



(12) Translation of
European patent specification

(11) NO/EP 2828386 B1

NORWAY

(19) NO
(51) Int Cl.
C12N 15/10 (2006.01)
C12N 9/22 (2006.01)
C12N 15/113 (2010.01)
C12N 15/90 (2006.01)
C12Q 1/6811 (2018.01)

Norwegian Industrial Property Office

(21)	Translation Published	2019.11.25
(80)	Date of The European Patent Office Publication of the Granted Patent	2019.07.10
(86)	European Application Nr.	13715080.1
(86)	European Filing Date	2013.03.20
(87)	The European Application's Publication Date	2015.01.28
(30)	Priority	2012.03.20, US, 201261613373 P 2012.04.17, US, 201261625420 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	Vilnius University, Universiteto g. 3, 01513 Vilnius, Litauen
(72)	Inventor	SIKSNYS, Virginijus, Konarskio st. 32-26, Vilnius, Litauen GASIUNAS, Giedrius, Parko st. 4.Kvetkai, B, 41212 Birzai District, Litauen KARVELIS, Tautvydas, Vilniaus st. 28, Paberze, Vilnius District, Litauen LUBYS, Arvydas, Konarskio st. 32A-7, 03127 Vilnius, Litauen ZALIAUSKIENE, Lolita, Vyduno 18-39, 06205 Vilnius, Litauen GLEMZAITE, Monika, c/o Fermentas UAB,V. Graiciuno 8, 02241 Vilnius, Litauen SMITH, Anja, c/o Dharmacon, Inc.2650 Crescent Drive,Suite 100, Lafayette, CO 80026, USA
(74)	Agent or Attorney	BRYN AARFLOT AS, Stortingsgata 8, 0161 OSLO, Norge

(54)	Title	RNA-DIRECTED DNA CLEAVAGE BY THE Cas9-crRNA COMPLEX
(56)	References Cited:	WO-A1-2014/089290 WO-A1-2013/176772 WO-A2-2014/099750 WO-A2-2008/108989 US-A1- 2010 076 057 WO-A2-2014/093622 WO-A2-2007/025097

WO-A1-2014/065596

- LEI S. QI ET AL: "Repurposing CRISPR as an RNA-Guided Platform for Sequence-Specific Control of Gene Expression", *CELL*, vol. 152, no. 5, 28 February 2013 (2013-02-28), pages 1173-1183, XP055068548, ISSN: 0092-8674, DOI: 10.1016/j.cell.2013.02.022
- CHO S W ET AL: "Targeted genome engineering in human cells with the Cas9 RNA-guided endonuclease", *NATURE BIOTECHNOLOGY*, vol. 31, no. 3, March 2013 (2013-03), pages 230-232, XP002699850, NATURE PUBLISHING GROUP USA ISSN: 1087-0156
- 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
- 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
- VAN DER OOST J ET AL: "CRISPR-based adaptive and heritable immunity in prokaryotes", *TRENDS IN BIOCHEMICAL SCIENCES*, ELSEVIER, HAYWARDS, GB, vol. 34, no. 8, 21 July 2009 (2009-07-21), - 1 August 2009 (2009-08-01), pages 401-407, XP026448351, ISSN: 0968-0004 [retrieved on 2009-07-29]
- JINEK MARTIN ET AL: "RNA-programmed genome editing in human cells.", *eLIFE* 2013 , vol. 2, E00471, 29 January 2013 (2013-01-29), XP002699851, ISSN: 2050-084X, DOI: 10.7554/eLIFE.00471 Retrieved from the Internet: URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3557905/pdf/elife00471.pdf> [retrieved on 2013-06-28]
- JIANG WENYAN ET AL: "RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems", *NATURE BIOTECHNOLOGY*, vol. 31, no. 3, March 2013 (2013-03), pages 233-239, XP002699849,
- 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
- 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
- R. SAPRANAUSKAS ET AL: "The Streptococcus thermophilus CRISPR/Cas system provides immunity in Escherichia coli", *NUCLEIC ACIDS RESEARCH*, 3 August 2011 (2011-08-03), XP055011535, ISSN: 0305-1048, DOI: 10.1093/nar/gkr606 cited in the application -& R. SAPRANAUSKAS ET AL: "The Streptococcus thermophilus CRISPR/Cas system provides immunity in Escherichia coli (Supplementary data)", *NUCLEIC ACIDS RESEARCH*, vol. 39, no. 21, 3 August 2011 (2011-08-03), pages 9275-9282, XP055067807, ISSN: 0305-1048, DOI: 10.1093/nar/gkr606 cited in the application
- Josiane E. Garneau ET AL: "The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA", *Nature*, vol. 468, no. 7320, 4 November 2010 (2010-11-04), pages 67-71, XP055181397, ISSN: 0028-0836, DOI: 10.1038/nature09523

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.** In vitro-fremgangsmåte for den stedsspesifikke modifikasjonen av et mål-DNA-molekyl, hvor fremgangsmåten omfatter
å kontakte, under passende forhold,
et mål-DNA-molekyl; og
en RNA-styrt DNA-endonuklease som omfatter minst én RNA-sekvens og minst ett av et
10 RuvC-aktivt stedsmønster og et HNH-aktivt stedsmønster;
hvor
den RNA-guidede DNA-endonukleasen er et Cas9-crRNA-kompleks Cas9-crRNA-
komplekset omfatter et Cas9, crRNA og tracrRNA å resultere i at mål-DNA-molekylet
modifiseres i en region som bestemmes av den komplementære bindingen av crRNA-et
15 til mål-DNA-molekylet, hvor fremgangsmåten videre omfatter å sette sammen
polypeptid-polyribonukleotidkomplekset *in vitro* ved inkubering av komponentene i
komplekset under forhold egnet for kompleks sammensetning, hvori mål-DNA-et er
dobbelstrenget eller enkeltstrenget og hvori et dobbeltstrenget mål-DNA inneholder et
proto-avstandsstykketilstøtende motiv.
20
- 2.** Fremgangsmåten ifølge krav 1, hvori komplekset omfatter
a) et polypeptid som har minst 80 % identitet med SEQ ID NO: 1,
b) et første polyribonukleotid crRNA omfatter en 3'-region og en 5'-region hvori 3'-
regionen omfatter minst 22 nukleotider av en gjentakelse til stede i et CRISPR-lokus og
25 5'-regionen omfatter minst 20 nukleotider av en avstandsstykkesekvens rett nedstrøms
for gjentakelsen i CRISPR-lokuset, og
c) et andre polyribonukleotid-tracrRNA som omfatter en 5'- og 3'-region hvori minst en
del av 5'-regionen er komplementær med 3'-regionen til crRNA.
- 30 **3.** Fremgangsmåten ifølge krav 2, hvori 5'-regionen til tracrRNA er minst 22 nukleotider
og er komplementær med de 22 nukleotidene til 3'-regionen til crRNA.
- 4.** Fremgangsmåten ifølge krav 2, hvori komponentene i komplekset isoleres fra en
genetisk modifisert mikroorganisme.
35
- 5.** Fremgangsmåten ifølge krav 2, hvori polypeptidet isoleres fra et genetisk modifisert
Escherichia coli.

- 6.** Fremgangsmåten ifølge krav 2, hvori polypeptidet fremstilles av en fremgangsmåte valgt fra rekombinant DNA-teknologi eller kjemisk syntese.
- 7.** Fremgangsmåten ifølge krav 2, hvori polypeptidet uttrykkes som et fusjonspolypeptid som inkluderer minst én ytterligere aminosyresekvens.
- 8.** Fremgangsmåten ifølge krav 7, hvori den ekstra sekvensen anvendes for rensing av fusjonspolypeptidet ved hjelp av affinitetskromatografi.
- 9.** Fremgangsmåten ifølge krav 2, hvori polypeptidet inneholder en punktmutasjon i det RuvC-aktive stedsmotivet.
- 10.** Fremgangsmåten ifølge krav 9, hvori punktmutasjonen er D31A.
- 11.** Fremgangsmåten ifølge krav 2, hvori polypeptidet inneholder en punktmutasjon i det HNH-aktive stedsmotivet.
- 12.** Fremgangsmåten ifølge krav 11, hvori punktmutasjonen er N891A.
- 13.** Fremgangsmåten ifølge krav 2, hvori den første polyribonukleotid-(crRNA)-sekvensen omfatter 5'-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUUAGAGCUGUGUUGUUUCG-3' (SEQ ID NO: 15).
- 14.** Fremgangsmåten ifølge krav 2, hvori komplekset genereres *in vitro*, hvor fremgangsmåten omfatter å inkubere komponentene i komplekset under forhold som er egnet for kompleks sammensetting, hvori komplekset omfatter det første polyribonukleotidet som har en sekvens som omfatter 5'-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUUAGAGCUGUGUUGUUUCG-3' (SEQ ID NO: 15) med en hvilken som helst ønskelig avstandssykkese-kvens.
- 15.** Fremgangsmåten ifølge krav 14, hvori det første polyribonukleotidet oppnås ved *in vitro* transkripsjon fra et DNA-fragment som inneholder en enkelt repeterende avstandsstykkerepetisjonsenhet, hvor avstandsstykket har en hvilken som helst ønskelig sekvens, eller er kjemisk syntetisert.
- 16.** Fremgangsmåten ifølge krav 14, hvori komponentene omfatter Cas9-polypeptid (SEQ ID NO: 1), tracrRNA-polyribonukleotid (SEQ ID NO: 5) og crRNA-polyribonukleotid

(5'-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUUAGAGCUGUGUUGUUUCG-3') (SEQ ID NO: 15)
med en hvilken som helst ønskelig avstandsstykkesekvens.