(12) **Translation of European patent specification**

(11) **NO/EP 2912175 B1**

NORWAY

(19) NO

(51) Int Cl.

C12N 15/11 (2006.01)
C12N 9/16 (2006.01)
C12N 9/22 (2006.01)
C12N 15/10 (2006.01)
C12N 15/52 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
C12N 15/82 (2006.01)
C12N 15/90 (2006.01)

Norwegian Industrial Property Office

(21)	Translation Published	2018.10.22
(80)	Date of The European Patent Office Publication of the Granted Patent	2018.08.22
(86)	European Application Nr.	13849670.8
(86)	European Filing Date	2013.10.23
(87)	The European Application's Publication Date	2015.09.02
(30)	Priority	2012.10.23, US, 201261717324 P 2013.03.20, US, 201361803599 P 2013.06.20, US, 201361837481 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	Toolgen Incorporated, 1204, Byucksan Digital Valley 6-cha, 219 Gasan Digital 1-ro Geumcheon-gu, Seoul 08501, Sør-Korea
(72)	Inventor	KIM, Jin-Soo, 103-70278,Cheongnyong-gilGwanak-guGwanak-gu, Seoul 08831, Sør-Korea CHO, Seung Woo, 1155 Clark Way, Palo AltoCalifornia 94304, USA KIM, Sojung, 129-1101387,Gajeong-roSeo-gu, Incheon 22778, Sør-Korea KIM, Jong Min, 27,Dongguk-rolIsandong-guGoyang-si, Gyeonggi-do 10326, Sør-Korea KIM, Seokjoong, apt.501-181230,Seocho-daero 74-gilSeocho-gu, Seoul 06622, Sør-Korea
(74)	Agent or Attorney	BRYN AARFLOT AS, Stortingsgata 8, 0161 OSLO, Norge

(54) Title **COMPOSITION FOR CLEAVING A TARGET DNA COMPRISING A GUIDE RNA SPECIFIC FOR THE TARGET DNA AND CAS PROTEIN-ENCODING NUCLEIC ACID OR CAS PROTEIN, AND USE THEREOF**

(56) References

Cited:

US-A1- 2010 076 057, O'NEILL T E ET AL: "Nucleosome arrays inhibit both initiation and elongation of transcripts by bacteriophage T7 RNA polymerase", JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, ACADEMIC PRESS, UNITED KINGDOM, vol. 223, no. 1, 5 January 1992 (1992-01-05), pages 67-78, XP024018312, ISSN: 0022-2836, DOI: 10.1016/0022-2836(92)90716-W [retrieved on 1992-01-05], HOCINE SAMI ET AL: "RNA processing and export.", COLD SPRING HARBOR PERSPECTIVES IN BIOLOGY DEC 2010, vol. 2, no. 12, December 2010 (2010-12), page a000752, ISSN: 1943-0264, WO-A2-2014/093661, 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), XP055067747, US ISSN: 0036-8075, DOI: 10.1126/science.1225829, S. KOSUGI ET AL: "Six Classes of Nuclear Localization Signals Specific to Different Binding Grooves of Importin", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 284, no. 1, 2 January 2009 (2009-01-02), pages 478-485, XP055267734, ISSN: 0021-9258, DOI: 10.1074/jbc.M807017200, T JENUWEIN ET AL: "The immunoglobulin mu enhancer core establishes local factor access in nuclear chromatin independent of transcriptional stimulation.", GENES AND DEVELOPMENT., vol. 7, no. 10, 1 October 1993 (1993-10-01), pages 2016-2032, XP055336949, US ISSN: 0890-9369, DOI: 10.1101/gad.7.10.2016, WO-A1-2014/089290, 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], HWANG, WOONG Y. ET AL.: 'Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system' NATURE BIOTECHNOLOGY vol. 31, no. 3, 29 January 2013, pages 1 - 3, XP055086625, MARTA MASTROIANNI ET AL: "Group II Intron-Based Gene Targeting Reactions in Eukaryotes", PLOS ONE, vol. 3, no. 9, 1 September 2008 (2008-09-01), page e3121, XP055149290, DOI: 10.1371/journal.pone.0003121, WO-A1-2013/176772, WO-A2-2014/093655, 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 -& 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, XP055153369, ISSN: 0036-8075, DOI: 10.1126/science.1232033, SEUNG WOO CHO ET AL: "Targeted genome engineering in human cells with the Cas9 RNA-guided endonuclease", NATURE BIOTECHNOLOGY, NATURE PUBLISHING GROUP, US, vol. 31, no. 3, 29 January 2013 (2013-01-29), pages 230-232, XP002699850, ISSN: 1087-0156, DOI: 10.1038/NBT.2507 [retrieved on 2013-01-29], MALI, PRASHANT ET AL.: 'RNA-guided human genome engineering via Cas9' SCIENCE vol. 339, no. 6121, 15 February 2013, pages 823 - 826, XP055161524, SHENG ZHI ET AL: "Nuclear and nucleolar localization of 18-kDa fibroblast growth factor-2 is controlled by C-terminal signals", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 279, no. 38, 17 September 2004 (2004-09-17), pages 40153-40160, ISSN: 0021-9258, BROTHERS SHAUN P ET AL: "Unexpected effects of epitope and chimeric tags on gonadotropin-releasing hormone receptors: Implications for understanding the molecular etiology of hypogonadotropic hypogonadism.", JOURNAL OF CLINICAL ENDOCRINOLOGY & METABOLISM, vol. 88, no. 12, December 2003 (2003-12), pages 6107-6112, ISSN: 0021-972X, MCCALL K ET AL: "Probes for chromatin accessibility in the Drosophila bitborax complex respond differently to POLYCOMB-mediated repression", TRENDS IN GENETICS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V. AMSTERDAM, NL, vol. 12, no. 4, 1 April 1996 (1996-04-01), page 133, XP004037251, ISSN: 0168-9525, US-A- 5 767 367, GASIUNAS, GIEDRIUS ET AL.: 'Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria' PNAS vol. 109, no. 39, 04 September 2012, pages 2579 - 2586, XP055068588, W. FUJII ET AL: "Efficient generation of large-scale genome-modified mice using gRNA and CAS9 endonuclease", NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 41, no. 20, 30 August 2013 (2013-08-30), pages e187-e187, XP055270998, ISSN: 0305-1048, DOI: 10.1093/nar/gkt772, WO-A1-2010/076939, 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, HSU, PATRICK D. ET AL.: 'DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases' NATURE BIOTECHNOLOGY vol. 31, no. 9, 21 July 2013, pages 827 - 834, XP002718604, TURNER J R ET AL: "Carboxyl-terminal vesicular Stomatitis Virus G Protein-taged Intestinal Na+-dependent Glucose Cotransporter (SGLT1)", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY FOR BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY, US,

vol. 271, no. 13, 29 March 1996 (1996-03-29), pages 7738-7744, XP002975876, ISSN: 0021-9258, DOI: 10.1074/JBC.271.13.7738, US-A- 5 766 900, 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, NANNAN CHANG ET AL: "Genome editing with RNA-guided Cas9 nuclease in Zebrafish embryos", CELL RESEARCH - XIBAO YANJIU, vol. 23, no. 4, 26 March 2013 (2013-03-26) , pages 465-472, XP055251146, GB, CN ISSN: 1001-0602, DOI: 10.1038/cr.2013.45, CHO, SEUNG WOO ET AL.: 'Targeted genome engineering in human cells with the Cas9 RNA-guided endonuclease' NATURE BIOTECHNOLOGY vol. 31, no. 3, 29 January 2013, pages 230 - 232, XP002699850

Patentkrav

1. Type II Clustered Regularly interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR)/CRISPR-assosiert protein 9 (Cas9)-system for innføring av dobbeltstrengede brudd inn i en mål-DNA-sekvens i en pattedyrcelle, hvor Type II CRISPR/Cas9-systemet omfatter:

a. et Cas9-protein med et nukleært lokaliseringssignal (NLS), hvor NLS er ved C-terminalen, eller en nukleinsyre som koder for Cas9-proteinet; og

b. et enkelkjede-guide RNA omfattende en CRISPR RNA (crRNA)-del fusjonert til en trans-aktiverende crRNA (tracrRNA)-del.

2. Type II CRISPR/Cas9-system ifølge krav 1, hvor Cas9-proteinet er fra *Streptococcus pyogenes.*

3. Type II CRISPR/Cas9-system ifølge krav 1 eller 2, hvor enkeltkjede-guide RNA-et er et *in vitro*-transkribert RNA.

4. Type II CRISPR/Cas9-system ifølge et hvilket som helst av kravene 1-3, hvor mål-DNA-sekvensen er en genomisk sekvens lokalisert på sitt endogene sted i genomet til pattedyrcellen.

5. Type II CRISPR/Cas9-system ifølge et hvilket som helst av kravene 1-4, hvor pattedyrcellen er en human celle.

6. Type II CRISPR/Cas9-system ifølge et hvilket som helst av kravene 1-5, hvor nukleinsyren som koder for Cas9-proteinet er kodonoptimalisert for ekspresjon i humane celler.

7. Type II CRISPR/Cas9-system ifølge et hvilket som helst av kravene 1-6, hvor mål-DNA-sekvensen består av 20 nukleotider komplementære til crRNA-delen av enkelkjede-guide RNA-et og et trinukleotidprotospacer tilstøtende motiv (protospacer adjacent motif, PAM), og hvor PAM-et består av trinukleotidet 5'-NGG-3'.

8. Type II CRISPR/Cas9-system som definert i et hvilket som helst av kravene 1-7 for anvendelse ved spalting av et mål-DNA i en pattedyrcelle.

9. Type II CRISPR/Cas9-system som definert i et hvilket som helst av kravene 1-7 for anvendelse i genterapi.

10. *In vitro*-fremgangsmåte for å innføre et stedsspesifikt, dobbeltstrenget brudd ved en mål-DNA-sekvens inn i en pattedyrcelle, hvor fremgangsmåten omfatter å innføre Type II CRISPR/Cas9-systemet ifølge et hvilket som helst av kravene 1-7 inn i pattedyrcellen.

11. *In vitro*-fremgangsmåte for å innføre et stedsspesifikt, dobbeltstrenget brudd ved en mål-DNA-sekvens inn i en pattedyrcelle, hvor fremgangsmåten omfatter å innføre inn i pattedyrcellen:

a. et Cas9-protein med et nukleært lokaliseringssignal (NLS), hvor NLS er ved C-terminalen, eller en nukleinsyre som koder for Cas9-proteinet; og

b. et enkelkjede-guide RNA omfattende en CRISPR RNA (crRNA)-del fusjonert til en transaktiverende crRNA (tracrRNA)-del.

12. Fremgangsmåte ifølge krav 11, hvor nukleinsyren som koder for Cas9-proteinet blir innført inn i pattedyrcellen før innføring av enkelkjede-guide-RNA-et inn i pattedyrcellen.

13. Fremgangsmåte ifølge krav 10, 11 eller 12, hvor pattedyrcellen er en human celle.