解緩衝液で均質化された。血液は、EDTAチューブに採取され凝固するのを防止し、血漿を分離するために14000rpmで7分間回転させた。マウス血漿及び脳溶解物中の抗体濃度は、製造元の指示に従って、一般的なヒトIgGアッセイ(MSD human IgG kit #K150JLD)を使用して定量された。簡単に説明すると、事前にコーティングしたプレートは、MSD Blocker Aで30分間ブロックされた。血漿試料は、Hamilton Nimbusリキッドハンドラを使用して1:10,000に希釈され、ブロックされたプレートに二重に添加された。脳試料は、1%NP40溶解緩衝液で均質化され、溶解物をPK分析用に1:10に希釈した。投与溶液もまた同じプレートで分析され、正確な投与量を確認した。0.78~200ng/mLのIgGの標準曲線は、4パラメータロジスティック回帰を使用して適合された。

20

【0082】

24時間後、抗TfR/BACE1の血漿レベルは、抗BACE1のレベルよりも低く、おそらく、末梢で発現したhuTfR頂端への結合を介したこの抗体のクリアランスのためである(図4A)。脳内では、抗BACE1と比較して、抗TfR/BACE1の濃度の約28倍の増加が観察された(図4B)。抗TfR/BACE1の顕著な蓄積は、BBBでのTfRを介したトランスサイトーシスによるものであり、この結果は、huTfR頂端+/+マウスがヒトTfR頂端ドメイン結合ポリペプチドのBBB取り込みを測定するためのツールであることを立証する。

30

【0083】

アミロイド前駆体タンパク質(APP)切断のBACE1阻害は、血漿及び脳における抗体活性の薬力学的読み出しとして使用された。脳組織は、10倍の組織重量の5Mグアニジン-HClで均質化され、次いでPBS中の0.25%カゼイン緩衝液で1:10に希釈された。血漿及び脳溶解物中のマウスA40レベルは、サンドイッチELISAを使用して測定された。384ウェルのMaxisorpプレートは、A40ペプチドのC末端に特異的なポリクローナル捕捉抗体(Millipore#ABN240)で一晩コーティングされた。カゼイン希釈グアニジン脳溶解物は、ELISAプレートでさらに1:2に希釈され、検出抗体であるビオチン化M3.2と同時に添加された。血漿は、1:5希釈で分析された。試料は、ストレプトアビシン-HRP、続いてTMB基質を加える前に4で一晩培養された。標準曲線、0.78~50pg/mLのmSA40は、4パラメータロジスティック回帰を使用して適合された。

40

【0084】

50

抗 B A C E 1 と比較して、抗 T f R / B A C E 1 治療は h u T f R 頂端 + / + マウスの A ベータの減少を増加させ、脳内における B A C E 1 標的の関与が抗 T f R / B A C E 1 を使用して達成されることを示す（図 4 C）。血漿 A ベータは、未処理の野生型マウスと比較して、抗 T f R / B A C E 1 及び抗 B A C E 1 の両方で同程度に減少された（図 4 D）。これらのデータは、特にヒト T f R 頂端ドメイン結合ポリペプチドの評価のために、ヒト T f R を介した脳への取り込みを必要とする標的に関与する研究における h u T f R 頂端 + / + マウスの使用を支持する。

【 0 0 8 5 】

実施例 6 : h u T f R 頂端 + / + マウスにおける T f R の発現

T f R 発現レベルが h u T f R 頂端 + / + マウスで変化するかを決定するために、野生型及び h u T f R 頂端 + / + マウスから脳及び様々な末梢組織が分離された。脳、肝臓、肺、及び腎臓は、P B S の灌流後のマウスから採取された。組織は、10倍の組織重量の P B S 中に 1% N P - 4 0 を含有する溶解緩衝液で均質化された。試料はウエスタンプロットで実施され、T f R 発現レベルは T f R の細胞内部分を認識し、その結果野生型と h u T f R 頂端 + / +との両方に対して交差反応する T f R 抗体（1 : 2 0 0 0 ; Thermo Fisher # 1 3 - 6 8 0 0 ）を使用して決定された。T f R 発現の定量化は、アクチンとの比として表された（1 : 5 0 0 0 ; Abcam 8 2 2 7 ）。図 5 A ~ 5 D は、h u T f R 頂端 + / + マウスにおける T f R 発現が、野生型マウスにおける脳（図 5 A）、肝臓（図 5 B）、腎臓（図 5 C）、及び肺（図 5 D）と非常に類似していることを示す。

【 0 0 8 6 】

本明細書に記載される実施例及び実施形態が例証のみを目的とするものであり、それを考慮した様々な修正または変更が当業者に示唆され、本出願の趣旨及び範囲ならびに添付の特許請求の範囲内に含まれるべきであることが理解される。本明細書で引用される全ての刊行物、配列受託番号、特許、及び特許出願は、あらゆる目的のために参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。

【 0 0 8 7 】

例示的な配列の表

配列番号 1 : ヒト頂端ドメイン挿入物のタンパク質配列

AQNSVIIVDKNGLRVYLVENPGGYVAYSKAATVTGKLVHANFGTKKDFEDLYTPVNGSIVIV
RAGKITFAEKVANAESLNAIGVLIYMDQTKFPIVNAELSFFGH AHLGTGDPYTPGFPSFNHT
QFPPSRSSGLPNIPVQTISRAAAEKLFGNMEGDCPSDWKTDS CRMVTSESKNVKLT VSN

10

20

30

配列番号 2 : ヒト頂端ドメイン挿入物の D N A 配列

GCTCAGAACTCCGTGATCATCGTGGATAAGAACGGCCGGCTGGTGTACCTGGTGGAGAACCC
TGGCGGATACGTGGCTTACTCTAAGGCCGCTACCGTGACAGGAAGCTGGTGCACGCCAAGT
TCGGAACCAAGAAGGACTTTGAGGATCTGTACACACCAGTGAACGGCTCTATCGTATCGTG
CGCGCTGGAAAGATCACCTCGCCGAGAAGGTGGCTAACGCCGAGAGCCTGAACGCCATCGG
CGTGCTGATCTACATGGATCAGACAAAGTTCCCATCGTGAACGCTGAGCTGTCTTTCTTTG
GACACGCTCACCTGGCACC GGAGACCCATACACACCCGGATTCCCTAGCTTAAACCACACC
CAGTTCCCCCTCCAGGTCTAGCGGACTGCCAACATCCCCGTGCAGACAATCAGCAGAGC
CGCTGCCGAGAAGCTGTTGGAACATGGAGGGAGACTGCCCTCCGATTGGAAGACCGACT
CTACATGTAGGATGGTGACCTCCGAGTCAAAATGTCAAACCTACCGTGTCCAAT

40

配列番号 3 : トランスジェニックマウスにおいて発現したキメラ T f R 配列（斜体部分は細胞質ドメインを表し、太字部分は膜貫通ドメインを表し、灰色の部分は細胞外ドメインを表し、ならびに太字及び下線が引かれた部分は頂端ドメインを表す）

50

MMDQARS AFSNLFGGEPLSYTRFLARQVDGDNSH VEMKLAADEEENADNNMKASVRKP KRF
 NGRL CFAAIALV IFFLIGFM SGY LGY CKRVEQKEECV KLAETEETDKSETMETEDVPTSSRL
 YWADLK TLLSEK LNSIEFADTIKOLSONTYTPREAGSQKDESLAYYIENQFHEFKFSKVWRD
EHYVKIQVKSSAQNSVIIVDKNGLVYLVENPGGYVAYSKAATVTGKLVHANFGTKKD FEDL
YTPVNGSIVTVRAGKITFAEKVANAESLNAIGVLIYMDQT KFPIVNAELSFEGHAHLGTGDP
YTPGFPSFNHTQFPPSRSSGLPNIPVQTISRAAAEKLFGNMEGDCPSDWKT DSCRMVTSES
KNVKLT VSNVLKERRILNIFGVIKGYEEPDRYVVVAQRDALGAGVAAKSSVGTGLLKL AQ
VFSDMISKDGFRPSRSIIIFASWTAGDFGAVGATEWLEGYLSSLHLKAFTYINLDKVVLGTSN
EKVSASPLLYTLMGKIMQDVKHPVDGKSLYRDSNWISKVEKLSFDNAAYPFLAYSGIPAVSF
CFCEDADYPYLGTRLDTYEALTQKVPOLNOMVR TAAEVAGOLI I KLT HDVELNLDYEMYN SK
LLS FMKDLNQFKTDI RD MGLS LQWL YSARGDYFRATSRLTTDFHNAEKTNRFVMREINDRIM
KVEYHFLSPYVSPRESPFRHIFWGSGSHTLSALVENLKLROKNITAFNETLFRNQLA LATWT
I QGVANALSGDIWNIDNEF

10

配列番号4：完全なドナーDNAの配列（左の相同アーム：1～817、右の相同アーム：1523～2329、ヒト頂端ドメイン：941～1492、コドン最適化配列：821～1522）

CTATACAGATATAAGGATGGGGCTTTTTTTTAATT TAAAAAGATTGTTATT
 TTATATGTAAGTACACTGTAGCTGCTTCAGACACTCCAGAACAGGGCATCAGATCTCATTA
 CAGATGGTTGTGAGCTACC ATGTGGTCACTGGGATTGA ACTCAGGACCTTCAGAACAGCAG
 TCAGTGCTCTTA ACTGATAAGTTAATAAGTTA ACTGATAAGGTAAATAAGGTCCCCTAT
 GAAAAGGGTT CAGACCCAAAGAGTCAGAGATCCACAGGTTGAGAACCTCTGCCCTAAATCT
 TGTTGCTCTCCTATTCAAGACCACTCCTGTTGCA GTTGCTCTTAAGCATGAGTATGCTCC
 TTCTGAAAGTCTCCATAGCAGCCATCTCTCCAGCCCCAGAGTGAGGCTTTAAAGGAATCTT
 CATGATAAAATAGAATT TTTAAAAAGTA ACTGAAGTTACTTAAGGTGTTAAGGTACATT
 TTCCCTCAGTA ACTGGTTAATCTAGCAGTTGAGTCATACTCATTATCTTGACTTTGAA
 GAGTAAGATATTAAAACAATTGCTTGATCCTGAGTAAGTATTAAATAGACATTAAAT
 GCAGACTTTTTAGTTGACTGGTGGTGTGCACGGTCAATCCAAGTACTCATGGGAGGC
 AGAGGCAGGAGGATCTCTCTAGACCAGCCTGGTCTATAGAGCAAGTCCAGGACAGCCAG
 GGCTACACAGAAACCTTGTCAAACAAGACTTTATCCTCAGGCAGCTGAGCCAGAATA

20

CATACACT CCTAGGGAAGCTGGTCACAGAAGGACGAATCCCTGGCATACTACATCGAGAAT
 CAGTTCACGAGTTCAAGTTAGCAAAGTCTGGAGAGATGAGCACTACGTGAAGATCCAGGT
 GAAGAGCTCCGCTCAGAACTCCGTGATCATCGTGGATAAGAACGGCCGGCTGGTGTACCTGG
 TGGAGAACCCCTGGCGGATACGTGGCTTACTCTAAGGCCCTACCGTGACAGGCAAGCTGGT
 CACGCCAACCTCGGAACCAAGAAGGACTTTGAGGATCTGTACACACCAGTGAACGGCTCTAT
 CGTGATCGCGCGCTGGAAAGATCACCTCGCCGAGAACGGTGGCTAACGCCGAGAGCCTGA
 ACGCCATCGCGTGCTGATCTACATGGATCAGACAAAGTTCCATCGTGAACGCTGAGCTG
 TCTTCTTGGACACGCTCACCTGGGACCGGAGACCCATACACACCCGGATTCCCTAGCTT
 TAACCACACCCAGTTCCCCCTCCAGGTCTAGCGGACTGCCAACATCCCCGTGCAGACAA
 TCAGCAGAGCCGCTGCCGAGAACGCTGTTGGCAACATGGAGGGAGACTGCCCTCCGATTGG
 AAGACCGACTTACATGTAGGATGGTGACCTCGAGTAAAAAATGTCAAACACTCACC GTGTC
 CAATGTGCTGAAAGAACGACGCATCCTGAATATCTTGAGTTATTAAAGGTATGAGGAAC
 CAGGTAAAGACCTGTTGTACTTTCACTTTACTGTTTGCTACTGTAGATAGGTCTAG
 TGCAGGAAGGAGAACGGATGCTAGCTGGCATGAACTGCTATATCTTGTTGCTTAATGTGA
 ACTTTGTAATATATGTGTATATAACACATAATATGCCATGTAGTGTATGGAGAGGCCAGA
 GTTAAGTATTAAATATCTTCTGTAATCATTTAAATTTACATATGAAGGTCA GTGAACAG
 ATTGAAGGAGTTTGCCAGGTGGACTTGGATCTAAATT TACAATGCCTGGCAGCAAA
 CACCTTTTAATCAACTGAGCTGTCTCCCAAATAAGTGAATGTGATATCAGCTTGTTGGAT
 ATT TTTTTTGTTGTTGATAAGTGGTTTCTACAGGATCACATACCAAGTTCTGTCCAT
 AGCATTAAACAAACATAACTGTCTGCAGTAGATTAATGTGCAAGGGCACATCCAACAGTCAC
 ATT TATTAAATAGGACAAAAGTGGACCTTATATGTAGCACACCTATAATTCCAGTGTAGG
 AAGATCCGGTAGGGAGATCCTTAGTCGGTGTACTTAGTGAGGGTTGGTCAAAAACAA
 AAGCTATGATGGTGTGTTGCCTTTCTTTAGACCGTTATGTTGAGTAGGAGGCCAGAG
 AGACGCTTGGGTGCTGGTGTGCGGGCAAGTCCAGTGTGGAACAGGTCTGTGAAAC
 TTGCCCAAGTATTCTCAGATATGATTCAAAGGT

30

40

配列番号5：マウスTfRタンパク質配列（Uniprot Q62351）（斜体部分

50

は細胞質ドメインを表し、太字部分は膜貫通ドメインを表し、灰色の部分は細胞外ドメインを表し、ならびに太字及び下線が引かれた部分は頂端ドメインを表す）

MMDQARSAFSNLFGGEPLSYTRFLSLARQVDGDNSHVEMLAADDEENADNNMKASVRKPKRF
NGRLCFAAIALVIFFLIGFMMSGYLGYCKRVEQKEECVKLAETEETDKSETMETEDVPTSSRL
YWADLKTLLSEKLNSIEFADTIKQLSQNTYTPREAGSOKDESLAYYIENQFHEFKFSKVWRD
EHYVKIQVKSSIQCQMVTIVQSGNLDPVESPEGYAFSKPTEVSGKLVHANFGTKKDFEEL
SYVNGSLVIVRAGEITFAEKVANAQSFNAIGVLIYMDKNKFPVVEADLALFGHAHLGTGDP
YTPGFPSFNHTQFPPSQSSGLPNIPVQTISRAAAEKLFGKMEGSCPARWNIDSSCKLELSQN
QNVKLIVKNVLKERRILNIFGVIKGYEEPDRYVVGAQRDALGAGVAAKSSVGTGLLLKLAQ
VFSDMISKDGFRPSRSIIFASWTAGDFGAVGATEWLEGYLSSLHLKAFTYINLDKVVLGTSN
FKVSASPLLYTLMGKIMQDVKHPVGKSLYRDSNWISKVEKLSFDNAAYPFLAYSGIPAVSF
CFCEDADYPYLGTRLDTYEALTQKVQLNQMVRTAEVAGQLIKLTHDVELNLDYEMYNSK
LLSFMKDLNQFKTDIRDMLGLSIQLWLYSARGDYFRATSRTTDFHNAEKTNRFVMREINDRIM
KVEYHFLSPYVSPRESPFRHIFWGSGSHTLSPANENLKLRQKNITAFNETLFRNQLALATWT
IQGVANALSGDIWNIDNEE

10

配列番号 6 : ヒト T f R タンパク質配列 (U n i p r o t P 0 2 7 8 6) (斜体部分は細胞質ドメインを表し、太字部分は膜貫通ドメインを表し、灰色の部分は細胞外ドメインを表し、ならびに太字及び下線が引かれた部分は頂端ドメインを表す)

MMDQARSAFSNLFGGEPLSYTRFLSLARQVDGDNSHVEMLAADDEENADNNMKASVRKPKRC
SGSICYGTIAVIVFFLIGFMIGYLGYCKGVEPKTECERLAGTESPVREEPGEDFPAARRLYW
DDLKRKLSEKLDSTDFGTIKLLNENSYVPREAGSOKDENLALYVENQFREFKLSKVWRDQH
FVKIQVKDSAQNSVIIVDKNGGLVYLVENPGGYVAYSKAATVTGKLVHANFGTKKDFELYT
PVNGSIVIVRAGKITFAEKVANAESLNAIGVLIYMDQTKFPIVNAELSFEGHAHLGTGDPY
PGFPSFNHTQFPPSRSSGLPNIPVQTISRAAAEKLFGNMEGDCPSDWKTDSTCRMVTSESKN
VKLTVSNVLKEIKILNIFGVIKGFVEPDHYVVVGAQRDAWGPAAKGCVGTTALLLKLAQMFS
DMVLKDGFQPSRSIIFASWSAGDFGSVGATEWLEGYLSSLHLKAFTYINLDKAVLGTSNFKV
SASPLLYTIEKTMQNVKHPVTGQFLYQDSNWASKVEKLTLDDNAAFPFLAYSGIPAVSFFCFC
EEDTDDYPYLGTTMDTYKELIERIPELNKVARAAAEVAGQFVIKLTHDVELNLDYERYNSQLS
FVRDLNQYRADIKEMGLSLOWLWYSARGDFFRATSRTTDFGNAEKTDRFVMKKLNDRVMRVE
YHFLSPYVSPKESPFRHIFWGGSHTLPALLENKLRQNNGAFNETLFRNQLALATWTIQGAANALSGDVWDIDNEE

20

配列番号 7 : アカゲザル (m a c a c a m u l a t t a) (アカゲザル (r h e s u s m o n k e y)) T f R の頂端ドメイン (N C B I 参照配列 N P _ 0 0 1 2 4 4 2 3 2 . 1) であり、天然ヒト T f R の頂端ドメインとの 95 % の同一性を有する。

AQNSVIIVDKNGGLVYLVENPGGYVAYSKAATVTGKLVHANFGTKKDFELYTLDSPVNGSIVIVRAGKITFAEKVANAESLNAIGVLIYMDQTKFPIVKADLSFFGHAHLGTGDPYTPGFPSFNHT

30

配列番号 8 : チンパンジー T f R の頂端ドメイン (N C B I 参照配列 X P _ 0 0 3 3 1 0 2 3 8 . 1) であり、天然ヒト T f R の頂端ドメインと 98 % 同一である。

AQNSVIIVDKNGSLVYLVENPGGYVAYSKAATVTGKLVHANFGTKKDFELYTLDHTPVNGSIVIVRAGKITFAEKVANAESLNAIGVLIYMDQTKFPIVNAELSFFGHAHLGTGDPYTPGFPSFNHT

40

配列番号 9 : カニクイザル (m a c a c a f a s c i c u l a r i s) (カニクイザル (c y n o m o l g o u s m o n k e y)) T f R の頂端ドメイン (N C B I 参照配列 X P _ 0 0 5 5 4 5 3 1 5) であり、天然ヒト T f R の頂端ドメインと 96 % 同一である。

AQNSVIIVDKNGGLVYLVENPGGYVAYSKAATVTGKLVHANFGTKKDFELYTLDSPVNGSIVIVRAGKITFAEKVANAESLNAIGVLIYMDQTKFPIVKADLSFFGHAHLGTGDPYTPGFPSFNHT

配列番号 10 :

50

GAATACATACTCCTCGTGAGG

配列番号 1 1 :

AGAAGAATACTAACATCTTGG

10

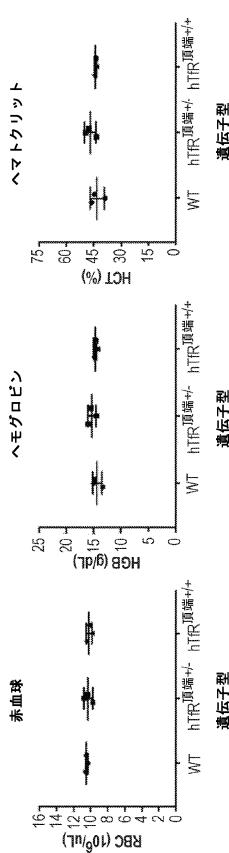
20

30

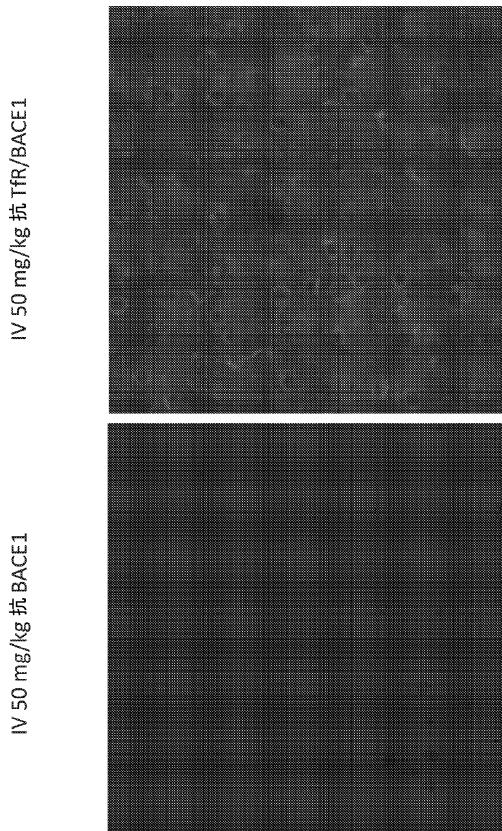
40

50

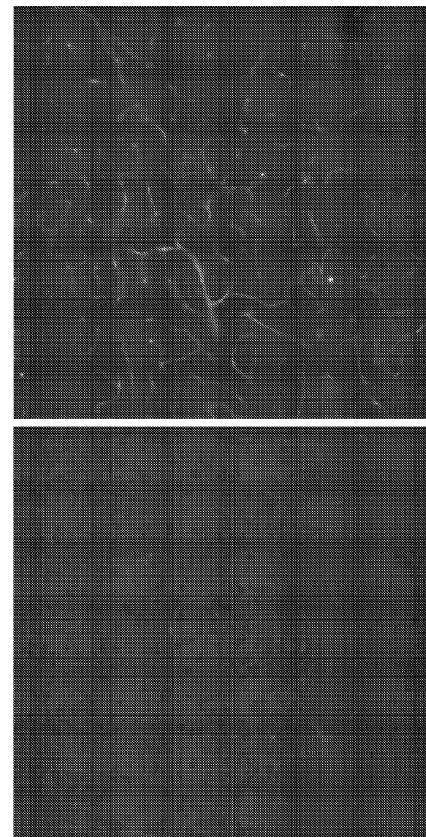
【図面】
【図 1】



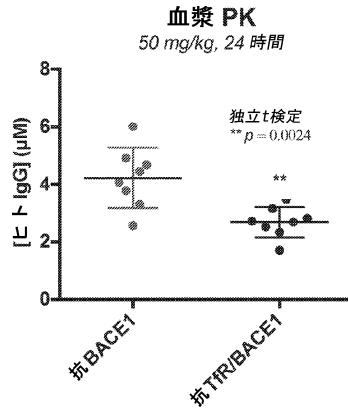
【 図 3 】



【図2】



【図4A】



10

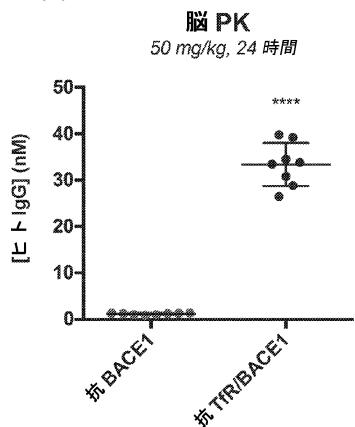
20

30

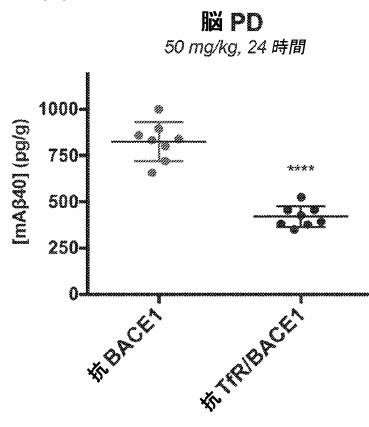
40

50

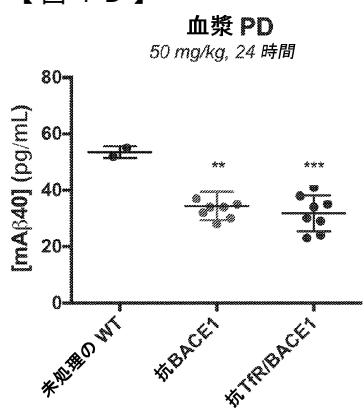
【図 4 B】



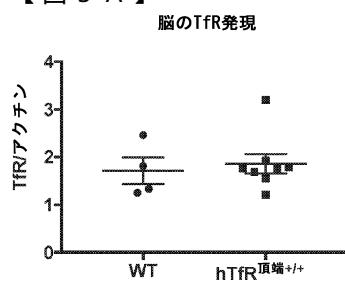
【図 4 C】



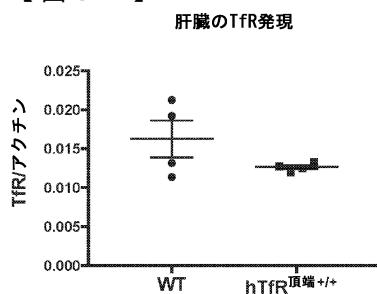
【図 4 D】



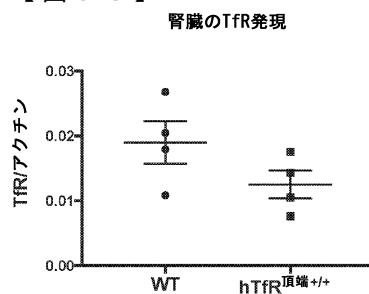
【図 5 A】



【図 5 B】



【図 5 C】



10

20

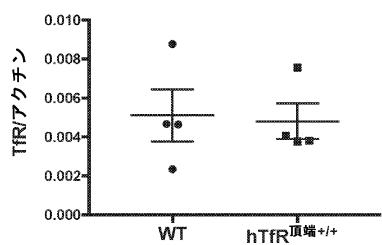
30

40

50

【図 5 D】

肺のTfR発現



【配列表】

00076691130000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

C 0 7 K	14/705 (2006.01)	F I	C 0 7 K	14/705
C 0 7 K	19/00 (2006.01)		C 0 7 K	19/00
C 1 2 N	15/62 (2006.01)		C 1 2 N	15/62

(31)優先権主張番号 62/543,658

(32)優先日 平成29年8月10日(2017.8.10)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/543,559

(32)優先日 平成29年8月10日(2017.8.10)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/583,314

(32)優先日 平成29年11月8日(2017.11.8)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

弁理士 刑部 俊

(74)代理人 100142929

弁理士 井上 隆一

(74)代理人 100148699

弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506

弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(72)発明者 デニス マーク エス .

アメリカ合衆国 9 4 0 8 0 カリフォルニア州 サウス サンフランシスコ オイスター ポイント
ブルバード 1 6 1 デナリ セラピューティクス インコーポレイテッド内

(72)発明者 シルバーマン アダム ピー .

アメリカ合衆国 9 4 0 8 0 カリフォルニア州 サウス サンフランシスコ オイスター ポイント
ブルバード 1 6 1 デナリ セラピューティクス インコーポレイテッド内

(72)発明者 ズチエロ ジョイ ユ

アメリカ合衆国 9 4 0 8 0 カリフォルニア州 サウス サンフランシスコ オイスター ポイント
ブルバード 1 6 1 デナリ セラピューティクス インコーポレイテッド内

合議体

審判長 中村 浩

審判官 柴原 直司

審判官 加々美 一恵

(56)参考文献 国際公開第2 0 1 6 / 0 8 1 6 4 3 (WO , A 1)

特表2 0 1 6 - 5 2 6 8 7 8 (J P , A)

J. Virol. , 2012 , vol. 86, no. 7 , pp.4024-4028

SCIENCE TRANSLATIONAL MEDICINE, (2014), VOL:6, PAGE(S):261RA154 (1-10)

(58)調査した分野 (Int.Cl. , D B名)

C12N15/00-15/90

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)