



(12) Translation of
european patent specification

(11) NO/EP 2784162 B1

NORWAY

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

Norwegian Industrial Property Office

- (21) Translation Published 2015.08.31
- (80) Date of The European Patent Office Publication of the Granted Patent 2015.04.08
- (86) European Application Nr. 14170383.5
- (86) European Filing Date 2013.12.12
- (87) The European Application's Publication Date 2014.10.01
- (30) Priority 2012.12.12, US, 201261736527 P
2013.01.02, US, 201361748427 P
2013.01.30, US, 201361758468 P
2013.02.25, US, 201361769046 P
2013.03.15, US, 201361791409 P
2013.03.15, US, 201361802174 P
2013.03.28, US, 201361806375 P
2013.04.20, US, 201361814263 P
2013.05.06, US, 201361819803 P
2013.05.28, US, 201361828130 P
2013.06.17, US, 201361835931 P
2013.06.17, US, 201361836127 P
- (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
- (62) Divided application EP2771468, med inndato 2013.12.12
- (73) Proprietor The Broad Institute, Inc., 7 Cambridge Center, Cambridge, MA 02142, US-USA
MASSACHUSETTS INSTITUTE OF TECHNOLOGY, 77 Massachusetts Avenue, Cambridge, MA 02142-1324, US-USA
President and Fellows of Harvard College, 17 Quincy Street, Cambridge, MA 02138-3876, US-USA
- (72) Inventor Cong, Le, 1200 Massachusetts Ave.Apt. 33E, Cambridge, MA 02138, US-USA
Zhang, Feng, 100 Pacific StreetApt. 11, Cambridge, MA 02139, US-USA
Hsu, Patrick, 37 Kirkland StreetApt. B1, Cambridge, MA 02138, US-USA
Ran, Fei, 129 St. Botolph St.Apt. 2, Boston, MA 02115, US-USA

(54) Title **Engineering of systems, methods and optimized guide compositions for sequence manipulation**

(56) References Cited: US-A1- 2010 076 057
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

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

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

- 5 **1.** En konstruert, ikke-naturlig forekommende CRISPR (Clustered Regularly Interspersed Short Palindromic Repeats)-CRISPR-assosiert (CAS) (CRISPR-Cas) vektorsystem, bestående av én eller flere vektorer som omfatter:
- 10 a) et første regulerende element operativt bundet til én eller flere nukleotid-sekvenser som koder én eller flere CRISPR-Cas-system polynukleotidsekvenser som omfatter en guide-sekvens, en tracr-RNA, og en tracr-mate-sekvens, hvor guide-sekvensen hybridiserer med én eller flere målsekvenser i polynukleotid-loci i en eukaryot celle,
- 15 b) et andre regulatorisk element operativt bundet til en nukleotidsekvens som koder for et type II Cas9-protein,
- hvor komponentene (a) og (b) ligger på samme eller forskjellige vektorer i systemet, hvor CRISPR-Cas-systemet omfatter to eller flere nukleære lokaliseringssignaler (NLS) uttrykt med nukleotidsekvensen som koder for Cas9- proteinet,
- 20 hvorved den ene eller de flere guide-sekvenser målrettes til den ene eller de flere polynukleotid-loci i en eukaryot celle, og Cas9-proteinet spalter det ene eller flere polynukleotid-loci, hvorved sekvensen av den ene eller de flere polynukleotid- loci blir modifisert.
- 25 **2.** Konstruert, ikke-naturlig forekommende type II CRISPR-Cas-vektorsystem ifølge krav 1, hvor Cas9-proteinet muteres i forhold til en tilsvarende villtype Cas9-protein slik at det muterte proteinet er en nickase som mangler evnen til å spalte en tråd av et målpolynukleotid,
- 30 hvorved den ene eller de flere guide-sekvenser målrettes til den ene eller de flere polynukleotid-loci i en eukaryot celle, og Cas9-proteinet spalter bare én tråd av polynukleotid-locien, hvorved sekvensen av den ene eller de flere polynukleotid-loci blir modifisert.
- 35 **3.** System ifølge krav 1 eller 2, hvor vektorene er virale vektorer.

4. System ifølge krav 3, hvor de virale vektorene er retrovirus-, lentivirus-, adenovirus-, adenoassosiert eller herpes simplexvirus-vektorer.
5. System ifølge hvilke som helst av kravene 2-4, hvor Cas9-proteinet omfatter én eller flere mutasjoner i RuvC I-, RuvC II- eller RuvC III-katalytiske domener.
6. System ifølge hvilke som helst av kravene 2-4, hvor Cas9-proteinet omfatter en mutasjon valgt fra gruppen bestående av D10A, H840A, N854A og N863A med henvisning til posisjonsnummereringen av et *Streptococcus pyogenes* Cas9 (SpCas9)-protein.
7. System ifølge hvilke som helst foregående krav, hvor minst én NLS er på eller nær amino-enden av Cas9-proteinet og/eller minst én NLS er på eller nær karboksy-enden av Cas9-proteinet.
8. System ifølge krav 7, hvor minst én NLS er på eller nær amino-enden av Cas9-proteinet og minst én NLS er på eller nær karboksy-enden av Cas9-proteinet.
9. System ifølge hvilket som helst foregående krav, hvor den ene eller de flere CRISPR-Cas-system-polynukleotidsekvenser omfatter en guide-sekvens kondensert til en trans-aktiverende cr (tracr)-sekvens.
10. System ifølge hvilket som helst foregående krav, hvor CRISPR-Cas-system-polynukleotidsekvensen er et kimært RNA som omfatter guide-sekvensen, tracr-sekvensen og en tracr-mate-sekvens.
11. System ifølge hvilket som helst foregående krav, hvor den eukaryote cellen er en pattedyr-celle eller en menneske-celle.
12. System ifølge hvilket som helst foregående krav, hvor Cas9-proteinet er kodon-optimalisert for ekspresjon i en eukaryot celle.
13. Anvendelse av systemet ifølge et av kravene 1 til 12, for genom-konstruksjon, forutsatt at bruken ikke omfatter en fremgangsmåte for å modifisere den kimlinje-genetiske identiteten til mennesker, og forutsatt at nevnte anvendelse ikke er en metode for behandling av menneske- eller dyrekroppen ved kirurgi eller terapi.

14. Anvendelse ifølge krav 13, hvor genom-teknikken omfatter å modifisere et målpolynukleotid i en eukaryot celle, å modifisere ekspresjon av et polynukleotid i en eukaryot celle, å generere en eukaryot celle modell som omfatter et mutert sykdomsgen, eller å slå ut et gen.

5

15. Anvendelse ifølge krav 13, hvor anvendelsen videre omfatter reparasjon av nevnte spaltede målpolynukleotid ved innføring av et eksogent templat-polynukleotid, hvor nevnte reparasjon resulterer i en mutasjon som omfatter en insersjon, delesjon eller substitusjon av ett eller flere nukleotider i nevnte mål-polynukleotid.

10

16. Anvendelse ifølge krav 13, hvor anvendelsen videre omfatter redigering av nevnte spaltede målpolynukleotid ved innføring av et eksogent templat-polynukleotid, hvor nevnte redigering resulterer i en mutasjon som omfatter en insersjon, delesjon eller substitusjon av ett eller flere nukleotider i nevnte mål-polynukleotid.

15

17. Anvendelse ifølge krav 15 eller 16, hvor insersjonen er ved homolog rekombinasjon.

20

18. Anvendelse av systemet ifølge hvilke som helst av kravene 1 til 12, ved fremstilling av et ikke-humant transgent dyr eller transgen plante.