



(12) Translation of
european patent specification

(11) NO/EP 2898075 B1

NORWAY

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

Norwegian Industrial Property Office

(21)	Translation Published	2016.07.25
(80)	Date of The European Patent Office Publication of the Granted Patent	2016.03.09
(86)	European Application Nr.	13814364.9
(86)	European Filing Date	2013.12.12
(87)	The European Application's Publication Date	2015.07.29
(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, 201361836101 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
(72)	Inventor	ZHANG, Feng, 100 Pacific Street Apt. 11, Cambridge, MA 02139, US-USA RAN, Fei, 30 Clarendon St, Boston, MA 02116, US-USA SHALEM, Ophir, 435 Gooding way 453, Albany, CA 94706, US-USA
(74)	Agent or Attorney	Tandbergs Patentkontor AS, Postboks 1570 Vika, 0118 OSLO, Norge

(54) Title **ENGINEERING AND OPTIMIZATION OF IMPROVED SYSTEMS, METHODS AND ENZYME 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, 5 July 2012 (2012-07-05), 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 sammensetning omfattende:

5

CRISPR-komplekskomponenter omfattende:

I. CRISPR-Cas-system-polynukleotid-sekvens(er) som omfatter:

10

- (a) en konstruert guidesekvens omfattende RNA og som er i stand til å hybridisere til en målsekvens i et polynukleotid locus,
 - (b) en tracr mate-sekvens omfattende RNA, og
 - (c) en tracrRNA-sekvens omfattende RNA, og
- hvor (a) (b) og (c) er anordnet i en 5'- til 3'-orientering,

15

II. et Type II Cas9-protein,

karakterisert ved at tracr mate-sekvensen hybridiserer til tracrRNA-sekvensen og styresekvensen leder og sekvens-spesifikk binding av et CRISPR-kompleks til en målsekvens,

20

hvor CRISPR-komplekset omfatter Type II Cas9-protein-komplekset med (1) styresekvensen som er hybridisert til målsekvensen, og (2) tracr mate-sekvensen som er hybridisert til tracrRNA-sekvensen, og

hvor Type II Cas9-proteinet er eller omfatter en *Staphylococcus aureus* Cas9 (SaCas9).

25

2. Sammensetning ifølge krav 1, hvor CRISPR-Cas-system-polynukleotidsekvensen er et kimært RNA (chiRNA).

30

3. Sammensetning ifølge krav 2, omfattende et par av chiRNAs.

4. Sammensetning ifølge krav 3, omfattende to par av chiRNAs.

5. Sammensetning ifølge hvilket som helst av de foregående krav, omfattende et vektorsystem som omfatter en eller flere vektorer, og hvor polynukleotidsekvenser som omfatter eller koder for nevnte komponenter I og II ligger i de samme eller forskjellige vektorer i systemet.

35

6. Sammensetning ifølge krav 5, hvor en eller flere vektorer omfatter en eller flere virale vektorer.

7. Sammensetning ifølge krav 6, hvor en eller flere virale vektorer omfatter ett eller flere retrovirus-, lentivirus-, adenovirus-, adeno-assosierte virus- og herpes simplex virus-vektorer.

8. Sammensetning ifølge hvilket som helst av kravene 1-4, omfattende en nanopartikkel, liposom, eksosom, gjærsystem eller mikrovesikkel.

9. Sammensetning ifølge hvilket som helst av de foregående krav, inkludert en eller flere funksjonelle domener.

10. Sammensetning ifølge krav 9, hvor en eller flere funksjonelle domener omfatter et transkripsjonsaktivatorordomene.

11. Sammensetning ifølge krav 9, hvor det funksjonelle domenet omfatter VP64 eller KRAB, SID eller SID4X, eller en rekombinase, en transposase, et histon remodellerer, en DNA-metyltransferase, en kryptokrom, et lett induserbart/styrbart domene eller et kjemisk induserbart/styrbart domene.

12. Sammensetning ifølge hvilket som helst av kravene 5-11, hvor vektor-sammensetningen omfatter en enkelt vektor.

13. Sammensetning ifølge hvilket som helst av kravene 5-12, hvor cellen er en eukaryot celle.

14. Sammensetning ifølge hvilket som helst av kravene 5-13, hvor polynukleotid-sekvensen som koder for type II Cas9-proteinet er kodon optimalisert for ekspresjon i en eukaryot celle.

15. Sammensetning ifølge hvilket som helst av kravene 5-14, hvor polynukleotid-sekvenser som omfatter eller koder for nevnte CRISPR-komplekskomponenter omfatter en vev-spesifikk promoter.

16. Sammensetning ifølge krav 15, hvor den vev-spesifikke promoter leder ekspresjonen av nevnte CRISPR-komplekskomponenter i muskel, nevron, ben, hud, blod, lever, bukspyttkjertel eller lymfocytter.

17. Sammensetning ifølge hvilket som helst av de foregående krav, hvor føringssekvensen er i stand til å hybridisere til en målsekvens i en eukaryot celle.
18. Sammensetning ifølge hvilket som helst av de foregående krav, hvor tracrRNA-sekvensen er 30 eller flere nukleotider i lengde.
19. Sammensetning ifølge krav 18, hvor tracrRNA er 50 eller flere nukleotider i lengde.
20. Sammensetning ifølge hvilket som helst av de foregående krav, hvor type II Cas9-proteinet videre omfatter en eller flere nukleære lokaliseringsssekvenser (NLSs).
21. En *ex vivo* eller *in vitro* vertscelle eller celledinje som omfatter sammensetningen ifølge hvilket som helst av de foregående krav, eller progeny derav, hvor vertscellen eller celledinjen ikke er en human kimmelledinje.
22. En *ex vivo* eller *in vitro* vertscelle, celledinje eller progeny derav ifølge krav 21, som er en stamcelle eller stammelledinje.
23. Fremgangsmåte for modifisering av en organisme ved manipulering av en eller flere målsekvenser ved genomiske loci av interesse som omfatter levering til organismen av sammensetningen ifølge hvilket som helst av kravene 1-20, hvor organismen er en ikke-animalsk organisme.
24. En *ex vivo* fremgangsmåte for modifisering av en celle av en organisme ved manipulering av en eller flere målsekvenser ved genomiske loci av interesse som omfatter levering til cellen av en sammensetning ifølge hvilket som helst av kravene 1-20, hvor fremgangsmåten ikke omfatter en prosess for å modifisere den genetiske kimmelledinje-identiteten til et menneske.
25. Fremgangsmåte ifølge krav 23 eller 24, hvor organismen er en plante eller alge.
26. Anvendelse av sammensetningen ifølge hvilket som helst av kravene 1-20 i *ex vivo*-gen eller genomredigering, hvor anvendelsen ikke omfatter en fremgangsmåte for å modifisere den genetiske kimmelledinje-identiteten til et menneske.