



(12) Translation of
European patent specification

(11) NO/EP 2928496 B1

NORWAY

(19) NO
(51) Int Cl.
C12N 15/10 (2006.01)
C12N 9/22 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)

Norwegian Industrial Property Office

(45)	Translation Published	2020.02.03
(80)	Date of The European Patent Office Publication of the Granted Patent	2019.10.09
(86)	European Application Nr.	13859964.2
(86)	European Filing Date	2013.12.05
(87)	The European Application's Publication Date	2015.10.14
(30)	Priority	2012.12.06, US, 201261734256 P 2013.02.05, US, 201361761046 P 2013.01.30, US, 201361758624 P 2013.03.15, US, 201361794422 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	Sigma-Aldrich Co. LLC, 3050 Spruce Street, St. Louis, MO 63103, USA
(72)	Inventor	CHEN, Fuqiang, 3050 Spruce Street, St. Louis, Missouri 63103, USA DAVIS, Gregory D., 3050 Spruce Street, St. Louis, Missouri 63103, USA KANG, Qiaohua, 3050 Spruce Street, St. Louis, Missouri 63103, USA KNIGHT, Scott W., 3050 Spruce Street, St. Louis, Missouri 63103, USA
(74)	Agent or Attorney	BRYN AARFLOT AS, Stortingsgata 8, 0161 OSLO, Norge

(54)	Title	CRISPR-BASED GENOME MODIFICATION AND REGULATION
(56)	References Cited:	WO-A1-2011/146121, US-A1- 2012 192 298, US-A1- 2011 217 739, US-A1- 2010 076 057, US-A1- 2010 055 728, WO-A1-2012/012738, WO-A2-2014/093655, WO-A1-2014/099744, WO-A1-2014/065596, WO-A1-2013/176772, WO-A1-2013/142578, WO-A2-2014/099750 JINEK ET AL.: 'A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity' SCIENCE vol. 337, 17 August 2012, pages 816 - 820, XP055229606 GASIUNAS ET AL.: 'Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria.' PNAS vol. 109, no. 39, 04 September 2012, pages E2579 - E2586, XP055068588 I. FONFARA ET AL: "Creating highly specific nucleases by fusion of active restriction endonucleases and catalytically inactive homing endonucleases", NUCLEIC ACIDS RESEARCH, 29 September 2011 (2011-09-29), XP055012639, ISSN: 0305-1048, DOI: 10.1093/nar/gkr788 H. KATADA ET AL: "Chemical and biological approaches to improve the efficiency of

homologous recombination in human cells mediated by artificial restriction DNA cutter", NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 40, no. 11, 1 June 2012 (2012-06-01), pages e81-e81, XP055294090, GB ISSN: 0305-1048, DOI: 10.1093/nar/gks185

SANTIAGO YOLANDA ET AL: "Targeted gene knockout in mammalian cells by using engineered zinc-finger nucleases", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, US, vol. 105, no. 15, 15 April 2008 (2008-04-15), pages 5809-5814, XP009143037, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/PNAS.0800940105

E. KIM ET AL: "Precision genome engineering with programmable DNA-nicking enzymes", GENOME RESEARCH, vol. 22, no. 7, 20 April 2012 (2012-04-20), pages 1327-1333, XP055106309, ISSN: 1088-9051, DOI: 10.1101/gr.138792.112

MICHELLE CHRISTIAN ET AL: "Targeting DNA Double-Strand Breaks with TAL Effector Nucleases (plus supporting information)", GENETICS, GENETICS SOCIETY OF AMERICA, AUSTIN, TX, US, vol. 186, no. 2, 1 October 2010 (2010-10-01), pages 757-761, 1SI, XP002632806, ISSN: 0016-6731, DOI: 10.1534/GENETICS.110.120717 [retrieved on 2010-07-26]

LEI S. QI ET AL: "Repurposing CRISPR as an RNA-Guided Platform for Sequence-Specific Control of Gene Expression", CELL, vol. 152, no. 5, 1 February 2013 (2013-02-01), pages 1173-1183, XP055299671, US ISSN: 0092-8674, DOI: 10.1016/j.cell.2013.02.022

HAFT D H ET AL: "A guild of 45 CRISPR-associated (Cas) protein families and multiple CRISPR/Cas subtypes exist in prokaryotic genomes", PLOS COMPUTATIONAL BIOLOGY, PUBLIC LIBRARY OF SCIENCE, US, vol. 1, no. 6, 1 November 2005 (2005-11-01), pages e60-0474, XP002574577, ISSN: 1553-734X, DOI: 10.1371/JOURNAL.PCBI.0010060.EOR [retrieved on 2005-10-06]

KIRA S MAKAROVA ET AL: "Unification of Cas protein families and a simple scenario for the origin and evolution of CRISPR-Cas systems", BIOLOGY DIRECT, BIOMED CENTRAL LTD, LO, vol. 6, no. 1, 14 July 2011 (2011-07-14), page 38, XP021105829, ISSN: 1745-6150, DOI: 10.1186/1745-6150-6-38

MAKAROVA KIRA S ET AL: "Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems", NATURE REVIEWS. MICROBIOLOGY, NATURE PUBLISHING GROUP, GB, vol. 9, no. 6, 1 June 2011 (2011-06-01), pages 467-477, XP009155547, ISSN: 1740-1526, DOI: 10.1038/NRMICRO2577

DANA CARROLL: "A CRISPR Approach to Gene Targeting", MOLECULAR THERAPY, vol. 20, no. 9, 1 September 2012 (2012-09-01), pages 1658-1660, XP055106489, ISSN: 1525-0016, DOI: 10.1038/mt.2012.171

JINEK ET AL.: "RNA-programmed genome editing in human cells" ELIFE vol. 2, no. E00471, 29 January 2013, pages 1 - 9, XP055245475

R. SAPRANAUSKAS ET AL: "The Streptococcus thermophilus CRISPR/Cas system provides immunity in Escherichia coli", NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 39, no. 21, 3 August 2011 (2011-08-03), pages 9275-9282, XP055265024, GB ISSN: 0305-1048, DOI: 10.1093/nar/gkr606

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. Protein-RNA-kompleks omfattende

a) guide-RNA omfattende

- i. første region komplementær med et målsete i en kromosomal sekvens som kan basepares med målsetet
- ii. andre region som danner en stamme- og løkkestruktur, og
- iii. tredje region som i det vesentlige er enkeltstrenget, hvori i, ii og iii er anordnet i 5'- til 3'-retningen, og

b) en endonuklease som er et CRISPR/Cas9-protein av type 2 omfattende minst ett

10 kjernelokaliseringssignal, og som er modifisert til å mangle minst ett funksjonelt nukleasedomene,

hvori komplekset er dannet av guide-RNA-et som interagerer med CRISPR/Cas9-protein av type 2,

15 hvori guide-RNA-et interagerer med CRISPR/Cas9-proteinet av type 2 for å lede proteinet til målsetet.

2. Protein-RNA-komplekset ifølge krav 1, hvori guide-RNA-et omfatter to separate molekyler.

3. Protein-RNA-komplekset ifølge krav 2, hvori det første molekylet av guide-RNA-et omfatter den første regionen av guide-RNA-et og halvparten av stammen i den andre regionen av guide-RNA-et.

4. Protein-RNA-komplekset ifølge krav 2, hvori det andre molekylet av guide-RNA-et omfatter den andre halvparten av stammen av den andre regionen av guide-RNA-et og den tredje regionen av guide-RNA-et.

5. Protein-RNA-komplekset ifølge et hvilket som helst av kravene 1-4, hvori endonukleasen videre omfatter et celleinntrengende domene, et markørdomene eller begge deler.

6. Protein-RNA-komplekset ifølge krav 1 eller krav 5, hvori guide-RNA-et er et enkelt molekyl omfattende en 5'-region som er komplementært med et målsete.

7. Protein-RNA-komplekset ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 6, hvori målsetet i den kromosomale sekvensen er et Rosa26-lokus, et HPRT-lokus eller et AAVS1-lokus.

8. Protein-RNA-komplekset ifølge et hvilket som helst foregående krav, hvori målsetet i den kromosomale sekvensen umiddelbart etterfølges av et protospacertilstøtende motiv (PAM).

9. Protein-RNA-komplekset ifølge et hvilket som helst foregående krav, hvori CRISPR/Cas9-proteinet av type 2 avledes fra en *Streptococcus*-art.

10. Protein-RNA-komplekset ifølge et hvilket som helst foregående krav, hvori CRISPR/Cas9-proteinet av type 2 avledes fra *Streptococcus pyogenes*.

5 11. Protein-RNA-komplekset ifølge et hvilket som helst foregående krav, hvori CRISPR/Cas9-proteinet av type 2 omfatter en mutasjon i RuvC- og/eller HNH-domenet.

12. Protein-RNA-komplekset ifølge krav 11, hvori CRISPR/Cas9-proteinet av type 2 omfatter (i) en D10A-mutasjon i RuvC-domenet, og/eller (ii) en H840A- eller H839A-mutasjon i HNH-domenet.

10 13. Isolert nukleinsyre som koder for protein-RNA-komplekset ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 12.

14. Den isolerte nukleinsyren ifølge krav 13, hvori nukleinsyresekvensen som koder for endonukleasen kodonoptimaliseres for translasjon i pattedyrceller.

15 15. Den isolerte nukleinsyren ifølge krav 13 eller 14, hvori nukleinsyresekvensen som koder for endonukleasen kodonoptimaliseres for translasjon i menneskeceller.

16. Den isolerte nukleinsyren ifølge et hvilket som helst av kravene 13 til 15, hvori nukleinsyresekvensen som koder for endonukleasen er operativt bundet til en promotorkontrollsekvens.

20 17. Den isolerte nukleinsyren ifølge et hvilket som helst av kravene 13 til 16, hvori nukleinsyresekvensen som koder for guide-RNA-et er operativt bundet til en promotorkontrollsekvens.

18. Vektor omfattende den isolerte nukleinsyren ifølge krav 16 eller krav 17.

25 19. Ex vivo eller in vitro vertscelle omfattende protein-RNA-komplekset ifølge et hvilket som helst av kravene 1-12, den isolerte nukleinsyren ifølge et hvilket som helst av kravene 13-17, eller vektoren ifølge krav 18, hvori vertscellen ikke er en human kimcellebane eller et menneskeembryo.

20. Fremgangsmåte for å modifisere en kromosomal sekvens i en eukaryotisk celle eller ikke-humant embryo, fremgangsmåten omfattende:

30 a) innføre i den eukaryotiske cellen eller embryoet (i) protein-RNA-komplekset ifølge et hvilket som helst av kravene 1-12, den isolerte nukleinsyren ifølge et hvilket som helst av kravene 13-17, eller vektoren ifølge krav 18 og eventuelt (ii) minst ett donorpoly nukleotid; og

b) dyrke den eukaryote cellen eller embryoet slik at hver guide-RNA leder endonukleasen til målsetet i den kromosomale sekvensen der endonukleasen innfører et

dobbelstrenget brudd i målsetet, og det dobbeltstrengede bruddet repareres av en DNA-reparasjonsprosess slik at den kromosomale sekvensen modifiseres, hvori

fremgangsmåten ikke omfatter en prosess for å modifisere den genetiske identiteten til kimbanen til et menneske, og hvori

5 fremgangsmåten ikke omfatter en fremgangsmåte for behandling av menneske- eller dyrekroppen ved kirurgi eller behandling.

21. Fremgangsmåten ifølge krav 20, hvori den eukaryote cellen er en human celle, en ikke-human pattedyrceile, en stamcelle, en ikke-pattedyrvirveldyrceile, en hvirvelløs celle, en plantecelle eller en enkeltcelleeukaryotisk organisme.

10 22. Fremgangsmåten ifølge krav 20 eller krav 21, hvori embryoet er et ikke-humant embryo fra et encellet dyr.

23. Fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av kravene 20 til 22, hvori den eukaryote cellen er in vitro.