



(12) Translation of
European patent specification

(11) NO/EP 2921557 B1

NORWAY

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

Norwegian Industrial Property Office

(21)	Translation Published	2016.11.21
(80)	Date of The European Patent Office Publication of the Granted Patent	2016.07.13
(86)	European Application Nr.	15154566.2
(86)	European Filing Date	2013.12.12
(87)	The European Application's Publication Date	2015.09.23
(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, 201361836127 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
(62)	Divided application	EP2771468, med inndato 2013.12.12
(73)	Proprietor	The Broad Institute, Inc., 7 Cambridge Center, Cambridge, MA 02142, US-USA Massachusetts Institute of Technology, 77 Massachusetts Avenue, Cambridge, MA 02142-1324, US-USA President and Fellows of Harvard College, 17 Quincy Street, Cambridge, MA 02138-3876, US-USA
(72)	Inventor	Zhang, Feng, 100 Pacific StreetApt. 11, Cambridge, MA 02139, US-USA Cong, Le, 100 Memorial DriveApt 8-21B, Cambridge, MA 02142, US-USA Hsu, Patrick, 37 Kirkland StreetApt. B1, Cambridge, MA 02138, US-USA Ran, Fei, 30 Clarendon St, Boston, MA 02116, US-USA
(74)	Agent or Attorney	Tandbergs Patentkontor AS, Postboks 1570 Vika, 0118 OSLO, Norge

(54)	Title	Engineering of systems, methods and optimized guide compositions for sequence manipulation
(56)	References Cited:	US-A1- 2010 076 057 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

- 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
- WOONG Y HWANG ET AL: "Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system", NATURE BIOTECHNOLOGY, vol. 31, no. 3, 29 January 2013 (2013-01-29), pages 227-229, XP055086625, ISSN: 1087-0156, DOI: 10.1038/nbt.2501
- 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,
- 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
- 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
- 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
- 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

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. Et konstruert, ikke-naturlig forekommende klustret regelmessig innfelt kort palindromisk gjentak (CRISPR)-CRISPR-assosiert (Cas) (CRISPR-Cas)-vektorsystem som omfatter én eller flere vektorer som omfatter:

- a) et første regulerende element som er operativt bundet til to eller flere nukleotidsekvenser som hver koder for et CRISPR-Cas-system guide-RNA omfattende en polynukleotidsekvens som omfatter en guidesekvens, en tracr-RNA, og en tracr-makesekvens, hvor hver guide-RNA hybridiserer med en forskjellig målsekvens i polynukleotid loci i en eukaryot celle,
- b) et andre regulatorisk element som er operativt bundet til en nukleotidsekvens som koder for en type II Cas9-protein,

hvor komponentene (a) og (b) ligger på samme eller forskjellige vektorer i systemet, hvor systemet videre omfatter én eller flere nukleære lokaliseringssignal(er) (NLS) uttrykt ved nukleotid sekvensen som koder for Cas9-proteinet, og hvorved to eller flere guide-RNA målrettes mot polynukleotid loci i den eukaryote celle, og Cas9-proteinet spalter polynukleotid loci, hvorved sekvensen av polynukleotid loci modifiseres.

2. Et konstruert, ikke-naturlig forekommende Type II CRISPR-Cas-vektorsystem ifølge krav 1,

hvor Cas9-proteinet er mutert i forhold til et tilsvarende villtype Cas9-protein slik at det muterte proteinet er en nickase som mangler evnen til å spalte én tråd av et mål-polynukleotid,

hvorved de to eller flere guide-RNA målrettes mot polynukleotid loci i en eukaryot celle, og hvor Cas9-proteinet bare spalter én tråd av det polynukleotid loci, hvorved sekvensen av polynukleotid loci modifiseres.

3. System ifølge krav 2, hvor Cas9-proteinet omfatter én eller flere mutasjoner i RuvC I-, RuvC II- eller RuvC III-katalytiske domener.

4. System ifølge krav 2, hvor Cas9-proteinet omfatter en mutasjon valgt fra gruppen bestående av D10A, H840A, N854A og N863A med henvisning til posisjonsnummereringen til et *Streptococcus pyogenes* Cas9-(SpCas9)-protein.

5. System ifølge hvilket som helst av de foregående krav, hvor CRISPR-Cas-systemet omfatter to eller flere nukleære lokaliseringssignaler uttrykt ved nukleotid-sekvensen som koder for Cas9-proteinet.
6. System ifølge krav 5, hvor minst én NLS er ved eller nær amino-terminus til Cas9-proteinet og/eller minst én NLS er ved eller nær karboksy-terminus til Cas9-proteinet.
7. System ifølge krav 6, hvor minst én NLS er ved eller nær amino-terminus til Cas9 og minst én NLS er ved eller nær karboksy-terminus til Cas9-proteinet.
8. System ifølge et hvilket som helst av de foregående krav, hvor minst én av de nevnte guide-RNA omfatter en guidesekvens som er fusjonert med en trans-aktiverende cr (tracr)-sekvens.
9. System ifølge hvilket som helst av de foregående krav, hvor minst en av de nevnte guide-RNA er et kimært RNA som omfatter guidesekvensen, tracr-sekvensen og en tracr make-sekvens.
10. System ifølge et hvilket som helst av kravene 1-7, hvor komponent (a) omfatter det første reguleringsselement operativt koblet til et polynukleotid som omfatter en første tracr make-sekvens, en første guide-RNA, en andre tracr make-sekvens og en andre guide-RNA.
11. System ifølge et hvilket som helst av de foregående krav, hvor den eukaryote cellen er en pattedyr-celle eller en human celle.
12. System ifølge et hvilket som helst av de foregående krav, hvor nukleotidsekvensen som koder for Cas9-proteinet kodon-optimaliseres for ekspresjon i en eukaryot celle.
13. System ifølge et hvilket som helst av de foregående krav, hvor vektorene er virale vektorer.
14. System ifølge krav 13, hvor de virale vektorene omfatter retrovirale, lentivirale, adenovirale, adeno-assosierte eller herpes simplex-virale vektorer.
15. System ifølge hvilket som helst av de foregående krav, hvor minst en av de nevnte guide-RNA innbefatter en tracr-sekvens som omfatter 50 eller flere nukleotider i lengde.

16. System ifølge hvilket som helst av de foregående krav, hvor komponentene (a) og (b) er komponenter av den samme vektoren.

17. System ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 15, hvor komponentene (a) og (b) er på forskjellige vektorer.

18. Anvendelse av systemet ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 17, for gensløyd, forutsatt at anvendelsen ikke omfatter en prosess for å endre den stamcelle genetiske identiteten til mennesker, og forutsatt at nevnte anvendelse ikke er en metode for behandling av menneske- eller dyrekroppen ved kirurgi eller terapi.

19. Anvendelse ifølge krav 18, hvor den videre anvendelse omfatter reparasjon av nevnte spaltede målpolynukleotid ved homolog rekombinasjon med et eksogent målpolynukleotid, hvor nevnte reparasjon resulterer i en mutasjon som omfatter en innføring, delesjon eller substitusjon av en eller flere nukleotider i nevnte målpolynukleotid.

20. Anvendelse av systemet ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 17, ved fremstilling av et ikke-humant transgent dyr eller en transgen plante.