



(12) Translation of
European patent specification

(11) NO/EP 2800811 B1

NORWAY

(19) NO
(51) Int Cl.
C12N 15/11 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)
C12N 15/10 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
C12N 15/90 (2006.01)

Norwegian Industrial Property Office

(21)	Translation Published	2017.10.02
(80)	Date of The European Patent Office Publication of the Granted Patent	2017.05.10
(86)	European Application Nr.	13793997.1
(86)	European Filing Date	2013.03.15
(87)	The European Application's Publication Date	2014.11.12
(30)	Priority	2012.05.25, US, 201261652086 P 2012.10.19, US, 201261716256 P 2013.01.28, US, 201361757640 P 2013.02.15, US, 201361765576 P
(84)	Designated Contracting States:	AL AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GR HR HU IE IS IT LI LT LU LV MC MK MT NL NO PL PT RO RS SE SI SK SM TR
	Designated Extension States:	BA ME
(73)	Proprietor	The Regents of the University of California, 1111 Franklin Street, 12th Floor, Oakland, CA 94607, US-USA University of Vienna, Universitätsring 1, 1010 Vienna, AT-Østerrike Charpentier, Emmanuelle, Department Of Regulation in Infection Biology Max Planck Institute for Infection Biology Charitéplatz 1, 10117 Berlin, DE-Tyskland
(72)	Inventor	JINEK, Martin, 1846 Spruce Street, Berkeley, California 94709, US-USA DOUDNA CATE, James Harrison, 164 Vicente Road, Berkeley, California, US-USA LIM, Wendell, 149 Collins Street, San Francisco, California 94118, US-USA QI, Lei, 730 Kinkead Way 302, Albany, California 94706, US-USA CHARPENTIER, Emmanuelle, Department "Regulation in Infection Biology" Helmholtz Centre for Infection Research Inhoffenstrasse 7, 38124 Braunschweig, DE-Tyskland CHYLINSKI, Krzysztof, Simmeringer Hauptstrasse 45/8, 1110 Vienna, AT-Østerrike DOUDNA, Jennifer A., 164 Vicente Road, Berkeley, California 94705, US-USA
(74)	Agent or Attorney	Zacco Norway AS, Postboks 2003 Vika, 0125 OSLO, Norge

(54)	Title	METHODS AND COMPOSITIONS FOR RNA-DIRECTED TARGET DNA MODIFICATION AND FOR RNA-DIRECTED MODULATION OF TRANSCRIPTION
(56)	References Cited:	WO-A1-2014/065596 WO-A1-2014/089290 WO-A1-2014/093712 WO-A1-2014/099744

WO-A2-2011/072246

WO-A2-2014/093661

US-A1- 2010 076 057

US-A1- 2011 189 776

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), XP055067747, US ISSN: 0036-8075, DOI: 10.1126/science.1225829

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, XP055067741, 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

P. MALI ET AL: "RNA-Guided Human Genome Engineering via Cas9", SCIENCE, vol. 339, no. 6121, 3 January 2013 (2013-01-03), pages 823-826, XP055111247, ISSN: 0036-8075, DOI: 10.1126/science.1232033

MARTIN JINEK ET AL: "RNA-programmed genome editing in human cells", E-LIFE, SAM LTD, GB, vol. 2, 29 January 2013 (2013-01-29), pages e00471-1, XP002699851, ISSN: 2050-084X, DOI: 10.7554/ELIFE.00471 [retrieved on 2013-06-28]

PHILIPPE HORVATH ET AL: "RNA-guided genome editing à la carte", CELL RESEARCH, vol. 23, no. 6, 12 March 2013 (2013-03-12), pages 733-734, XP055184973, ISSN: 1001-0602, DOI: 10.1038/cr.2013.39

SASHITAL, DIPALI G. ET AL.: 'Mechanism of foreign DNA selection in a bacterial adaptive immune system' MOLECULAR CELL vol. 46, no. 5, 19 April 2012, pages 606 - 615, XP028522142

WIEDENHEFT, BLAKE ET AL.: 'RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea' NATURE vol. 482, no. 7385, 15 February 2012, pages 331 - 338, XP055116249

HALE, CARYN R. ET AL.: 'RNA-guided RNA cleavage by a CRISPR RNA-Cas protein complex' CELL vol. 139, no. 5, 25 November 2009, pages 945 - 956, XP055038712

JINEK, MARTIN ET AL.: 'A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity' SCIENCE vol. 337, no. 6096, 17 August 2012, pages 816 - 821, XP055067747

R. SAPRANAUSKAS ET AL: "The Streptococcus thermophilus CRISPR/Cas system provides immunity in Escherichia coli", NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 39, no. 21, 3 August 2011 (2011-08-03), pages 9275-9282, XP055265024, GB ISSN: 0305-1048, DOI: 10.1093/nar/gkr606

HÉLÈNE DEVEAU ET AL: "Phage response to CRISPR-Encoded resistance in Streptococcus thermophilus", JOURNAL OF BACTERIOLOGY, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US, vol. 190, no. 4 1 February 2008 (2008-02-01), pages 1390-1400, XP002679468, ISSN: 0021-9193, DOI: 10.1128/JB.01412-07 Retrieved from the Internet:

URL:<http://jb.asm.org/content/190/4/1390> [retrieved on 2007-12-07]

F. J. M. Mojica ET AL: "Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system", Microbiology, vol. 155, no. 3, 1 March 2009 (2009-03-01), pages 733-740, XP055118366, ISSN: 1350-0872, DOI: 10.1099/mic.0.023960-0

P. Horvath ET AL: "CRISPR/Cas, the Immune System of Bacteria and Archaea", Science, vol. 327, no. 5962, 7 January 2010 (2010-01-07), pages 167-170, XP055016971, ISSN: 0036-8075, DOI: 10.1126/science.1179555

MAKAROVA KIRA S ET AL: "Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems", NATURE REVIEWS. MICROBIOLOGY, NATURE PUBLISHING GROUP, GB, vol. 9, no. 6, 1 June 2011 (2011-06-01), pages 467-477, XP009155547, ISSN: 1740-1526

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, XP055308803, United Kingdom ISSN: 0028-0836, DOI: 10.1038/nature09886

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. Fremgangsmåte for å endre et mål-DNA, der fremgangsmåten omfatter å bringe mål-DNA-et i kontakt med et kompleks omfattende:

(a) et Cas9-polypeptid og

(b) et enkeltmolekyl-RNA som er målrettet mot DNA, omfattende:

(i) et segment som er målrettet mot DNA, omfattende en nukleotidsekvens som er komplementær til en sekvens i mål-DNA-et, og

(ii) et proteinbindende segment som samvirker med Cas9-polypeptidet, hvori det proteinbindende segmentet omfatter to komplementære strekk av nukleotider som hybridiserer for å danne et dobbelttrådet RNA- (dsRNA-)dupleks, hvori de to komplementære strekkene av nukleotider er kovalent bundet av intervenerende nukleotider,

hvori opprettelsen av kontakt foregår *in vitro* eller i en celle *ex vivo*; og

hvori endringen er spalting av mål-DNA-et.

2. Fremgangsmåten ifølge krav 1, hvori dsRNA-duplekset har en lengde fra 8 basepar (bp) til 30 bp.

3. Fremgangsmåten ifølge krav 1 eller 2, hvori prosentandelen komplementaritet mellom nukleotidet som hybridiserer for å danne dsRNA-duplekset til det proteinbindende segmentet, er større enn 70 %.

4. Fremgangsmåten ifølge krav 1, 2 eller 3, hvori mål-DNA-et er til stede i en bakteriecelle, en archaea-celle, en enkeltcellet eukaryotisk organisme, en plantecelle, en celle fra et virvelløst dyr eller en celle fra et virveldyr.

5. Fremgangsmåten ifølge krav 1, 2 eller 3, hvori mål-DNA-et er kromosomalt DNA.

6. Fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av de foregående kravene, hvori opprettelsen av kontakt omfatter å føre (a) Cas9-polypeptidet eller et polynukleotid som koder for Cas9-polypeptidet, og (b) RNA-et som er målrettet mot DNA-et, eller et DNA-polynukleotid som koder for RNA-et som er målrettet mot DNA-et, inn i en celle.

7. Fremgangsmåten ifølge krav 6, hvori fremgangsmåten ytterligere omfatter å føre et donorpoly nukleotid inn i cellen.

5 **8.** Fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av de foregående kravene, hvori et proteintransduksjonsdomene er kovalent bundet til Cas9-polypeptidets aminoterminal, hvori proteintransduksjonsdomenet letter Cas9-polypeptides overgang fra cytosolen og inn i en celled organell.

10 **9.** Fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av kravene 1-7, hvori et proteintransduksjonsdomene er kovalent bundet til karboksylterminalen til Cas9-polypeptidet, hvori proteintransduksjonsdomenet letter Cas9-polypeptides overgang fra cytosolen og inn i en celled organell.

10. Sammensetning omfattende:

15 (a) et Cas9-polypeptid, eller et polynukleotid som koder for Cas9-polypeptidet, og

(b) et enkeltmolekyl-RNA som er målrettet mot DNA, eller et DNA-polynukleotid som koder for RNA-et som er målrettet mot DNA, hvori enkeltmolekyl-RNA-et som er målrettet mot DNA, omfatter:

20 (i) et segment som er målrettet mot DNA, omfattende en nukleotidsekvens som er komplementær til en sekvens i et mål-DNA, og

(ii) et proteinbindende segment som samvirker med Cas9-polypeptidet, hvori det proteinbindende segmentet omfatter to komplementære strekk av nukleotider som hybridiserer for å danne et dobbelttrådet RNA- (dsRNA-)dupleks, og

25 hvori de to komplementære strekkene av nukleotider er kovalent bundet av intervenerende nukleotider.

30 **11.** Fremgangsmåten ifølge krav 10, hvori et proteintransduksjonsdomene er kovalent bundet til aminoterminalen til Cas9-polypeptidet, hvori proteintransduksjonsdomenet letter Cas9-polypeptides overgang fra cytosolen og inn i en celled organell.

35 **12.** Fremgangsmåten ifølge krav 10, hvori et proteintransduksjonsdomene er kovalent bundet til karboksylterminalen til Cas9-polypeptidet, hvori proteintransduksjonsdomenet letter Cas9-polypeptides overgang fra cytosolen og inn i en celled organell.

13. Sammensetningen ifølge et hvilket som helst av kravene 10-12, hvori (a) Cas9-polypeptidet eller polynukleotidet som koder for Cas9-polypeptidet, og (b) enkeltmolekyl-RNA-et som er målrettet mot DNA, eller DNA-polynukleotidet som koder for RNA-et som er målrettet mot DNA, er i en celle *in vitro* eller *ex vivo*, hvori cellen ikke er en human kimcelle.

14. Enkeltmolekyl-RNA som er målrettet mot DNA, eller et DNA-polynukleotid som koder for RNA-et som er målrettet mot DNA, hvori enkeltmolekyl-RNA-et som er målrettet mot DNA, omfatter:

- (a) et segment som er målrettet mot DNA, omfattende en nukleotidsekvens som er komplementær til en målsekvens i et mål-DNA, og
- (b) et proteinbindende segment som samvirker med et Cas9-protein, hvori det proteinbindende segmentet omfatter to komplementære strekk av nukleotider som hybridiserer for å danne et dobbelttrådet RNA- (dsRNA-)dupleks, og hvori de to komplementære strekkene av polynukleotider er kovalent bundet av intervenserende nukleotider.

15. En eller flere nukleinsyrer omfattende:

(a) en første nukleotidsekvens som koder for et enkeltmolekyl-RNA som er målrettet mot DNA, omfattende:

- (i) et segment som er målrettet mot DNA, omfattende en nukleotidsekvens som er komplementær til en målsekvens i et mål-DNA, og
- (ii) et proteinbindende segment som samvirker med et Cas9-polypeptid, hvori det proteinbindende segmentet omfatter to komplementære strekk av nukleotider som hybridiserer for å danne et dobbelttrådet RNA- (dsRNA-)dupleks, og hvori de to komplementære strekkene av polynukleotider er kovalent bundet av intervenserende nukleotider;

hvori den første nukleotidsekvensen som koder for RNA-et som er målrettet mot DNA, er operativt bundet til en promotor; og eventuelt,

(b) en andre polynukleotidsekvens som koder for et Cas9-polypeptid, hvori nukleotidsekvensen som koder for Cas9-polypeptidet, er operativt bundet til en promotor.

16. Den ene eller de flere nukleinsyrene ifølge krav 15, hvori nukleinsyrene er én eller flere rekombinante ekspresjonsvektorer.

17. Den ene eller de flere nukleinsyrene ifølge krav 15, hvori den eller det flere rekombinante ekspresjonsvektorene er én eller flere virale vektorer.

18. Kit omfattende

- 5 (a) et Cas9-polyeptid eller en nukleinsyre omfattende en nukleotidsekvens som koder for Cas9-polyeptidet; og
- (b) et enkeltmolekyl-RNA som er målrettet mot DNA, eller en nukleinsyre omfattende en nukleotidsekvens som koder for enkeltmolekyl-RNA-et som er målrettet mot DNA, hvori enkeltmolekyl-RNA-et som er målrettet mot DNA,
- 10 omfatter:
- (i) et segment som er målrettet mot DNA, omfattende en nukleotidsekvens som er komplementær til en sekvens i et mål-DNA, og
- (ii) et proteinbindende segment som samvirker med Cas9-polyeptidet, hvori det proteinbindende segmentet omfatter to komplementære strekk av nukleotider
- 15 som hybridiserer for å danne et dobbelttrådet RNA- (dsRNA-)dupleks, og hvori de to komplementære strekkene av nukleotider er kovalent bundet av intervenerende nukleotider, og
- hvor (a) og (b) er i den samme eller i separate beholdere.

20 **19.** Sammensetningen ifølge et hvilket som helst av kravene 10-13, enkeltmolekyl-RNA-et som er målrettet mot DNA, eller polynukleotid som koder for enkeltmolekyl-RNA-et som er målrettet mot DNA, ifølge krav 14, den ene eller de flere nukleinsyrene ifølge et hvilket som helst av kravene 15-17 eller kettet ifølge krav 18, hvori dsRNA-duplekset har en lengde fra 8 basepar (bp) til

25 30 bp.

20. Sammensetningen ifølge et hvilket som helst av kravene 10-13 eller 19, enkeltmolekyl-RNA-et som er målrettet mot DNA, eller polynukleotid som koder for enkeltmolekyl-RNA-et som er målrettet mot DNA, ifølge krav 14 eller 19, den

30 ene eller de flere nukleinsyrene ifølge et hvilket som helst av kravene 15-17 eller 19 eller kettet ifølge krav 18 eller 19, hvori komplementariteten i prosent mellom nukleotidene som hybridiserer for å danne dsRNA-duplekset til det proteinbindende segmentet, er høyere enn 70 %.

35 **21.** Sammensetningen ifølge et hvilket som helst av kravene 10-13, 19 eller 20, enkeltmolekyl-RNA-et som er målrettet mot DNA, eller polynukleotid som koder for enkeltmolekyl-RNA-et som er målrettet mot DNA, ifølge hvilke som helst av

kravene 14, 19 eller 20, den ene eller de flere nukleinsyrene ifølge et hvilket som helst av kravene 15-17, 19 eller 20, eller kisset ifølge krav et hvilket som helst av kravene 18, 19 eller 20, hvori mål-DNA-et er til stede i en bakteriecelle, en archae-celle, en enkeltcellet eukaryotisk organisme, en plantecelle, en celle fra et virvelløst dyr eller en celle fra et virveldyr.

22. Sammensetningen ifølge et hvilket som helst av kravene 10-13 eller 19-21, enkeltmolekyl-RNA-et som er målrettet mot DNA, eller polynukleotid som koder for enkeltmolekyl-RNA-et som er målrettet mot DNA, ifølge et hvilket som helst av kravene 14 eller 19-21, den ene eller de flere nukleinsyrene ifølge et hvilket som helst av kravene 15-17 eller 19-21, eller kisset ifølge et hvilket som helst av kravene 18-21, hvori mål-DNA-et er kromosomalt DNA.

23. Sammensetningen ifølge et hvilket som helst av kravene 10-13 eller 19-22 eller enkeltmolekyl-RNA-et som er målrettet mot DNA, eller polynukleotid som koder for enkeltmolekyl-RNA-et som er målrettet mot DNA, ifølge et hvilket som helst av kravene 14 eller 19-22, eller den ene eller de flere nukleinsyrene ifølge et hvilket som helst av kravene 15-17 eller 19-22, for anvendelse i en fremgangsmåte for terapeutisk behandling av en pasient.