

【公報種別】特許法第 17 条の 2 の規定による補正の掲載

【部門区分】第 1 部門第 1 区分

【発行日】令和 3 年 3 月 11 日 (2021.3.11)

【公表番号】特表 2020-510418 (P2020-510418A)

【公表日】令和 2 年 4 月 9 日 (2020.4.9)

【年通号数】公開・登録公報 2020-014

【出願番号】特願 2019-545322 (P2019-545322)

【国際特許分類】

C 1 2 N 15/62 (2006.01)

A 0 1 K 67/027 (2006.01)

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

C 1 2 N 5/0735 (2010.01)

C 1 2 Q 1/02 (2006.01)

C 1 2 Q 1/68 (2018.01)

C 0 7 K 14/47 (2006.01)

【F I】

C 1 2 N 15/62 Z

A 0 1 K 67/027 Z N A

C 1 2 N 5/10

C 1 2 N 5/0735

C 1 2 Q 1/02

C 1 2 Q 1/68

C 0 7 K 14/47

【手続補正書】

【提出日】令和 3 年 1 月 29 日 (2021.1.29)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

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であって、前記キメラ T f R ポリペプチドが、前記動物の天然 T f R ポリペプチドのトランスフェリン結合部位と、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、前記非ヒトトランスジェニック動物。

【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 90 % 同一のアミノ酸配列を有する、

(b) 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、

(c) 配列番号 1 のアミノ酸配列を含む、または

(d) 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 に記載の非ヒトトランスジェニック動物。

【請求項 3】

前記キメラ T f R 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 に記載の非ヒトトランスジェニック動物。

## 【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 70 % 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 95 % 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 に記載の非ヒトトランスジェニック動物。

## 【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 項に記載の非ヒトトランスジェニック動物。

## 【請求項 6】

( a ) 前記動物がげっ歯類であり、任意で前記げっ歯類がマウスもしくはラットである

、

( b ) 前記動物のゲノムが、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、

( c ) 前記キメラ T f R ポリペプチドが、前記動物の脳で発現される、

( d ) 脳、肝臓、腎臓、もしくは肺組織において、前記動物が、対応する同種の野生型動物の同じ組織における T f R の発現レベルの 20 % 以内のキメラ T f R ポリペプチドのレベルを発現する、

( e ) 前記動物が、対応する同種の野生型動物における赤血球数、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 20 % 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

( f ) 前記動物が、( 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( i 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 項に記載の非ヒトトランスジェニック動物。

## 【請求項 7】

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、非ヒト動物由来の宿主細胞であって、前記キメラ T f R ポリペプチドが、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異種頂端ドメインと、前記動物の天然 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む、宿主細胞。

## 【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 90 % 同一のアミノ酸配列を有する、

( i i ) 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、

( i i i ) 配列番号 1 のアミノ酸配列を含む、もしくは

( i v ) 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

は

( 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 70 % のヌクレオチド配列同一性を有する、

( i i ) 配列番号 2 との少なくとも 95 % のヌクレオチド配列同一性を有する、もしくは

は

( i i i ) 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り、任意で前記宿主細胞内の前記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、

(b) 前記宿主細胞がエキスピボにあり、任意で前記宿主細胞が胚性幹細胞である、かつ/または

(c) 前記宿主細胞のゲノムが、前記動物の天然 T f R ポリペプチドの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】

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 項に記載の動物に投与するステップと、

(b) 前記動物の脳内の前記 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。

【請求項 11】

前記 A D B P が、エフェクター分子と結合しており、任意で前記エフェクター分子が、小分子、RNA、DNA、またはポリペプチドであり、任意で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 10 に記載の方法。

【請求項 12】

(a) 前記測定するステップが、

(i) 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 11 に記載の方法。

【請求項 13】

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非ヒト単一細胞胚を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 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み、任意で

(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 RNA 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 DNA 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、かつ/または

(d) 前記胚がマウス胚であり、任意で前記ドナー DNA 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、  
、前記方法。

【請求項 14】

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) 請求項 13 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、前記動物は、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 15】

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、非ヒト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、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TfR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。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0015

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0015】

[本発明1001]

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。

[本発明1002]

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。

[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。

[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 ( T f R ) ポリペプチド。

[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。

[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。

[本発明1019]

エクスピバにある、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。

[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。

[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]

前記キメラTfR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であって、

候補ADBPを、本発明1010のキメラTfRポリペプチドと接触させるステップと、  
前記キメラ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、方法。

[本発明1031]

前記候補ADBPを前記キメラTfRポリペプチドと接触させる前記ステップが、前記ADBPを、前記キメラ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、本発明1030の方法。

[本発明1032]

前記候補ADBPを前記キメラTfRポリペプチドと接触させる前記ステップが、前記ADBPを、前記キメラ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、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TfRポリペプチドに結合する前記候補ADBP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。

[本発明1035]

前記キメラTfRポリペプチドに結合する前記候補ADBP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、インビボで実施される、本発明1030～1034のいずれかの方法。

[本発明1037]

前記候補ADBP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。

[本発明1038]

前記エフェクター分子が、小分子、RNA、DNA、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TfRに結合するADBPの量を測定する方法であって、

ADBPを、本発明1010のキメラTfRポリペプチドと接触させるステップと、  
前記キメラ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、方法。

[本発明1042]

血液脳関門を通過するADBP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ADBP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、RNA、DNA、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(PD)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BACE1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Aβ40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、RNA、DNA、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。

[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PD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BACE1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Aβ<sub>40</sub>のレベルを測定することを含む、本発明1057の方法。

[本発明1060]

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TfR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、Cas9タンパク質と、少なくとも1つのsgRNA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DNA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、前記非ヒト単一細胞胚のゲノム内の前記内因性TfR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。

[本発明1065]

前記ドナーDNA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、方法。

[本発明1067]

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드가、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、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。