



(12) Translation of  
european patent specification

(11) NO/EP 2771468 B1

NORWAY

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

Norwegian Industrial Property Office

---

|      |                                                                      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
|------|----------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| (21) | Translation Published                                                | 2015.07.06                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| (80) | Date of The European Patent Office Publication of the Granted Patent | 2015.02.11                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| (86) | European Application Nr.                                             | 13818570.7                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| (86) | European Filing Date                                                 | 2013.12.12                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| (87) | The European Application's Publication Date                          | 2014.09.03                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| (30) | Priority                                                             | 2012.12.12, US, 201261736527 P<br>2013.01.02, US, 201361748427 P<br>2013.01.30, US, 201361758468 P<br>2013.02.25, US, 201361769046 P<br>2013.03.15, US, 201361791409 P<br>2013.03.15, US, 201361802174 P<br>2013.03.28, US, 201361806375 P<br>2013.04.20, US, 201361814263 P<br>2013.05.06, US, 201361819803 P<br>2013.05.28, US, 201361828130 P<br>2013.06.17, US, 201361835931 P<br>2013.06.17, US, 201361836127 P |
| (84) | Designated Contracting States:                                       | AL AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB<br>GR HR HU IE IS IT LI LT LU LV MC MK MT NL NO<br>PL PT RO RS SE SI SK SM TR                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| (73) | Proprietor                                                           | The Broad Institute, Inc., 7 Cambridge Center, Cambridge, MA 02142, US-USA<br>Massachusetts Institute of Technology, 77 Massachusetts Avenue, Cambridge MA 02142, US-USA<br>President and Fellows of Harvard College, 17 Quincy Street, Cambridge, MA 02138, US-USA                                                                                                                                                  |
| (72) | Inventor                                                             | ZHANG, Feng, 100 Pacific Street Apt. 11, Cambridge, MA 02139, US-USA<br>CONG, Le, 1200 Massachusetts Ave., Apt. 33E, Cambridge, MA 02138, US-USA<br>HSU, Patrick, 37 Kirkland St., Apt. B1, Cambridge, MA 02138, US-USA<br>RAN, Fei, 129 St. Botolph St., Apt. 2, Boston, MA 02115, US-USA                                                                                                                           |
| (74) | Agent or Attorney                                                    | Tandbergs Patentkontor AS, Postboks 1570 Vika, 0118 OSLO, Norge                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |

---

(54) Title                    **ENGINEERING OF SYSTEMS, METHODS AND OPTIMIZED GUIDE COMPOSITIONS FOR SEQUENCE MANIPULATION**

(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

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. En ikke-naturlig forekommende eller konstruert komposisjon omfattende:

en klynge regulatoriske ispedde korte palindromiske repetisjoner (CRISPR) - CRISPR assosiert (Cas) (CRISPR Cas) System kimært RNA (chiRNA) polynukleotid-sekvens, der polynukleotidsekvensen omfatter:

- (a) en guide-sekvens på mellom 10 - 30 nukleotider i lengde, som er i stand til å hybridisere til et target-sekvens i en eukaryot celle,
- (b) en «tracr mate» sekvens, en
- (c) en «tracrRNA» sekvens

der (a), (b) og (c) er anordnet i en 5 ' til 3' orientering, som, når transkribert, hybridiserer «tracr mate» sekvensen til «tracrRNA» sekvensen og guidesekvensen retter sekvens-spesifikk binding av et CRISPR kompleks til målsekvensen, hvor CRISPR komplekset omfatter et type II Cas9 proteinkompleks med (1) guidesekvensen som er hybridisert til målsekvensen, og (2) «tracr mate»-sekvensen som er hybridisert til «tracrRNA» sekvensen karakterisert ved at «tracrRNA» sekvensen er 50 eller flere nukleotider i lengde.

2. En klynge regulatoriske ispedde korte palindromiske repetisjoner (CRISPR) - CRISPR assosiert (Cas) (CRISPR-Cas) vektorsystem som omfatter én eller flere vektorer omfattende

I. et første regulatorisk element operativt koblet til en nukleotidsekvens som koder et CRISPR-Cas system av kimært RNA (chiRNA) polynukleotid-sekvens som angitt i krav 1, og

II. et andre regulatorisk element operativt koblet til en nukleotidsekvens som koder en type II-protein Cas9 omfattende én eller flere nukleære lokaliseringsssekvenser, med tilstrekkelig styrke til å drive akkumulering av nevnte Cas9 protein i en detekterbar mengde i kjernen i en eukaryotcelle; der komponentene I og II ligger i de samme eller forskjellige vektorer av systemet.

3. Komposisjon ifølge krav 1, der Cas9 enzymet omfatter én eller flere nukleære lokaliseringsssekvenser med tilstrekkelig styrke til å drive akkumulering av nevnte Cas9 enzym i en detekterbar mengde i kjernen av en eukaryotcelle.

4. Komposisjon ifølge krav 1, eller vektorsystem ifølge krav 2, der proteinet er et Cas9 nuklease som styrer kløyving av begge strenger av polynukleotid locus.

5. Komposisjon ifølge krav 1, eller vektorsystem ifølge krav 2, der Cas9 proteinet omfatter én eller flere mutasjoner i et katalytisk domene, og er en nickase som spalter bare én streng av polynukleotidet locus.

6. Vektorsystem ifølge krav 2, eller hvilket som helst krav avhengig av dette, der nukleotid-sekvensen som koder Cas9 proteinet er kodon-optimalisert for ekspresjon i en eukaryotcelle.

7. Vektorsystem ifølge krav 2, eller hvilket som helst krav avhengig av dette, der vektorene er virale vektorer.

8. Vektorsystem ifølge krav 7, der de virale vektorer er retrovirus, lentiviral, adenovirus, adeno-assosierte eller herpes simplex virale vektorer.

9. Vektorsystem ifølge krav 2, eller hvilket som helst krav avhengig av dette, der vektorsystemet omfatter nukleotid -sekvens (er) som koder to eller flere nukleære lokaliseringssignaler (NLS) uttrykt med nukleotidsekvens som koder Cas9 proteinet.

10. Vektorsystem ifølge krav 9, som når det uttrykkes i det minste én NLS er på eller nær amino-terminus til Cas9 proteinene og / eller minst én NLS er på eller nær karboksy-terminus til Cas9 proteinet.

11. Vektorsystem ifølge krav 9, der minst én NLS er på eller nær amino-terminus til Cas9 proteinet og minst ett NLS er på eller nær karboksy-terminus til Cas9 proteinet.

12. Anvendelse av komposisjonen ifølge krav 1, eller vektorsystem ifølge krav 2 eller hvilket som helst krav avhengig derav for gen-konstruksjon, forutsatt at nevnte anvendelse ikke er en metode for behandling av menneske- eller dyre-kropper ved kirurgi eller terapi, og forutsatt at nevnte bruk ikke er en prosess for å endre kimlinjens genetiske identiteten til mennesker.

13. Anvendelse ifølge krav 12, der gen-konstruksjonen omfatter å modifisere et målpolynukleotid i en eukaryotcelle, å modifisere ekspresjon av et polynukleotid i en eukaryotcelle, å generere en modell av en eukaryotcelle som omfatter et mutert sykdoms-gen, eller slår ut et gen.

5

14. Anvendelse ifølge krav 12, der anvendelsen videre omfatter å reparere nevnte spaltede målpolynukleotid ved å sette inn et eksogent mål-polynukleotid, der reparasjonen resulterer i en mutasjon som omfatter en innsetting, sletting, eller substitusjon av én eller flere nukleotider i nevnte mål-polynukleotid.

10

15. Anvendelse ifølge krav 12, der anvendelsen videre omfatter redigering av nevnte spaltede målpolynukleotid ved å sette inn et eksogent mål-polynukleotid, der redigeringen resulterer i en mutasjon som omfatter en innsetting, sletting, eller substitusjon av én eller flere nukleotider i nevnte mål-polynukleotid.

15

16. Anvendelse ifølge krav 13 eller 14, der innføringen er ved homolog rekombinasjon.

17. Anvendelse av komposisjonen ifølge krav 1, eller vektorsystemet ifølge krav 2 eller hvilket som helst krav avhengig av dette, i produksjonen av et ikke-humant transgent dyr eller transgen plante.

20