



NORWAY

(19) NO
(51) Int Cl.
C12N 15/63 (2006.01)

Norwegian Industrial Property Office

(21)	Translation Published	2016.01.11
(80)	Date of The European Patent Office Publication of the Granted Patent	2015.08.19
(86)	European Application Nr.	13824232.6
(86)	European Filing Date	2013.12.12
(87)	The European Application's Publication Date	2014.08.13
(30)	Priority	2012.12.12, US, 201261736527 P 2013.01.02, US, 201361748427 P 2013.03.15, US, 201361791409 P 2013.06.17, US, 201361835931 P 2013.07.02, US, 201361842322 P 2013.10.15, US, 201314054414
(84)	Designated Contracting States:	AL AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HR HU IE IS IT LI LT LU LV MC MK MT NL NO PL PT RO RS SE SI SK SM TR
(73)	Proprietor	The Broad Institute, Inc., 415 Main Street, Cambridge, MA 02142, US-USA Massachusetts Institute of Technology, 77 Massachusetts Avenue, Cambridge MA 02142, US-USA
(72)	Inventor	Zhang, Feng, 100 Pacific Street, Apt. 11, Cambridge, MA 02139, US-USA
(74)	Agent or Attorney	Tandbergs Patentkontor AS, Postboks 1570 Vika, 0118 OSLO, Norge

(54) Title **CRISPR-CAS SYSTEMS AND METHODS FOR ALTERING EXPRESSION OF GENE PRODUCTS**

(56) References Cited:

L. CONG ET AL: "Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems", SCIENCE, vol. 339, no. 6121, 15 February 2013 (2013-02-15), pages 819-823, XP055102030, ISSN: 0036-8075, DOI: 10.1126/science.1231143 & L. CONG ET AL: "Supplementary Material to : Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems", SCIENCE, vol. 339, no. 6121, 3 January 2013 (2013-01-03), pages 819-823, XP055067744, ISSN: 0036-8075, DOI: 10.1126/science.1231143

M. JINEK ET AL: "A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity", SCIENCE, vol. 337, no. 6096, 17 August 2012 (2012-08-17), pages 816-821, XP055067740, ISSN: 0036-8075, DOI: 10.1126/science.1225829 & M. JINEK ET AL: "A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity (Supplementary Material)", SCIENCE, vol. 337, no. 6096, 28 June 2012 (2012-06-28), pages 816-821, XP055067747, ISSN: 0036-8075, DOI: 10.1126/science.1225829

G. GASIUNAS ET AL: "PNAS Plus: Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, vol. 109, no. 39, 25 September 2012 (2012-09-25), pages E2579-E2586, XP055068588, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/pnas.1208507109

JIANG WENYAN ET AL: "RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems", NATURE BIOTECHNOLOGY, vol. 31, no. 3, 29 January 2013 (2013-01-29), pages

233-239, XP002699849,

BLAKE WIEDENHEFT ET AL: "RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea", NATURE, vol. 482, no. 7385, 15 February 2012 (2012-02-15), pages 331-338, XP055116249, ISSN: 0028-0836, DOI: 10.1038/nature10886

ELITZA DELTCHEVA ET AL: "CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III", NATURE, vol. 471, no. 7340, 31 March 2011 (2011-03-31), pages 602-607, XP055068535, ISSN: 0028-0836, DOI: 10.1038/nature09886

MICHAEL P TERNS ET AL: "CRISPR-based adaptive immune systems", CURRENT OPINION IN MICROBIOLOGY, vol. 14, no. 3, 1 June 2011 (2011-06-01), pages 321-327, XP055097823, ISSN: 1369-5274, DOI: 10.1016/j.mib.2011.03.005

GAJ THOMAS ET AL: "ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering", TRENDS IN BIOTECHNOLOGY, vol. 31, no. 7, 1 July 2013 (2013-07-01), pages 397-405, XP028571313, ISSN: 0167-7799, DOI: 10.1016/J.TIBTECH.2013.04.004

WANG HAOYI ET AL: "One-Step Generation of Mice Carrying Mutations in Multiple Genes by CRISPR/Cas-Mediated Genome Engineering", CELL, vol. 153, no. 4, 9 May 2013 (2013-05-09), pages 910-918, XP028538358, ISSN: 0092-8674, DOI: 10.1016/J.CELL.2013.04.025

LUKE A. GILBERT ET AL: "CRISPR-Mediated Modular RNA-Guided Regulation of Transcription in Eukaryotes", CELL, vol. 154, no. 2, 1 July 2013 (2013-07-01), pages 442-451, XP055115843, ISSN: 0092-8674, DOI: 10.1016/j.cell.2013.06.044

KRZYSZTOF CHYLINSKI ET AL: "The tracrRNA and Cas9 families of type II CRISPR-Cas immunity systems", RNA BIOLOGY, vol. 10, no. 5, 1 May 2013 (2013-05-01), pages 726-737, XP055116068, ISSN: 1547-6286, DOI: 10.4161/rna.24321

WOONG Y HWANG ET AL: "Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system", NATURE BIOTECHNOLOGY, vol. 31, no. 3, 29 January 2013 (2013-01-29), pages 227-229, XP055086625, ISSN: 1087-0156, DOI: 10.1038/nbt.2501

Enclosed is a translation of the patent claims in Norwegian. Please note that as per the Norwegian Patents Acts, section 66i the patent will receive protection in Norway only as far as there is agreement between the translation and the language of the application/patent granted at the EPO. In matters concerning the validity of the patent, language of the application/patent granted at the EPO will be used as the basis for the decision. The patent documents published by the EPO are available through Espacenet (<http://worldwide.espacenet.com>) or via the search engine on our website here: <https://search.patentstyret.no/>

Patentkrav

1. Et konstruert, ikke-naturlig forekommende klustret regelmessig innfelt kort
5 palindromisk gjentak (CRISPR)-CRISPR-assosiert (Cas) (CRISPR-Cas)-
vektorsystem som omfatter én eller flere vektorer som omfatter:

a) et første regulerende element operativt bundet til én eller flere nukleotid-
10 sekvenser som koder for ett eller flere CRISPR-Cas-system guide-RNAer som
hybridiserer med målsekvenser i polynukleotid loci i en eukaryotcelle, hvor
guide-RNAen omfatter en guidesekvens, en tracr-sekvens, og en tracr-make-
sekvens,

b) et andre regulatorisk element som er operativt bundet til en nukleotidsekvens
15 som koder for et type II Cas9-protein, hvor nevnte protein omfatter et nukleært
lokaliseringssignal (NLS);

hvor komponentene (a) og (b) ligger på samme eller forskjellige vektorer i systemet,
hvor tracr-sekvensen er 30 eller flere nukleotider i lengde, og
20 hvorved den ene eller de flere guide-RNAene målrettes mot polynukleotid loci i en
eukaryotcelle, og Cas9-proteinet spalter polynukleotid loci, hvorved sekvensen av
polynukleotid loci er modifisert; og, hvor Cas9-proteinet og den ene eller de flere
guide-RNAene ikke naturlig forekommer sammen.

2. Et konstruert, ikke-naturlig forekommende Type II CRISPR-Cas-vektorsystem
25 ifølge krav 1, hvor Cas9-proteinet omfatter én eller flere mutasjoner i et katalytisk
domene, slik at det muterte proteinet Cas9 mangler evnen til å spalte én tråd av
polynukleotid loci, og er en nickase.

3. System ifølge krav 1 eller 2, hvor vektorene er virus vektorer.

30 4. System ifølge krav 3, hvor virusvektorene er retrovirus, lentivirus, adenovirus,
adeno-assosierte eller herpes simplex virus vektorer.

5. System ifølge hvilket som helst av kravene 2 til 4, hvor Cas9-proteinet omfatter én
35 eller flere mutasjoner i de RuvC I-, RuvC II- eller RuvC III-katalytiske domenene.

6. System ifølge hvilket som helst av kravene 2 til 4, hvor Cas9-proteinet omfatter en
mutasjon valgt fra gruppen bestående av D10A, H840A, N854A og N863A med

referanse til posisjonsnummereringen til et *Streptococcus pyogenes* Cas9-(SpCas9)-protein.

7. System ifølge hvilket som helst av de foregående krav, hvor guide-RNAet er et kimært RNA som omfatter guide-sekvensen, tracr-sekvensen, og en tracr-make-sekvens.

8. System ifølge krav 7, hvor hybridiseringen mellom tracr-sekvensen og tracr-make-sekvensen frembringer en transkripsjon som har en sekundær struktur.

9. System ifølge krav 8, hvor den sekundære strukturen er en hårnål.

10. System ifølge hvilket som helst av de foregående krav, hvor eukaryotcellen er en pattedyrceelle eller en human celle.

11. System ifølge hvilket som helst av de foregående krav, hvor Cas9-proteinet er kodon optimalisert for ekspresjon i en eukaryotcelle.

12. System ifølge hvilket som helst av de foregående krav, hvor en reparasjonstemplat settes inn i det spaltede polynukleotid loci.

13. Anvendelse av systemet ifølge et av kravene 1 til 12:

a) for stedsspesifikk gen knockout;

b) for stedsspesifikk genom redigering;

c) for DNA-sekvens-spesifikke interferens; eller

d) for multipleks genom konstruksjon;

forutsatt at anvendelsen ikke omfatter en prosess for å endre den stamcelle genetiske identiteten til mennesker; og

hvor anvendelsen i) er *in vitro* eller *ex vivo*; eller ii) er ikke en metode for behandling av menneske- eller dyrekroppen ved terapi.

14. Anvendelse ifølge krav 13, hvor anvendelsen videre omfatter å reparere nevnte spaltede mål-polynukleotid ved homolog rekombinasjon med en eksogen polynukleotid-templat, hvor reparasjonen resulterer i en mutasjon som omfatter en insersjon, delesjon eller substitusjon av en eller flere nukleotider i nevnte mål-polynukleotid.

15. Anvendelse av systemet ifølge et av kravene 1 til 12, ved fremstilling av et ikke-humant transgent dyr eller transgen plante, forutsatt at anvendelsen ikke er en metode for behandling av dyrekroppen ved terapi.