【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11月4日(2021.11.4)

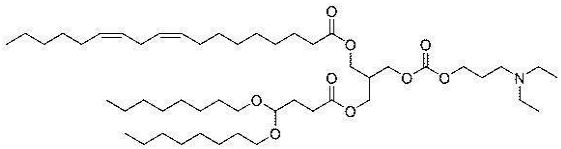
【公表番号】特表2020-537541(P2020-537541A)
【公表日】令和2年12月24日(2020.12.24)
【年通号数】公開・登録公報2020-052
【出願番号】特願2020-540245(P2020-540245)
【国際特許分類】
Ｃ１２Ｎ　15/88　(2006.01)
Ｃ１２Ｎ　15/87　(2006.01)
Ｃ１２Ｎ　15/55　(2006.01)
Ｃ１２Ｎ　 5/10　(2006.01)
Ｃ１２Ｎ　15/09　(2006.01)
Ｃ１２Ｎ　15/31　(2006.01)
【ＦＩ】
Ｃ１２Ｎ　15/88　Ｚ
Ｃ１２Ｎ　15/87　ＺＮＡＺ
Ｃ１２Ｎ　15/55
Ｃ１２Ｎ　 5/10
Ｃ１２Ｎ　15/09　１１０
Ｃ１２Ｎ　15/31

【手続補正書】
【提出日】令和3年9月27日(2021.9.27)
【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】
造血幹及び／または前駆細胞（ＨＳＰＣ）またはＨＳＰＣ集団にｍＲＮＡを送達する方法であって、
ａ．前記ｍＲＮＡ、イオン化され得るアミン脂質、ヘルパー脂質、中性脂質、及びＰＥＧ脂質を含むＬＮＰ組成物を血清因子とプレインキュベートし、
ｂ．前記プレインキュベートしたＬＮＰ組成物と前記ＨＳＰＣまたは前記ＨＳＰＣ集団とをインビトロで接触させ、かつ
ｃ．前記ＨＳＰＣまたは前記ＨＳＰＣ集団をインビトロで培養し、
それにより、前記ＨＳＰＣまたは前記ＨＳＰＣ集団に前記ｍＲＮＡを送達することを含む、前記方法。
【請求項２】
ＨＳＰＣにｍＲＮＡを送達する方法であって、
ａ．前記ｍＲＮＡ及びイオン化され得るアミン脂質を含むＬＮＰ組成物を血清因子とプレインキュベートし、
ｂ．前記プレインキュベートしたＬＮＰ組成物と前記ＨＳＰＣとをインビトロで接触させ、かつ
ｃ．前記ＨＳＰＣをインビトロで培養し、
それにより、前記ＨＳＰＣに前記ｍＲＮＡを送達することを含む、前記方法。
【請求項３】

前記ＨＳＰＣまたはＨＳＰＣ集団はＣＤ３４＋またはＣＤ３４＋ＣＤ９０＋である、請求項１または２に記載の方法。
【請求項４】
幹細胞または幹細胞集団にｍＲＮＡを送達する方法であって、
ａ．前記ｍＲＮＡを含むＬＮＰ組成物を血清因子とプレインキュベートし、
ｂ．前記プレインキュベートしたＬＮＰ組成物と前記幹細胞または前記幹細胞集団とをインビトロで接触させ、かつ
ｃ．前記幹細胞または前記幹細胞集団をインビトロで培養し、
それにより、前記幹細胞または前記幹細胞集団に前記ｍＲＮＡを送達することを含む、前記方法。
【請求項５】
前記ｍＲＮＡはＣａｓヌクレアーゼをコードする、請求項１～４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６】
前記ＬＮＰ組成物はさらにｇＲＮＡを含む、請求項５に記載の方法。
【請求項７】
ＨＳＰＣにＣａｓヌクレアーゼｍＲＮＡ及びｇＲＮＡを導入する方法であって、
ａ．前記ＣａｓヌクレアーゼｍＲＮＡ、ｇＲＮＡ、イオン化され得るアミン脂質、ヘルパー脂質、中性脂質、及びＰＥＧ脂質を含むＬＮＰ組成物を血清因子とプレインキュベートし、
ｂ．前記プレインキュベートしたＬＮＰ組成物と前記ＨＳＰＣとをインビトロで接触させ、かつ
ｃ．前記ＨＳＰＣを培養し、
それにより、前記ＨＳＰＣに前記ＣａｓヌクレアーゼｍＲＮＡ及びｇＲＮＡを導入することを含む、前記方法。
【請求項８】
前記ＨＳＰＣまたはＨＳＰＣ集団はＣＤ３４＋またはＣＤ３４＋ＣＤ９０＋である、請求項７に記載の方法。
【請求項９】
前記ｍＲＮＡ及び前記ｇＲＮＡをＬＮＰ組成物に共封入する、請求項６～８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１０】
前記ＬＮＰ組成物が第１のＬＮＰ及び第２のＬＮＰを含み、前記ｍＲＮＡが前記第１のＬＮＰに封入され、かつ、前記ｇＲＮＡが前記第２のＬＮＰに封入される、請求項６～８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１１】
前記ｇＲＮＡは二重ガイドＲＮＡ（ｄｇＲＮＡ）である、請求項６～１０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１２】
前記ｇＲＮＡは単一ガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）である、請求項６～１０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１３】
前記ｇＲＮＡは修飾ｇＲＮＡである、請求項６～１２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１４】
前記ｇＲＮＡは、２’－Ｏ－メチル（２’－Ｏ－Ｍｅ）修飾ヌクレオチド、ヌクレオチド間のホスホロチオアート（ＰＳ）結合、及び２’－フルオロ（２’－Ｆ）修飾ヌクレオチドから選択される修飾を含む、請求項１３に記載の方法。
【請求項１５】
前記ｇＲＮＡは、５’末端および３’末端を含み、
（ａ）５’末端の最初の５ヌクレオチドの１つ以上における修飾、

（ｂ）３’末端の最後の５ヌクレオチドの１つ以上における修飾、
（ｃ）５’末端の最初の４ヌクレオチド間におけるＰＳ結合、及び
（ｄ）３’末端の最後の４ヌクレオチド間におけるＰＳ結合
から選択される少なくとも１つの修飾を含む、請求項１３または１４に記載の方法。
【請求項１６】
前記ｇＲＮＡは、５’末端及び３’末端を含み、
（ａ）５’末端の最初の３ヌクレオチドにおける２’－Ｏ－Ｍｅ修飾ヌクレオチド、及び
（ｂ）３’末端の最後の３ヌクレオチドにおける２’－Ｏ－Ｍｅ修飾ヌクレオチド
から選択される少なくとも１つの修飾を含む、請求項１３～１５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１７】
前記Ｃａｓヌクレアーゼはクラス２Ｃａｓヌクレアーゼである、請求項１～１６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１８】
前記クラス２Ｃａｓヌクレアーゼは Ｃａｓ９ヌクレアーゼまたはＣｐｆ１ヌクレアーゼである、請求項１７に記載の方法。
【請求項１９】
前記クラス２Ｃａｓヌクレアーゼは Ｃａｓ９ヌクレアーゼであり、かつ、前記Ｃａｓ９ヌクレアーゼはＳ．ｐｙｏｇｅｎｅｓ　Ｃａｓ９である、請求項１８に記載の方法。
【請求項２０】
トランスフェクション後の細胞生存は少なくとも６０％である、請求項１～１９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２１】
約１分～１時間プレインキュベートすることを含む、請求項１～２０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２２】
前記ＬＮＰ組成物は緩衝液を含む、請求項１～２１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２３】
前記ＬＮＰ組成物を血清とプレインキュベートする、請求項１～２２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２４】
前記血清は、哺乳類、マウス、霊長類、またはヒトの血清である、請求項２３に記載の方法。
【請求項２５】
前記ＬＮＰ組成物と単離された血清因子とをプレインキュベートする、請求項１～２２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２６】
前記血清因子はＡｐｏＥである、請求項２５に記載の方法。
【請求項２７】
前記血清因子はＡｐｏＥ２、ＡｐｏＥ３、及びＡｐｏＥ４から選択される、請求項２５に記載の方法。
【請求項２８】
前記ＡｐｏＥはヒト組換えタンパク質である、請求項２５～２７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２９】
前記培養ステップは幹細胞増殖因子と前記幹細胞、前記幹細胞集団、前記ＨＳＰＣまたは前記ＨＳＰＣ集団とを接触させることを含む、請求項１～２８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３０】

前記幹細胞、前記幹細胞集団、前記ＨＳＰＣ、または前記ＨＳＰＣ集団はヒトの細胞または試料である、請求項１～２９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３１】
前記幹細胞、前記幹細胞集団、前記ＨＳＰＣまたは前記ＨＳＰＣ集団に鋳型核酸を導入することをさらに含む、請求項１～３０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３２】
前記ＬＮＰ組成物はＲＮＡ成分と脂質成分とを含み、ここで、前記脂質成分は、イオン化され得るアミン脂質、中性脂質、ヘルパー脂質、及びステルス脂質を含み、かつ、Ｎ／Ｐ比は約１～１０であり、前記Ｎ／Ｐ比は、イオン化され得るアミン脂質の正電荷のアミン基（Ｎ）と前記ＲＮＡ成分の負電荷のリン酸基（Ｐ）との比である、請求項１～３１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３３】
前記脂質成分は、
【化１】



で表されるリピドＡまたはリピドＡのアセタール類似体を含む、請求項３２に記載の方法。
【請求項３４】
前記脂質成分は、
約４０～６０モル％のイオン化され得るアミン脂質、
約５～１５モル％の中性脂質、
約１．５～１０モル％のＰＥＧ脂質と、
ヘルパー脂質
を含み、
前記ＬＮＰ組成物のＮ／Ｐ比は約３～１０である、請求項３２または３３に記載の方法。
【請求項３５】
前記ｍＲＮＡは修飾ｍＲＮＡである、請求項１～３４に記載の方法。
【請求項３６】
前記ｍＲＮＡは、ＲＮＡ誘導型ＤＮＡ結合因子をコードするオープンリーディングフレームを含み、ここで、
前記オープンリーディングフレームはウリジン含量が、その最小ウリジン含量から、前記最小ウリジン含量の１５０％までの範囲である、または
前記オープンリーディングフレームはウリジンジヌクレオチド含量が、その最小ウリジンジヌクレオチド含量から、前記最小ウリジンジヌクレオチド含量の１５０％までの範囲である、
請求項１～３５のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項３７】
前記ｍＲＮＡは、配列番号１、４、１０、１４、１５、１７、１８、２０、２１、２３、２４、２６、２７、２９、３０、５０、５２、５４、６５、または６６のいずれか１つに対する同一性が少なくとも９０％である配列を含み、ここで、前記ｍＲＮＡは、ＲＮＡ誘導型ＤＮＡ結合因子をコードするオープンリーディングフレームを含む、先行請求項のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項３８】
前記遺伝子編集は達成され、編集率として測定され、前記編集率は、配列読み取り総数の少なくとも４０％、少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも８０％、少なくとも９０％、または少なくとも９５％である、請求項１～３７のいずれか一項に記載の方

法。
【請求項３９】
請求項１～３８のいずれか一項に記載の方法により作製される、工学的に操作された幹細胞、幹細胞集団、ＨＳＰＣまたはＨＳＰＣ集団。
【手続補正２】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０１８７
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０１８７】
上記明細書で特に断りがない限り、明細書中、さまざまな成分を「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｉｎｇ）」という記述がある実施形態は、記述の成分「からなる（ｃｏｎｓｉｓｔｉｎｇ　ｏｆ）」かまたはそれ「から本質的になる（ｃｏｎｓｉｓｔｉｎｇ　ｅｓｓｅｎｔｉａｌｌｙ　ｏｆ）」ことも意図され、明細書中、さまざまな成分「からなる（ｃｏｎｓｉｓｔｉｎｇ　ｏｆ）」という記述がある実施形態は、記述の成分を「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｉｎｇ）」かまたはそれ「から本質的になる（ｃｏｎｓｉｓｔｉｎｇ　ｅｓｓｅｎｔｉａｌｌｙ　ｏｆ）」ことも意図され、明細書中、さまざまな成分「について（ａｂｏｕｔ）」という記述がある実施形態は、記述の成分「にて（ａｔ）」であることも意図され、また、明細書中、さまざまな成分「から本質的になる（ｃｏｎｓｉｓｔｉｎｇ　ｅｓｓｅｎｔｉａｌｌｙ　ｏｆ）」という記述がある実施形態は、記述の成分「からなる（ｃｏｎｓｉｓｔｉｎｇ　ｏｆ）」かまたはそれを「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｉｎｇ）」ことも意図される（このような互換性は請求項内でこれらの用語を使用する際には適用されない）。
本発明は、例えば以下の実施形態を包含する：
［実施形態１］造血幹及び／または前駆細胞（ＨＳＰＣ）またはＨＳＰＣ集団にｍＲＮＡを送達する方法であって、
ａ．前記ｍＲＮＡ、アミン脂質、ヘルパー脂質、中性脂質、及びＰＥＧ脂質を含むＬＮＰ組成物を血清因子とプレインキュベートし、
ｂ．前記プレインキュベートしたＬＮＰ組成物と前記ＨＳＰＣまたは前記ＨＳＰＣ集団とをインビトロで接触させ、かつ
ｃ．前記ＨＳＰＣまたは前記ＨＳＰＣ集団をインビトロで培養し、
それにより、前記ＨＳＰＣまたは前記ＨＳＰＣ集団に前記ｍＲＮＡを送達することを含む、前記方法。
［実施形態２］ＨＳＰＣにｍＲＮＡを送達する方法であって、
ａ．前記ｍＲＮＡ及びアミン脂質を含むＬＮＰ組成物を血清因子とプレインキュベートし、
ｂ．前記プレインキュベートしたＬＮＰ組成物と前記細胞とをインビトロで接触させ、かつ
ｃ．前記ＨＳＰＣをインビトロで培養し、
それにより、前記ＨＳＰＣに前記ｍＲＮＡを送達することを含む、前記方法。
［実施形態３］幹細胞または幹細胞集団にｍＲＮＡを送達する方法であって、
ａ．前記ｍＲＮＡを含むＬＮＰ組成物を血清因子とプレインキュベートし、
ｂ．前記プレインキュベートしたＬＮＰ組成物と前記幹細胞集団とをインビトロで接触させ、かつ
ｃ．前記幹細胞集団をインビトロで培養し、
それにより、前記幹細胞集団に前記ｍＲＮＡを送達することを含む、前記方法。
［実施形態４］前記ｍＲＮＡはＣａｓヌクレアーゼをコードする、実施形態１～３のいずれかに記載の方法。
［実施形態５］ＨＳＰＣにＣａｓヌクレアーゼｍＲＮＡ及びｇＲＮＡを導入する方法であって、
ａ．前記ＣａｓヌクレアーゼｍＲＮＡ、ｇＲＮＡ、アミン脂質、ヘルパー脂質、中性脂質

、及びＰＥＧ脂質を含むＬＮＰ組成物を血清因子とプレインキュベートし、
ｂ．前記プレインキュベートしたＬＮＰ組成物と前記ＨＳＰＣとをインビトロで接触させ、かつ
ｃ．前記ＨＳＰＣを培養し、
それにより、前記ＨＳＰＣに前記Ｃａｓヌクレアーゼｍ ＲＮＡ及びｇＲＮＡを導入することを含む、前記方法。
［実施形態６］インビトロで遺伝子操作されたＨＳＰＣを作製する方法であって、
ａ．Ｃａｓヌクレアーゼｍ ＲＮＡ、ｇＲＮＡ、アミン脂質、ヘルパー脂質、中性脂質、及びＰＥＧ脂質を含むＬＮＰ組成物を血清因子とプレインキュベートし、
ｂ．前記プレインキュベートしたＬＮＰ組成物と前記ＨＳＰＣとをインビトロで接触させ、かつ
ｃ．前記ＨＳＰＣをインビトロで培養し、
それにより、遺伝子操作されたＨＳＰＣを作製することを含む、前記方法。
［実施形態７］幹細胞にＣａｓヌクレアーゼｍ ＲＮＡ及びｇＲＮＡを導入する方法であって、
ａ．前記Ｃａｓヌクレアーゼｍ ＲＮＡ、ｇＲＮＡ、及びアミン脂質を含むＬＮＰ組成物を血清因子とプレインキュベートし、
ｂ．前記プレインキュベートしたＬＮＰ組成物と前記幹細胞とをインビトロで接触させ、かつ
ｃ．前記幹細胞を培養し、
それにより、前記幹細胞に前記Ｃａｓヌクレアーゼｍ ＲＮＡ及びｇＲＮＡを導入することを含む、前記方法。
［実施形態８］インビトロで遺伝子操作されたＨＳＰＣなどの幹細胞を作製する方法であって、
ａ．Ｃａｓヌクレアーゼｍ ＲＮＡ、ｇＲＮＡ、及び生分解性脂質を含むＬＮＰ組成物を血清因子とプレインキュベートし、
ｂ．前記プレインキュベートしたＬＮＰ組成物と前記細胞とをインビトロで接触させ、かつ
ｃ．前記細胞をインビトロで培養し、
それにより、遺伝子操作されたＨＳＰＣなどの幹細胞を作製することを含む、前記方法。
［実施形態９］前記ＬＮＰ組成物はさらにｇＲＮＡを含む、実施形態４に記載の方法。
［実施形態１０］前記Ｃａｓヌクレアーゼはクラス２Ｃａｓヌクレアーゼである、実施形態４～９のいずれかに記載の方法。
［実施形態１１］前記クラス２ＣａｓヌクレアーゼはＣａｓ９ヌクレアーゼである、実施形態１０に記載の方法。
［実施形態１２］前記Ｃａｓ９ヌクレアーゼはＳ．ｐｙｏｇｅｎｅｓ　Ｃａｓ９である、実施形態１１に記載の方法。
［実施形態１３］前記クラス２ＣａｓヌクレアーゼはＣｐｆ１ヌクレアーゼである、実施形態１０に記載の方法。
［実施形態１４］前記ｇＲＮＡは二重ガイドＲＮＡ（ｄｇＲＮＡ）である、実施形態５～１３のいずれかに記載の方法。
［実施形態１５］前記ｇＲＮＡは単一ガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）である、実施形態５～１３のいずれかに記載の方法。
［実施形態１６］前記接触ステップの後で洗浄ステップをさらに含む、先行実施形態のいずれかに記載の方法。
［実施形態１７］前記接触ステップは約１分～約７２時間かかる、先行実施形態のいずれかに記載の方法。
［実施形態１８］前記接触ステップは約１分～約２４時間かかる、先行実施形態のいずれかに記載の方法。
［実施形態１９］前記接触ステップは約２時間～約２４時間である、実施形態１７または

１８に記載の方法。
［実施形態２０］前記接触ステップは約４時間～約１２時間である、実施形態１７～１９のいずれかに記載の方法。
［実施形態２１］前記接触ステップは約６時間～約１２時間である、実施形態１７～２０のいずれかに記載の方法。
［実施形態２２］トランスフェクション後の細胞生存は少なくとも６０％である、先行実施形態のいずれかに記載の方法。
［実施形態２３］トランスフェクション後の細胞生存は少なくとも７０％である、実施形態２２に記載の方法。
［実施形態２４］トランスフェクション後の細胞生存は少なくとも８０％である、実施形態２２に記載の方法。
［実施形態２５］トランスフェクション後の細胞生存は少なくとも９０％である、実施形態２２に記載の方法。
［実施形態２６］トランスフェクション後の細胞生存は少なくとも９５％である、実施形態２２に記載の方法。
［実施形態２７］前記血清因子及び前記ＬＮＰ組成物を約３０秒～一晩プレインキュベートすることをさらに含む、先行実施形態のいずれかに記載の方法。
［実施形態２８］約１分～１時間プレインキュベートすることを含む、実施形態２７に記載の方法。
［実施形態２９］約１～３０分間プレインキュベートすることを含む、実施形態２７に記載の方法。
［実施形態３０］約１～１０分間プレインキュベートすることを含む、実施形態２７に記載の方法。
［実施形態３１］約５分間プレインキュベートすることを含む、実施形態２７に記載の方法。
［実施形態３２］５分±２分間プレインキュベートすることを含む、実施形態２７または実施形態３１に記載の方法。
［実施形態３３］前記プレインキュベートは約４℃にて生じる、先行実施形態のいずれかに記載の方法。
［実施形態３４］前記プレインキュベートは約２５℃にて生じる、先行実施形態のいずれかに記載の方法。
［実施形態３５］前記プレインキュベートは約３７℃にて生じる、先行実施形態のいずれかに記載の方法。
［実施形態３６］前記プレインキュベートステップは緩衝液を含む、先行実施形態のいずれかに記載の方法。
［実施形態３７］前記緩衝液はＨＳＰＣ用培地を含むかまたはそれからなる、実施形態３６に記載の方法。
［実施形態３８］前記ＬＮＰ組成物を血清とプレインキュベートする、先行実施形態のいずれかに記載の方法。
［実施形態３９］前記血清は、哺乳類、マウス、霊長類、またはヒトの血清である、実施形態３８に記載の方法。
［実施形態４０］前記ＬＮＰ組成物と単離された血清因子とをプレインキュベートする、実施形態１～３７のいずれかに記載の方法。
［実施形態４１］前記血清因子はＡｐｏＥである、実施形態４０に記載の方法。
［実施形態４２］前記血清因子はＡｐｏＥ２、ＡｐｏＥ３、及びＡｐｏＥ４から選ばれる、実施形態４０に記載の方法。
［実施形態４３］前記ＡｐｏＥはヒト組換えタンパク質である、実施形態４０～４２のいずれかに記載の方法。
［実施形態４４］培養ステップは、前記幹細胞、ＨＳＰＣ、またはＨＳＰＣ集団をＨＳＰＣ培養用緩衝液中で増殖させることを含む、先行実施形態のいずれかに記載の方法。

［実施形態４５］前記接触ステップと培養ステップとで前記培地を変えることをさらに含む、先行実施形態のいずれかに記載の方法。
［実施形態４６］前記培養ステップは幹細胞増殖因子を含む、先行実施形態のいずれかに記載の方法。
［実施形態４７］前記ＨＳＰＣは造血幹細胞（ＨＳＣ）である、実施形態１～２、４～６、または８～４６のいずれかに記載の方法。
［実施形態４８］前記幹細胞、ＨＳＰＣ、またはＨＳＰＣ集団はヒトの細胞または試料である、先行実施形態のいずれかに記載の方法。
［実施形態４９］前記ｍＲＮＡと前記ガイドＲＮＡ核酸とを単一のＬＮＰ組成物に製剤化する、実施形態５～４８のいずれかに記載の方法。
［実施形態５０］前記ｍＲＮＡ及び前記ｇＲＮＡを前記ＬＮＰ組成物に共封入する、実施形態５～４８のいずれかに記載の方法。
［実施形態５１］前記ｍＲＮＡ及び前記ｇＲＮＡを別々のＬＮＰに封入する、実施形態５～４８のいずれかに記載の方法。
［実施形態５２］前記ｍＲＮＡを第１のＬＮＰ組成物に製剤化し、前記ガイドＲＮＡ核酸を第２のＬＮＰ組成物に製剤化する、実施形態５～４８のいずれかに記載の方法。
［実施形態５３］前記第１及び第２のＬＮＰ組成物を同時に投与する、実施形態５２に記載の方法。
［実施形態５４］前記第１及び第２のＬＮＰ組成物を逐次投与する、実施形態５２に記載の方法。
［実施形態５５］前記プレインキュベーションステップの前に前記第１及び第２のＬＮＰ組成物を合わせる、実施形態５２～５４のいずれかに記載の方法。
［実施形態５６］前記第１及び第２のＬＮＰ組成物を別々にプレインキュベートする、実施形態５２～５４のいずれかに記載の方法。
［実施形態５７］前記細胞に鋳型核酸を導入することをさらに含む、先行実施形態のいずれかに記載の方法。
［実施形態５８］前記ＬＮＰ組成物はＲＮＡ成分と脂質成分とを含み、ここで、前記脂質成分はアミン脂質、中性脂質、ヘルパー脂質、及びステルス脂質を含み、かつ、Ｎ／Ｐ比は約１～１０である、先行実施形態のいずれかに記載の方法。
［実施形態５９］前記脂質成分はリピドＡまたはそのアセタール類似体を含む、実施形態５８に記載の方法。
［実施形態６０］前記脂質成分は、
約４０～６０モル％のアミン脂質と、
約５～１５モル％の中性脂質と、
約１．５～１０モル％のＰＥＧ脂質
とを含み、ここで、前記脂質成分の残部はヘルパー脂質であり、
前記ＬＮＰ組成物のＮ／Ｐ比は約３～１０である、実施形態５８に記載の方法。
［実施形態６１］前記脂質成分は、
約５０～６０モル％のアミン脂質と、
約８～１０モル％の中性脂質と、
約２．５～４モル％のＰＥＧ脂質
とを含み、ここで、前記脂質成分の残部はヘルパー脂質であり、
前記ＬＮＰ組成物のＮ／Ｐ比は約３～８である、実施形態５８に記載の方法。
［実施形態６２］前記脂質成分は、
約５０～６０モル％のアミン脂質と、
約５～１５モル％のＤＳＰＣと、
約２．５～４モル％のＰＥＧ脂質
とを含み、ここで、前記脂質成分の残部はコレステロールであり、
前記ＬＮＰ組成物のＮ／Ｐ比は約３～８である、実施形態５６に記載の方法。
［実施形態６３］前記脂質成分は、

４８～５３モル％のリピドＡと、
約８～１０モル％のＤＳＰＣと、
１．５～１０モル％のＰＥＧ脂質
とを含み、ここで、前記脂質成分の残部はコレステロールであり、
前記ＬＮＰ組成物のＮ／Ｐ比は３～８±０．２である、実施形態５８に記載の方法。
［実施形態６４］前記ＲＮＡは修飾ＲＮＡである、先行実施形態のいずれかに記載の方法。
［実施形態６５］前記修飾ＲＮＡは修飾ｍＲＮＡである、実施形態６４に記載の方法。
［実施形態６６］前記ＲＮＡは、ＲＮＡ誘導型ＤＮＡ結合因子をコードするオープンリーディングフレームを含み、ここで、前記オープンリーディングフレームはウリジン含量が、その最小ウリジン含量から、前記最小ウリジン含量の１５０％までの範囲である、先行実施形態のいずれかに記載の方法。
［実施形態６７］前記ＲＮＡは、ＲＮＡ誘導型ＤＮＡ結合因子をコードするオープンリーディングフレームを含み、ここで、前記オープンリーディングフレームはウリジンジヌクレオチド含量が、その最小ウリジンジヌクレオチド含量から、前記最小ウリジンジヌクレオチド含量の１５０％までの範囲である、先行実施形態のいずれかに記載の組成物。
［実施形態６８］前記ＲＮＡは、配列番号１、４、１０、１４、１５、１７、１８、２０、２１、２３、２４、２６、２７、２９、３０、５０、５２、５４、６５、または６６のいずれか１つに対する同一性が少なくとも９０％である配列を含み、ここで、前記ｍＲＮＡは、ＲＮＡ誘導型ＤＮＡ結合因子をコードするオープンリーディングフレームを含む、先行実施形態のいずれかに記載の組成物。
［実施形態６９］前記ｇＲＮＡは修飾ｇＲＮＡである、実施形態５～６８のいずれかに記載の方法。
［実施形態７０］前記ｇＲＮＡは、２’－Ｏ－メチル（２’－Ｏ－Ｍｅ）修飾ヌクレオチド、ヌクレオチド間のホスホロチオアート（ＰＳ）結合、及び２’－フルオロ（２’－Ｆ）修飾ヌクレオチドから選ばれる修飾を含む、実施形態６９に記載の方法。
［実施形態７１］前記ｇＲＮＡは、５’末端の最初の５ヌクレオチドの１つ以上における修飾を含む、実施形態６９または７０に記載の方法。
［実施形態７２］前記ｇＲＮＡは、３’末端の最後の５ヌクレオチドの１つ以上における修飾を含む、実施形態６９～７１のいずれかに記載の方法。
［実施形態７３］前記ｇＲＮＡは、最初の４ヌクレオチド間にＰＳ結合を含む、実施形態６９～７２のいずれかに記載の方法。
［実施形態７４］前記ｇＲＮＡは、最後の４ヌクレオチド間にＰＳ結合を含む、実施形態６９～７３のいずれかに記載の方法。
［実施形態７５］５’末端の最初の３ヌクレオチドに２’－Ｏ－Ｍｅ修飾ヌクレオチドをさらに含む、実施形態６９～７４のいずれかに記載の方法。
［実施形態７６］３’末端の最後の３ヌクレオチドに２’－Ｏ－Ｍｅ修飾ヌクレオチドをさらに含む、実施形態６９～７５のいずれかに記載の方法。
［実施形態７７］前記ＨＳＰＣまたはＨＳＰＣ集団はＣＤ３４＋である、実施形態１～２、４～６、または８～７６に記載の方法。
［実施形態７８］前記ＨＳＰＣまたはＨＳＰＣ集団はＣＤ３４＋ＣＤ９０＋である、実施形態１～２、４～６、または８～７７に記載の方法。
［実施形態７９］先行実施形態のいずれかに記載の方法により作製される、工学的に操作された幹細胞または幹細胞集団。
［実施形態８０］先行実施形態のいずれかに記載の方法により作製される、工学的に操作されたＨＳＰＣまたはＨＳＰＣ集団。
［実施形態８１］前記工学的に操作されたＨＳＰＣは、例えば、工学的に操作されたＨＳＰＣの移植後などに、患者体内の組織または臓器内、例えば、骨髄、血液、または他の組織内に存在する、実施形態７８に記載のＨＳＰＣまたはＨＳＰＣ集団。
［実施形態８２］前記幹細胞、ＨＳＰＣ、またはＨＳＰＣ集団は、前記細胞を投与される

べき患者に関して自己由来である、先行実施形態のいずれかに記載の方法。
［実施形態８３］前記幹細胞、ＨＳＰＣ、またはＨＳＰＣ集団は、前記細胞を投与されるべき患者に関して同種である、先行実施形態のいずれかに記載の方法。
［実施形態８４］前記幹細胞、ＨＳＰＣ、またはＨＳＰＣ集団におけるＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ遺伝子編集を達成することをさらに含む、先行実施形態のいずれかに記載の方法。
［実施形態８５］前記幹細胞、ＨＳＰＣ、またはＨＳＰＣ集団において遺伝子編集を検出することをさらに含む、先行実施形態のいずれかに記載の方法。
［実施形態８６］前記遺伝子編集は、編集率またはＤＮＡ修飾率として測定される、実施形態８４または８５に記載の方法。
［実施形態８７］前記編集率は少なくとも４０％である、実施形態８６に記載の方法。
［実施形態８８］前記編集率は少なくとも６０％である、実施形態８６に記載の方法。
［実施形態８９］前記編集率は少なくとも７０％である、実施形態８６に記載の方法。
［実施形態９０］前記編集率は少なくとも８０％である、実施形態８６に記載の方法。
［実施形態９１］前記編集率は少なくとも９０％である、実施形態８６に記載の方法。
［実施形態９２］前記編集率は少なくとも９５％である、実施形態８６に記載の方法。
［実施形態９３］前記ＤＮＡ修飾率は少なくとも４０％である、実施形態８６に記載の方法。
［実施形態９４］前記ＤＮＡ修飾率は少なくとも６０％である、実施形態８６に記載の方法。
［実施形態９５］前記ＤＮＡ修飾率は少なくとも７０％である、実施形態８６に記載の方法。
［実施形態９６］前記ＤＮＡ修飾率は少なくとも８０％である、実施形態８６に記載の方法。
［実施形態９７］前記ＤＮＡ修飾率は少なくとも９０％である、実施形態８６に記載の方法。
［実施形態９８］前記ＤＮＡ修飾率は少なくとも９５％である、実施形態８６に記載の方法。
［実施形態９９］前記幹細胞、ＨＳＰＣ、またはＨＳＰＣ集団は骨髄試料由来である、先行実施形態のいずれかに記載の方法。