



(12) Translation of
European patent specification

(11) NO/EP 2825654 B1

NORWAY

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

Norwegian Industrial Property Office

- (21) Translation Published 2017.10.02
- (80) Date of The European Patent Office Publication of the Granted Patent 2017.04.26
- (86) European Application Nr. 13812430.0
- (86) European Filing Date 2013.12.12
- (87) The European Application's Publication Date 2015.01.21
- (30) Priority 2012.12.12, US, 201261736527 P
2013.01.02, US, 201361748427 P
2013.01.29, US, 201361757972 P
2013.02.25, US, 201361768959 P
2013.03.15, US, 201361791409 P
2013.06.17, US, 201361835931 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
- (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
President and Fellows of Harvard College, 17 Quincy Street, Cambridge, MA 02138, US-USA
The Rockefeller University, 1230 York Avenue, New York, NY 10065, US-USA
- (72) Inventor ZHANG, Feng, 100 Pacific St.Apt. 11, Cambridge, MA 02139, US-USA
BIKARD, David, Olivier, 238 E. 81st St., New York, NY 10028, US-USA
CONG, Le, 100 Memorial Dr.Apt 8-21 B, Cambridge, MA 02142, US-USA
COX, David Benjamin, Turitz, 375A Harvard St.Apt. 12A, Cambridge, MA 02138, US-USA
HSU, Patrick, 37 Kirkland StreetApt. B1, Cambridge, MA 02138, US-USA
JIANG, Wenyan, 15-08 150 Place, Whitestone, NY 11357, US-USA
LIN, Shauiliang, 790 Main St.Apt. 12, Cambridge, MA 02139, US-USA
MARRAFFINI, Luciano, 1230 York Ave., New York, NY 10065, US-USA
PLATT, Randall, Jeffrey, 72 Sixth St.Apt. 1, Cambridge, MA 02141, US-USA
RAN, Fei, 30 Clarendon St, Boston, MA 02116, US-USA
SANJANA, Neville, Espi, 2A Union Terrace, Cambridge, MA 02142, US-USA
- (74) Agent or Attorney Tandberg Innovation AS, Postboks 1570 Vika, 0118 OSLO, Norge

(54) Title **CRISPR-CAS COMPONENT SYSTEMS, METHODS AND COMPOSITIONS FOR SEQUENCE MANIPULATION**

(56) References Cited: WO-A1-2014/065596
WO-A1-2014/089290
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. GASUNAS 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. Ikke naturlig forekommende eller konstruert sammensetning, omfattende et vektorsystem som omfatter en eller flere vektorer som omfatter

I. et første regulatorisk element operativt koblet til en kimært RNA-(chiRNA) polynukleotidsekvens fra et CRISPR-Cas-system, hvor polynukleotidsekvensen omfatter

(a) en guide-sekvens som kan hybridisere til en målsekvens i en eukaryot celle,

(b) en tracr-mate-sekvens, og

(c) en tracr-sekvens, og

II. et andre regulatorisk element operativt koblet til en enzymkodende sekvens som koder for et CRISPR-enzym som omfatter minst ett eller flere nukleære lokaliseringssignaler (NLS) i nærheten av en ende av CRISPR-enzymet,

hvori (a), (b) og (c) er arrangert i en 5' til 3'-orientering,

hvori bestanddelene I og II er plassert på samme vektor eller på forskjellige vektorer i systemet,

hvori tracr-mate-sekvensen når den transkriberes hybridiserer til tracr-sekvensen og guide-sekvensen styrer sekvensspesifikk binding av et CRISPR-kompleks til

målsekvensen,

hvori CRISPR-komplekset omfatter CRISPR-enzymet kompleksbundet til (1) guide-sekvensen som er hybridisert til målsekvensen, og (2) tracr-mate-sekvensen som er hybridisert til tracr-sekvensen, og

hvori kimært RNA-polynukleotidsekvensen omfatter to eller flere hårnåsløkker.

2. Ikke naturlig forekommende eller konstruert sammensetning, omfattende et vektorsystem som omfatter en eller flere vektorer som omfatter

I. et første regulatorisk element operativt koblet til

(a) en guide-sekvens som kan hybridisere til en målsekvens i en eukaryot celle, og

(b) en tracr-mate-sekvens,

II. et andre regulatorisk element operativt koblet til en enzymkodende sekvens som koder for et CRISPR-enzym som omfatter minst ett eller flere nukleære lokaliseringssignaler (NLS) i nærheten til en ende av CRIPR-enzymet, og

III. et tredje regulatorisk element operativt koblet til en tracr-sekvens,

hvori bestanddelene I, II og III er plassert på samme vektor eller på forskjellige vektorer i systemet,

hvor i tracr-mate-sekvensen når den transkriberes hybridiserer til tracr-sekvensen og guide-sekvensen styrer sekvensspesifikk binding av et CRIPR-kompleks til målsekvensen, og

5 hvor i CRISPR-komplekset omfatter CRISPR-enzymet kompleksbundet til (1) guide-sekvensen som er hybridisert til målsekvensen, og (2) tracr-mate-sekvensen som er hybridisert til tracr-sekvensen.

3. Sammensetning ifølge krav 1, hvor i det anvendes flere chiRNA
10 polynukleotidsekvenser for tilveiebringelse av et multipleks-system, eller ifølge krav 2, hvor det anvendes flere guide-sekvenser og en enkelt tracr-sekvens for tilveiebringelse av et multipleks-system.

15 4. Multipleks-CRISPR-enzymssystem, hvor i systemet omfatter et vektorsystem som beskrevet i krav 1, hvor i det i multiplekssystemet anvendes flere chiRNA-polynukleotidsekvenser, eller hvor i systemet omfatter et vektorsystem ifølge krav 2, hvor i det i multiplekssystemet anvendes flere guide-sekvenser og en enkelt tracr-sekvens.

20

5. Sammensetning eller system ifølge ethvert av kravene 1, 2, 3 og 4, hvor i det første regulatoriske element er en polymerase III-promoter.

25

6. Sammensetning eller system ifølge ethvert av de foregående krav, hvor i det andre regulatoriske element er en polymerase II-promoter.

30 7. Sammensetning eller system ifølge krav 2, eller ifølge ethvert av kravene 3 til 6 når disse er underordnet krav 2, hvor i det tredje regulatoriske element er en polymerase III-promoter.

8. Sammensetning eller system ifølge ethvert av de foregående krav, hvor i
35 CRISPR-enzymet omfatter et eller flere NLS med tilstrekkelig styrke til å drive en akkumulering av CRISPR-enzymet i en påvisbar mengde i kjernen til en eukaryot celle.

9. Sammensetning eller system ifølge ethvert av de foregående krav, hvori tracr-sekvensen viser minst 50 % sekvenskomplementaritet over lengden av tracr-mate-sekvensen når de er optimalt sammenstilt.
- 5 10. Sammensetning eller system ifølge ethvert av de foregående krav, hvori CRISPR-enzymet er et type II CRISPR-systemenzym, fortrinnsvis hvori CRISPR-enzymet er et Cas9-enzym.
- 10 11. Sammensetning eller system ifølge ethvert av de foregående krav, hvori CRISPR-enzymet er kodon-optimalisert for ekspresjon i en eukaryot celle:
12. Sammensetning eller system ifølge ethvert av de foregående krav, hvori guide-
15 sekvensen har en lengde på minst 15 nukleotider.
13. Sammensetning eller system ifølge ethvert av de foregående krav når disse er
underordnet krav 1, hvori kimært RNA-polynukleotidsekvensen omfatter to, tre, fire
20 eller fem hårnålsløkker.
14. Sammensetning ifølge ethvert av de foregående krav når disse er underordnet
krav 1, hvori bestanddelene I og II er plassert på samme vektor i systemet, eller,
25 dersom kravene er underordnet krav 2, hvori bestanddelene I, II og III er plassert på
samme vektor i systemet.
15. Sammensetning eller system ifølget ethvert av de foregående krav når disse er
30 underordnet krav 1, hvori bestanddelene I og II er plassert på forskjellige vektorer i
systemet, eller, dersom kravene er underordnet krav 2, hvori bestanddelene I, II og III
er plassert på forskjellige vektorer i systemet.
- 35 16. Eukaryot vertscelle, omfattende sammensetningen eller systemet ifølge ethvert
av de foregående krav.

17. Ikke-menneskelig organisme, omfattende den eukaryote vertscellen ifølge krav 16.

5 18. Sett, omfattende sammensetningen ifølge ethvert av kravene 1 til 15 og instruksjoner for anvendelse av settet.

10 19. Ex vivo- eller in vitro-fremgangsmåte for endring av ekspresjonen av et genomisk lokus av interesse i en eukaryot celle, omfattende å sette det genomiske lokus i forbindelse med sammensetningen ifølge ethvert av kravene 1 til 15 og fastslå hvorvidt ekspresjonen av det genomiske lokus har blitt endret, forutsatt at fremgangsmåten ikke omfatter en prosess for å endre den genetiske identitet av kimbanen hos mennesker.

15

20. Fremgangsmåte ifølge krav 19, hvori guide-sekvensen styrer sekvensspesifikk binding av CRISPR-komplekset til målsekvenser basert på nærvær av en CRISPR-motiv- sekvens.

20

21. Fremgangsmåte ifølge krav 20, hvori CRISPR-motiv-sekvensen er NAG.

25 22. Fremgangsmåte for seleksjon av en eller flere prokaryote celler ved å innføre en eller flere mutasjoner i et gen som omfatter et mål-polynukleotid i den eller de prokaryote cellen(e), hvor fremgangsmåten omfatter:

30 innføring av en eller flere vektorer i den eller de eukaryote cellen(e), hvori vektoren eller vektorene styrer ekspresjonen av en eller flere av: et CRISPR-enzym, en guide-sekvens koblet til et tracr-mate-sekvens, en tracr-sekvens og et redigeringstemplat, og hvori alle av et CRISPR-enzym, en guide-sekvens koblet til et tracr-mate-sekvens, en tracr-sekvens og et redigeringstemplat foreligger i cellen(e),

35 hvori redigeringstemplatet omfatter mutasjonen eller mutasjonene som skal innføres i genet, og mutasjonen eller mutasjonene hindrer CRISPR-enzymspalting,

a tillate seleksjon av homolog rekombinasjon mellom redigeringstemplatet og målpolynukleotidet i cellen(e), slik at mutasjonen eller mutasjonene som hindrer CRISPR-enzymspalting innføres i genet,

å la et CRISPR-kompleks bindes til målpolynukleotidet, slik at målpolynukleotidet spaltes inne i genet, hvori CRISPR-komplekset omfatter CRISPR-enzymet kompleksbundet til (1) guide-sekvensen som er hybridisert til en målsekvens i målpolynukleotidet, og (2) tracr-mate-sekvensen som er hybridisert til tracr-sekvensen, hvori spalting av målpolynukleotidsekvensen via CRISPR-komplekset induserer celledød, hvorved en eller flere prokaryote celler i hvilke en eller flere mutasjoner har blitt innført kan selekteres.

23. Fremgangsmåte ifølge krav 22, hvori CRISPR-enzymet er et type II CRISPR-systemenzym, fortrinnsvis hvori CRISPR-enzymet er Cas9.