

【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 2 年 5 月 14 日 (2020.5.14)

【公表番号】特表 2019-511240 (P2019-511240A)

【公表日】平成 31 年 4 月 25 日 (2019.4.25)

【年通号数】公開・登録公報 2019-016

【出願番号】特願 2018-554450 (P2018-554450)

【国際特許分類】

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/12 (2006.01)

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

C 1 2 N 9/16 (2006.01)

A 6 1 K 35/30 (2015.01)

A 6 1 P 25/00 (2006.01)

A 6 1 P 25/16 (2006.01)

A 6 1 P 25/14 (2006.01)

A 6 1 P 25/28 (2006.01)

A 6 1 P 27/02 (2006.01)

A 6 1 P 9/10 (2006.01)

A 6 1 P 9/00 (2006.01)

A 6 1 P 29/00 (2006.01)

C 1 2 N 15/11 (2006.01)

C 0 7 K 14/47 (2006.01)

C 0 7 K 14/565 (2006.01)

C 0 7 K 14/485 (2006.01)

【F I】

C 1 2 N 15/09 1 0 0

C 1 2 N 15/12

C 1 2 N 5/10

C 1 2 N 15/09 1 1 0

C 1 2 N 9/16 Z

A 6 1 K 35/30

A 6 1 P 25/00

A 6 1 P 25/16

A 6 1 P 25/14

A 6 1 P 25/28

A 6 1 P 27/02

A 6 1 P 9/10

A 6 1 P 9/00

A 6 1 P 29/00

C 1 2 N 15/11 Z

C 0 7 K 14/47

C 0 7 K 14/565

C 0 7 K 14/485

【手続補正書】

【提出日】令和 2 年 4 月 2 日 (2020.4.2)

【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】

遺伝子改変されたヒト神経幹細胞を生成する方法であって、

(a) (i) 導入遺伝子を含む導入遺伝子カセット、および (ii) セーフハーバー遺伝子座の 2 つの非重複相同部分を含む 2 つのヌクレオチド配列であって、前記導入遺伝子カセットの 5' 末端および 3' 末端に位置するヌクレオチド配列を含むドナー鋳型と、

(b) 前記セーフハーバー遺伝子座に二本鎖切断を作製して前記セーフハーバー遺伝子座中への前記導入遺伝子の挿入を誘発することができる DNA ヌクレアーゼまたは前記 DNA ヌクレアーゼをコードするヌクレオチド配列と

を単離されたヒト神経幹細胞中に導入することであって、それによって遺伝子改変されたヒト神経幹細胞を生成すること

を含む方法。

【請求項 2】

前記 DNA ヌクレアーゼが、CRISPR 関連タンパク質 (Cas) ポリペプチド、ジンクフィンガーヌクレアーゼ (ZFN)、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ (TALEN)、メガヌクレアーゼ、これらのバリエーション、これらの断片、およびこれらの組合せからなる群から選択される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記単離されたヒト神経幹細胞が初代神経幹細胞を含む、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記単離されたヒト神経幹細胞が、体性幹細胞もしくは多能性幹細胞に由来するか、または体細胞集団からのダイレクトリプログラミングによって誘導される、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 5】

前記導入遺伝子が、中枢神経系の遺伝的障害に関連するタンパク質をコードする、請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

前記タンパク質が、GALC (クラッペ病)、ABCD1 (副腎白質ジストロフィー)、GFAP (アレキサンダー病)、CYP27A1 (脳腱黄色腫症)、ARSA (異染性白質ジストロフィー)、PLP1 (ペリツェウス・メルツバッハー病)、ASPA (カナパン病)、EIF-2B (白質の消失を伴う白質脳症)、PHYH (レフサム病 1 型)、PEX7 (レフサム病 2 型)、PPT1 (乳児性神経セロイドリポフスチン症 (NCL))、TPP1 (遅発型小児性 NCL)、CLN3 (若年性 NCL)、CLN6 (成人 NCL)、CLN5 (フィンランド遅発型小児性バリエーション NCL)、CLN6 (遅発型小児性バリエーション NCL)、MSFD8 (セロイドリポフスチン症、神経性、7)、CLN8 (セロイドリポフスチン症、神経性、8)、CTSD (セロイドリポフスチン症、神経性、10)、UBE3A (アンジェルマン症候群)、POLG (アルパース病)、TAZ (パース症候群)、GLA (ファブリー病)、SLC20A2 (ファール症候群)、PDE (網膜色素変性症)、SMN1 (脊髄性筋萎縮症)、IKBKAP (家族性自律神経失調症)、MECP2 (レット症候群)、CACNA1C (チモシー症候群)、ATXN3 (マチャド・ジョセフ病)、および RPE65 (レーバー先天性黒内障) からなる群から選択される遺伝子によってコードされる、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

前記タンパク質が、前記遺伝子改変されたヒト神経幹細胞によって分泌される、請求項 5 または 6 に記載の方法。

【請求項 8】

前記導入遺伝子が、神経保護または神経再生タンパク質、そのバリエーション、その断片、またはそのペプチド模倣体をコードする、請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

前記神経保護または神経再生タンパク質が、脳由来神経栄養因子 (BDNF)、インスリン様成長因子 1 (IGF-1)、インスリン様成長因子 2 (IGF-2)、グリア由来神経栄養因子 (GDNF)、神経成長因子 (NGF)、ニューロトロフィン-2 (NT-2)、ニューロトロフィン-3 (NT-3)、ニューロトロフィン-4/5 (NT-4/5)、ニューロトロフィン-6、保存ドーパミン神経栄養因子 (CDNF)、毛様体神経栄養因子 (CNTF)、上皮成長因子 (EGF)、線維芽細胞成長因子 (FGF)、骨形成タンパク質 (BMP)、血管内皮成長因子 (VEGF)、顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF)、コロニー刺激因子 (CSF)、インターフェロン- (IFN-)、腫瘍壊死因子- (TNF)、組織プラスミノゲン活性化因子 (tPA)、ニューロツリン、パーセフィン、アルテミン、ニューロペプチド Y (NPY)、エフリン、セマフォリン、その他の神経新生因子、その他の神経栄養因子、およびこれらの組合せからなる群から選択される、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

前記神経保護または神経再生タンパク質が分泌タンパク質である、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 11】

前記ドナー鑄型が異種プロモーターを含む、請求項 1 から 10 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 12】

前記ドナー鑄型の前記異種プロモーターが、誘導性プロモーターまたは細胞特異的プロモーターを含む、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

前記 DNA ヌクレアーゼをコードする前記ヌクレオチド配列が RNA を含む、請求項 1 から 12 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 14】

DNA ターゲティング RNA、トランケート型 DNA ターゲティング RNA、または前記 DNA ターゲティング RNA もしくは前記トランケート型 DNA ターゲティング RNA をコードするヌクレオチド配列を前記ヒト神経幹細胞中に導入することをさらに含む、請求項 1 から 13 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 15】

前記 DNA ヌクレアーゼが、Cas ポリペプチドまたは前記 Cas ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含み、前記 DNA ターゲティング RNA が、前記セーフハーバー遺伝子座の一部分に相補的な第 1 のヌクレオチド配列および前記 Cas ポリペプチドと相互作用する第 2 のヌクレオチド配列を含む、単一ガイド RNA (sgRNA) またはトランケート型 sgRNA を含む、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】

前記 Cas ポリペプチドが、Cas9 ポリペプチド、そのバリエーション、またはその断片を含む、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

前記 Cas ポリペプチドのバリエーションが、高忠実度のまたは特異性が増進した Cas9 ポリペプチドのバリエーションを含む、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

前記 sgRNA またはトランケート型 sgRNA が 1 つまたは複数の修飾ヌクレオチドを含む、請求項 15 から 17 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 19】

前記 1 つまたは複数の修飾ヌクレオチドが、リボース基、リン酸基、核酸塩基、またはこれらの組合せにおける修飾を含む、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

前記リボース基における前記修飾が、前記リボース基の 2' 位における修飾を含む、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

前記リボース基の 2' 位における前記修飾が、2'-O-メチル、2'-フルオロ、2'-デオキシ、2'-O-(2-メトキシエチル)、およびこれらの組合せからなる群から選択される、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 22】

前記リン酸基における前記修飾がホスホロチオエート修飾を含む、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 23】

前記 1 つまたは複数の修飾ヌクレオチドが、2'-O-メチルヌクレオチド(M)、2'-O-メチル、3'-ホスホロチオエートヌクレオチド(MS)、2'-O-メチル、3'-チオPACENヌクレオチド(MSP)、およびこれらの組合せからなる群から選択される、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 24】

前記第 1 のヌクレオチド配列中のヌクレオチドの少なくとも 2 個、3 個、4 個、5 個、6 個、7 個、8 個、9 個、10 個、またはそれより多くが修飾ヌクレオチドであり、かつ/または前記第 2 のヌクレオチド配列中のヌクレオチドの少なくとも 2 個、3 個、4 個、5 個、6 個、7 個、8 個、9 個、10 個、またはそれより多くが修飾ヌクレオチドである、請求項 18 から 23 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 25】

前記第 1 のヌクレオチド配列中のヌクレオチドの約 10% から約 30% が修飾ヌクレオチドであり、かつ/または前記第 2 のヌクレオチド配列中のヌクレオチドの約 1% から約 10% が修飾ヌクレオチドである、請求項 18 から 24 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 26】

前記セーフハーバー遺伝子座が、IL2R、CCR5、またはHBB遺伝子を含む、請求項 1 から 25 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 27】

導入することがエレクトロポレーションを含む、請求項 1 から 26 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 28】

前記ドナー鑄型が選択マーカーをさらに含む、請求項 1 から 27 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 29】

前記選択マーカーが、中枢神経系の細胞では発現されないマーカーを含む、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 30】

前記選択マーカーが細胞表面タンパク質である、請求項 28 または 29 に記載の方法。

【請求項 31】

前記細胞表面タンパク質が、CD1、CD2、CD4、CD8、CD10、CD19、CD20、これらのパリアント、これらの断片、これらの誘導体、およびこれらの組合せからなる群から選択される、請求項 30 に記載の方法。

【請求項 32】

前記遺伝子改変されたヒト神経幹細胞による前記選択マーカーの発現に基づいて前記遺伝子改変されたヒト神経幹細胞を精製することをさらに含む、請求項 28 から 31 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 33】

前記精製された遺伝子改変されたヒト神経幹細胞を増殖させることをさらに含む、請求項 32 に記載の方法。

【請求項 3 4】

請求項 1 から 3 3 のいずれか一項に記載の方法によって製造された、遺伝子改変されたヒト神経幹細胞。

【請求項 3 5】

請求項 3 4 に記載の遺伝子改変されたヒト神経幹細胞および薬学的に許容される担体を含む医薬組成物。

【請求項 3 6】

それを必要とするヒト対象における神経変性疾患または神経学的損傷を予防または治療するための、請求項 3 5 に記載の医薬組成物。

【請求項 3 7】

前記医薬組成物が、白質ジストロフィー、神経セロイドリポフスチン症、加齢黄斑変性、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、筋萎縮性側索硬化症、および網膜変性疾患からなる群から選択される神経変性疾患の治療用である、請求項 3 6 に記載の医薬組成物。

【請求項 3 8】

前記医薬組成物が、クラッペ病、ペリツェウス・メルツバッハー病、副腎脊髄ニューロパチー、アレキサンダー病、脳腱黄色腫症、異染性白質ジストロフィー、カナバン病、白質の消失を伴う白質脳症、副腎白質ジストロフィー、レフサム病、およびゼノペファントーシスからなる群から選択される白質ジストロフィーの治療用である、請求項 3 7 に記載の医薬組成物。

【請求項 3 9】

前記医薬組成物が、脊髄損傷、外傷性脳損傷、中枢神経系（CNS）の急性炎症、CNS の慢性炎症、虚血、および卒中からなる群から選択される神経学的損傷の治療用である、請求項 3 6 に記載の医薬組成物。

【請求項 4 0】

前記遺伝子改変されたヒト神経幹細胞が前記対象に対して自己である、請求項 3 6 から 3 9 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 4 1】

前記遺伝子改変されたヒト神経幹細胞が前記対象に対して同種である、請求項 3 6 から 3 9 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 4 2】

前記医薬組成物が、注射または外科的移植によって投与されることを特徴とする、請求項 3 6 から 4 1 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 4 3】

(a) (i) 導入遺伝子を含む導入遺伝子カセット、および (ii) セーフハーバー遺伝子座の 2 つの非重複相同部分を含む 2 つのヌクレオチド配列であって、前記導入遺伝子カセットの 5' 末端および 3' 末端に位置するヌクレオチド配列を含むドナー鋳型と、

(b) DNAヌクレアーゼまたは前記DNAヌクレアーゼをコードするヌクレオチド配列と、

(c) 単離されたヒト神経幹細胞とを含むキット。

【請求項 4 4】

前記DNAヌクレアーゼが、CRISPR関連タンパク質（Cas）ポリペプチド、ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ZFN）、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ（TALEN）、メガヌクレアーゼ、これらのバリエーション、これらの断片、およびこれらの組合せからなる群から選択される、請求項 4 3 に記載のキット。

【請求項 4 5】

前記単離されたヒト神経幹細胞が初代神経幹細胞を含む、請求項 4 3 または 4 4 に記載のキット。

【請求項 4 6】

前記単離されたヒト神経幹細胞が、体性幹細胞もしくは多能性幹細胞に由来するか、または体細胞集団からのダイレクトリプログラミングによって誘導される、請求項 4 3 または 4 4 に記載のキット。

【請求項 4 7】

前記導入遺伝子が、中枢神経系の遺伝的障害に関連するタンパク質をコードする、請求項 4 3 から 4 6 のいずれか一項に記載のキット。

【請求項 4 8】

前記導入遺伝子が、神経保護または神経再生タンパク質、そのバリエーション、その断片、またはそのペプチド模倣体をコードする遺伝子を含む、請求項 4 3 から 4 6 のいずれか一項に記載のキット。

【請求項 4 9】

前記 DNA ヌクレアーゼをコードする前記ヌクレオチド配列が RNA を含む、請求項 4 3 から 4 8 のいずれか一項に記載のキット。

【請求項 5 0】

DNA ターゲティング RNA、トランケート型 DNA ターゲティング RNA、または前記 DNA ターゲティング RNA もしくは前記トランケート型 DNA ターゲティング RNA をコードするヌクレオチド配列をさらに含む、請求項 4 3 から 4 9 のいずれか一項に記載のキット。

【請求項 5 1】

前記 DNA ヌクレアーゼが、Cas ポリペプチドまたは前記 Cas ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含み、前記 DNA ターゲティング RNA が、前記セーフハーバー遺伝子座の一部分に相補的な第 1 のヌクレオチド配列および前記 Cas ポリペプチドと相互作用する第 2 のヌクレオチド配列を含む、一本鎖ガイド RNA (sgRNA) またはトランケート型 sgRNA を含む、請求項 5 0 に記載のキット。

【請求項 5 2】

前記 Cas ポリペプチドが、Cas9 ポリペプチド、そのバリエーション、またはその断片を含む、請求項 5 1 に記載のキット。

【請求項 5 3】

前記 Cas ポリペプチドのバリエーションが、高忠実度のまたは特異性が増進した Cas9 ポリペプチドのバリエーションを含む、請求項 5 2 に記載のキット。

【請求項 5 4】

前記 sgRNA またはトランケート型 sgRNA が 1 つまたは複数の修飾ヌクレオチドを含む、請求項 5 1 から 5 3 のいずれか一項に記載のキット。

【請求項 5 5】

前記 1 つまたは複数の修飾ヌクレオチドが、2' - O - メチルヌクレオチド (M)、2' - O - メチル、3' - ホスホロチオエートヌクレオチド (MS)、2' - O - メチル、3' - チオ PACE ヌクレオチド (MSP)、およびこれらの組合せからなる群から選択される、請求項 5 4 に記載のキット。

【請求項 5 6】

前記セーフハーバー遺伝子座が、IL2R、CCR5、または HBB 遺伝子を含む、請求項 4 3 から 5 5 のいずれか一項に記載のキット。

【請求項 5 7】

前記ドナー鋳型が選択マーカーをさらに含む、請求項 4 3 から 5 6 のいずれか一項に記載のキット。

【請求項 5 8】

遺伝子改変されたヒト神経幹細胞を生成するための説明書をさらに含む、請求項 4 3 から 5 7 のいずれか一項に記載のキット。

【請求項 5 9】

導入遺伝子を含む導入遺伝子カセットを含む遺伝子改変されたヒト神経幹細胞であって、前記導入遺伝子カセットがセーフハーバー遺伝子座内に位置する、遺伝子改変されたヒ

ト神経幹細胞。

【請求項 60】

潜在的な治療用分子を同定または開発する方法における、請求項 34 もしくは 59 に記載の遺伝子改変されたヒト神経幹細胞、または請求項 1 から 33 のいずれか一項に記載の方法によって製造された、遺伝子改変されたヒト神経幹細胞の使用。

【請求項 61】

前記潜在的な治療用分子が、ヒト神経幹細胞および / またはヒト神経幹細胞の分化した子孫の増殖および / または生存能力を促進する分子である、請求項 60 に記載の使用。

【請求項 62】

研究における、請求項 34 もしくは 59 に記載の遺伝子改変されたヒト神経幹細胞、または請求項 1 から 33 のいずれか一項に記載の方法によって製造された、遺伝子改変されたヒト神経幹細胞の使用。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0016

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0016】

本発明のその他の目的、特徴、および利点は、以下の詳細な説明および図面から当業者に明らかとなる。

特定の実施形態では、例えば、以下が提供される：

(項目 1)

遺伝子改変されたヒト神経幹細胞を生成する方法であって、

(a) (i) 導入遺伝子を含む導入遺伝子カセット、および (ii) セーフハーバー遺伝子座の 2 つの非重複相同部分を含む 2 つのヌクレオチド配列であって、前記導入遺伝子カセットの 5' 末端および 3' 末端に位置するヌクレオチド配列を含むドナー鋳型と、

(b) 前記セーフハーバー遺伝子座に二本鎖切断を作製して前記セーフハーバー遺伝子座中への前記導入遺伝子の挿入を誘発することができる DNA ヌクレアーゼまたは前記 DNA ヌクレアーゼをコードするヌクレオチド配列と

を単離されたヒト神経幹細胞中に導入することであって、それによって遺伝子改変されたヒト神経幹細胞を生成すること

を含む方法。

(項目 2)

前記 DNA ヌクレアーゼが、CRISPR 関連タンパク質 (Cas) ポリペプチド、ジンクフィンガーヌクレアーゼ (ZFN)、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ (TALEN)、メガヌクレアーゼ、これらのバリエーション、これらの断片、およびこれらの組合せからなる群から選択される、項目 1 に記載の方法。

(項目 3)

前記単離されたヒト神経幹細胞が初代神経幹細胞を含む、項目 1 または 2 に記載の方法。

(項目 4)

前記単離されたヒト神経幹細胞が、体性幹細胞もしくは多能性幹細胞に由来するか、または体細胞集団からのダイレクトリプログラミングによって誘導される、項目 1 または 2 に記載の方法。

(項目 5)

前記導入遺伝子が、中枢神経系の遺伝的障害に関連するタンパク質をコードする、項目 1 から 4 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 6)

前記タンパク質が、GALC (クラッペ病)、ABCD1 (副腎白質ジストロフィー)、GFAP (アレキサンダー病)、CYP27A1 (脳腱黄色腫症)、ARSA (異染色性

白質ジストロフィー)、PLP1(ペリツェウス・メルツバッハー病)、ASPA(カナパン病)、EIF-2B(白質の消失を伴う白質脳症)、PHYH(レフサム病1型)、PEX7(レフサム病2型)、PPT1(乳児性神経セロイドリポフスチン症(NCL))、TPP1(遅発型小児性NCL)、CLN3(若年性NCL)、CLN6(成人NCL)、CLN5(フィンランド遅発型小児性バリエーションNCL)、CLN6(遅発型小児性バリエーションNCL)、MSFD8(セロイドリポフスチン症、神経性、7)、CLN8(セロイドリポフスチン症、神経性、8)、CTSD(セロイドリポフスチン症、神経性、10)、UBE3A(アンジェルマン症候群)、POLG(アルパース病)、TAZ(パース症候群)、GLA(ファブリー病)、SLC20A2(ファール症候群)、PDE(網膜色素変性症)、SMN1(脊髄性筋萎縮症)、IKBKAP(家族性自律神経失調症)、MeCP2(レット症候群)、CACNA1C(チモシー症候群)、ATXN3(マチャド・ジョセフ病)、およびRPE65(レーバー先天性黒内障)からなる群から選択される遺伝子によってコードされる、項目5に記載の方法。

(項目7)

前記タンパク質が、前記遺伝子改変されたヒト神経幹細胞によって分泌される、項目5または6に記載の方法。

(項目8)

前記導入遺伝子が、神経保護または神経再生タンパク質、そのバリエーション、その断片、またはそのペプチド模倣体をコードする、項目1から4のいずれか一項に記載の方法。

(項目9)

前記神経保護または神経再生タンパク質が、脳由来神経栄養因子(BDNF)、インスリン様成長因子1(IGF-1)、インスリン様成長因子2(IGF-2)、グリア由来神経栄養因子(GDNF)、神経成長因子(NGF)、ニューロトロフィン-2(NT-2)、ニューロトロフィン-3(NT-3)、ニューロトロフィン-4/5(NT-4/5)、ニューロトロフィン-6、保存ドーパミン神経栄養因子(CDNF)、毛様体神経栄養因子(CNTF)、上皮成長因子(EGF)、線維芽細胞成長因子(FGF)、骨形成タンパク質(BMP)、血管内皮成長因子(VEGF)、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)、コロニー刺激因子(CSF)、インターフェロン-(IFN-)、腫瘍壊死因子-(TNF-)、組織プラスミノゲン活性化因子(tPA)、ニューロツリン、パーセフィン、アルテミン、ニューロペプチドY(NPY)、エフリン、セマフォリン、その他の神経新生因子、その他の神経栄養因子、およびこれらの組合せからなる群から選択される、項目8に記載の方法。

(項目10)

前記神経保護または神経再生タンパク質が分泌タンパク質である、項目8に記載の方法。

(項目11)

前記ドナー鋳型が異種プロモーターを含む、項目1から10のいずれか一項に記載の方法。

(項目12)

前記ドナー鋳型の前記異種プロモーターが、誘導性プロモーターまたは細胞特異的プロモーターを含む、項目11に記載の方法。

(項目13)

前記DNAヌクレアーゼをコードする前記ヌクレオチド配列がRNAを含む、項目1から12のいずれか一項に記載の方法。

(項目14)

DNAターゲティングRNA、トランケート型DNAターゲティングRNA、または前記DNAターゲティングRNAもしくは前記トランケート型DNAターゲティングRNAをコードするヌクレオチド配列を前記ヒト神経幹細胞中に導入することをさらに含む、項目1から13のいずれか一項に記載の方法。

(項目15)

前記DNAヌクレアーゼが、Casポリペプチドまたは前記Casポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含み、前記DNAターゲティングRNAが、前記セーフハーバー遺伝子座の一部分に相補的な第1のヌクレオチド配列および前記Casポリペプチドと相互作用する第2のヌクレオチド配列を含む、単一ガイドRNA (sgRNA) またはトランケート型sgRNAを含む、項目14に記載の方法。

(項目16)

前記Casポリペプチドが、Cas9ポリペプチド、そのバリエーション、またはその断片を含む、項目15に記載の方法。

(項目17)

前記Casポリペプチドのバリエーションが、高忠実度のまたは特異性が増進したCas9ポリペプチドのバリエーションを含む、項目16に記載の方法。

(項目18)

前記sgRNAまたはトランケート型sgRNAが1つまたは複数の修飾ヌクレオチドを含む、項目15から17のいずれか一項に記載の方法。

(項目19)

前記1つまたは複数の修飾ヌクレオチドが、リボース基、リン酸基、核酸塩基、またはこれらの組合せにおける修飾を含む、項目18に記載の方法。

(項目20)

前記リボース基における前記修飾が、前記リボース基の2'位における修飾を含む、項目19に記載の方法。

(項目21)

前記リボース基の2'位における前記修飾が、2'-O-メチル、2'-フルオロ、2'-デオキシ、2'-O-(2-メトキシエチル)、およびこれらの組合せからなる群から選択される、項目20に記載の方法。

(項目22)

前記リン酸基における前記修飾がホスホロチオエート修飾を含む、項目19に記載の方法。

(項目23)

前記1つまたは複数の修飾ヌクレオチドが、2'-O-メチルヌクレオチド(M)、2'-O-メチル、3'-ホスホロチオエートヌクレオチド(MS)、2'-O-メチル、3'-チオPACEヌクレオチド(MSP)、およびこれらの組合せからなる群から選択される、項目18に記載の方法。

(項目24)

前記第1のヌクレオチド配列中のヌクレオチドの少なくとも2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、またはそれより多くが修飾ヌクレオチドであり、かつ/または前記第2のヌクレオチド配列中のヌクレオチドの少なくとも2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、またはそれより多くが修飾ヌクレオチドである、項目18から23のいずれか一項に記載の方法。

(項目25)

前記第1のヌクレオチド配列中のヌクレオチドの約10%から約30%が修飾ヌクレオチドであり、かつ/または前記第2のヌクレオチド配列中のヌクレオチドの約1%から約10%が修飾ヌクレオチドである、項目18から24のいずれか一項に記載の方法。

(項目26)

前記セーフハーバー遺伝子座が、IL2R、CCR5、またはHBB遺伝子を含む、項目1から25のいずれか一項に記載の方法。

(項目27)

導入することがエレクトロポレーションを含む、項目1から26のいずれか一項に記載の方法。

(項目28)

前記ドナー鋳型が選択マーカーをさらに含む、項目1から27のいずれか一項に記載の

方法。

(項目 2 9)

前記選択マーカーが、中枢神経系の細胞では発現されないマーカーを含む、項目 2 8 に記載の方法。

(項目 3 0)

前記選択マーカーが細胞表面タンパク質である、項目 2 8 または 2 9 に記載の方法。

(項目 3 1)

前記細胞表面タンパク質が、C D 1、C D 2、C D 4、C D 8、C D 1 0、C D 1 9、C D 2 0、これらのパリアント、これらの断片、これらの誘導体、およびこれらの組合せからなる群から選択される、項目 3 0 に記載の方法。

(項目 3 2)

前記遺伝子改変されたヒト神経幹細胞による前記選択マーカーの発現に基づいて前記遺伝子改変されたヒト神経幹細胞を精製することをさらに含む、項目 2 8 から 3 1 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 3 3)

前記精製された遺伝子改変されたヒト神経幹細胞を増殖させることをさらに含む、項目 3 2 に記載の方法。

(項目 3 4)

項目 1 から 3 3 のいずれか一項に記載の方法によって製造された、遺伝子改変されたヒト神経幹細胞。

(項目 3 5)

項目 3 4 に記載の遺伝子改変されたヒト神経幹細胞および薬学的に許容される担体を含む医薬組成物。

(項目 3 6)

それを必要とするヒト対象における神経変性疾患または神経学的損傷を予防または治療する方法であって、

前記ヒト対象に有効量の項目 3 5 に記載の医薬組成物を投与することを含む方法。

(項目 3 7)

白質ジストロフィー、神経セロイドリポフスチン症、加齢黄斑変性、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、筋萎縮性側索硬化症、および網膜変性疾患からなる群から選択される神経変性疾患の治療用である、項目 3 6 に記載の方法。

(項目 3 8)

クラッペ病、ペリツェウス・メルツバッハー病、副腎脊髄ニューロパチー、アレキサンダー病、脳腱黄色腫症、異染性白質ジストロフィー、カナバン病、白質の消失を伴う白質脳症、副腎白質ジストロフィー、レフサム病、およびゼノベファントーシスからなる群から選択される白質ジストロフィーの治療用である、項目 3 7 に記載の方法。

(項目 3 9)

脊髄損傷、外傷性脳損傷、中枢神経系 (C N S) の急性炎症、C N S の慢性炎症、虚血、および卒中からなる群から選択される神経学的損傷の治療用である、項目 3 6 に記載の方法。

(項目 4 0)

前記遺伝子改変されたヒト神経幹細胞が前記対象に対して自己である、項目 3 6 から 3 9 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 4 1)

前記遺伝子改変されたヒト神経幹細胞が前記対象に対して同種である、項目 3 6 から 3 9 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 4 2)

投与することが、注射または外科的移植によって投与することを含む、項目 3 6 から 4 1 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 4 3)

(a) (i) 導入遺伝子を含む導入遺伝子カセット、および (i i) セーフハーバー遺伝子座の 2 つの非重複相同部分を含む 2 つのヌクレオチド配列であって、前記導入遺伝子カセットの 5 ' 末端および 3 ' 末端に位置するヌクレオチド配列を含むドナー鋳型と、

(b) D N Aヌクレアーゼまたは前記 D N Aヌクレアーゼをコードするヌクレオチド配列と、

(c) 単離されたヒト神経幹細胞とを含むキット。

(項目 4 4)

前記 D N Aヌクレアーゼが、C R I S P R関連タンパク質 (C a s) ポリペプチド、ジソクフィンガーヌクレアーゼ (Z F N)、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ (T A L E N)、メガヌクレアーゼ、これらのバリエーション、これらの断片、およびこれらの組合せからなる群から選択される、項目 4 3 に記載のキット。

(項目 4 5)

前記単離されたヒト神経幹細胞が初代神経幹細胞を含む、項目 4 3 または 4 4 に記載のキット。

(項目 4 6)

前記単離されたヒト神経幹細胞が、体性幹細胞もしくは多能性幹細胞に由来するか、または体細胞集団からのダイレクトリプログラミングによって誘導される、項目 4 3 または 4 4 に記載のキット。

(項目 4 7)

前記導入遺伝子が、中枢神経系の遺伝的障害に関連するタンパク質をコードする、項目 4 3 から 4 6 のいずれか一項に記載のキット。

(項目 4 8)

前記導入遺伝子が、神経保護または神経再生タンパク質、そのバリエーション、その断片、またはそのペプチド模倣体をコードする遺伝子を含む、項目 4 3 から 4 6 のいずれか一項に記載のキット。

(項目 4 9)

前記 D N Aヌクレアーゼをコードする前記ヌクレオチド配列が R N Aを含む、項目 4 3 から 4 8 のいずれか一項に記載のキット。

(項目 5 0)

D N Aターゲティング R N A、トランケート型 D N Aターゲティング R N A、または前記 D N Aターゲティング R N Aもしくは前記トランケート型 D N Aターゲティング R N Aをコードするヌクレオチド配列をさらに含む、項目 4 3 から 4 9 のいずれか一項に記載のキット。

(項目 5 1)

前記 D N Aヌクレアーゼが、C a s ポリペプチドまたは前記 C a s ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含み、前記 D N Aターゲティング R N Aが、前記セーフハーバー遺伝子座の一部に相補的な第 1 のヌクレオチド配列および前記 C a s ポリペプチドと相互作用する第 2 のヌクレオチド配列を含む、一本鎖ガイド R N A (s g R N A) またはトランケート型 s g R N Aを含む、項目 5 0 に記載のキット。

(項目 5 2)

前記 C a s ポリペプチドが、C a s 9 ポリペプチド、そのバリエーション、またはその断片を含む、項目 5 1 に記載のキット。

(項目 5 3)

前記 C a s ポリペプチドのバリエーションが、高忠実度のまたは特異性が増進した C a s 9 ポリペプチドのバリエーションを含む、項目 5 2 に記載のキット。

(項目 5 4)

前記 s g R N Aまたはトランケート型 s g R N Aが 1 つまたは複数の修飾ヌクレオチドを含む、項目 5 1 から 5 3 のいずれか一項に記載のキット。

(項目 5 5)

前記 1 つまたは複数の修飾ヌクレオチドが、2' - O - メチルヌクレオチド (M)、2' - O - メチル、3' - ホスホロチオエートヌクレオチド (M S)、2' - O - メチル、3' - チオ P A C E ヌクレオチド (M S P)、およびこれらの組合せからなる群から選択される、項目 5 4 に記載のキット。

(項目 5 6)

前記セーフハーバー遺伝子座が、I L 2 R 、C C R 5、またはH B B 遺伝子を含む、項目 4 3 から 5 5 のいずれか一項に記載のキット。

(項目 5 7)

前記ドナー鑄型が選択マーカーをさらに含む、項目 4 3 から 5 6 のいずれか一項に記載のキット。

(項目 5 8)

遺伝子改変されたヒト神経幹細胞を生成するための説明書をさらに含む、項目 4 3 から 5 7 のいずれか一項に記載のキット。

(項目 5 9)

導入遺伝子を含む導入遺伝子カセットを含む遺伝子改変されたヒト神経幹細胞であって、前記導入遺伝子カセットがセーフハーバー遺伝子座内に位置する、遺伝子改変されたヒト神経幹細胞。

(項目 6 0)

潜在的な治療用分子を同定または開発する方法における、項目 3 4 もしくは 5 9 に記載の遺伝子改変されたヒト神経幹細胞、または項目 1 から 3 3 のいずれか一項に記載の方法によって製造された、遺伝子改変されたヒト神経幹細胞の使用。

(項目 6 1)

前記潜在的な治療用分子が、ヒト神経幹細胞および / またはヒト神経幹細胞の分化した子孫の増殖および / または生存能力を促進する分子である、項目 6 0 に記載の使用。

(項目 6 2)

研究における、項目 3 4 もしくは 5 9 に記載の遺伝子改変されたヒト神経幹細胞、または項目 1 から 3 3 のいずれか一項に記載の方法によって製造された、遺伝子改変されたヒト神経幹細胞の使用。