



(12) Translation of
European patent specification

(11) NO/EP 2931897 B1

NORWAY

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

Norwegian Industrial Property Office

(21)	Translation Published	2018.04.09
(80)	Date of The European Patent Office Publication of the Granted Patent	2017.11.01
(86)	European Application Nr.	13814362.3
(86)	European Filing Date	2013.12.12
(87)	The European Application's Publication Date	2015.10.21
(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, 201361836123 P 2013.07.17, US, 201361847537 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 StreetApt.11, Cambridge, MA 02139, US-USA HEIDENREICH, Matthias, 53 Chester Street, Somerville, MA 02144, US-USA RAN, Fei, 30 Claredon Street, Boston, MA 02116, US-USA SWIECH, Lukasz, 6 Greenwich StreetApt. 3, Boston, MA 02120, US-USA
(74)	Agent or Attorney	TANDBERG INNOVATION AS, Postboks 1570 Vika, 0118 OSLO, Norge

(54) Title **DELIVERY, ENGINEERING AND OPTIMIZATION OF SYSTEMS, METHODS AND
COMPOSITIONS FOR SEQUENCE MANIPULATION AND THERAPEUTIC APPLICATIONS**

(56) References

Cited:

WO-A1-2013/176772, 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: "SupplementaryMaterial 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 (SupplementaryMaterial)", 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, 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, MICHAEL P TERNES 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, 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

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. Sammensetning omfattende et CRISPR-kompleks, omfattende
 - a) en tracr-mate-RNA-polynukleotid,
 - b) en tracr-RNA-polynukleotid,
 - c) en guide-RNA-polynukleotid i stand til å hybridisere til en målsekvens i en
- 10 eukaryot celle eller en celle i en flercellet eukaryot organisme; og
- d) et Cas9-protein omfattende én eller flere kjernelokaliseringssekvenser, for bruk i terapi.
-
2. Sammensetning for bruk ifølge krav 1, hvor CRISPR-komplekset er tilveiebragt
- 15 av et CRISPR-system som omfatter:
- I. en CRISPR-polynukleotidsekvens, hvor polynukleotidsekvensen koder eller omfatter:
 - (a) en guide-RNA-polynukleotid i stand til å hybridisere til en
- målsekvens i en eukaryot celle eller en celle i en flercellet eukaryot organisme,
- (b) en tracr-mate-RNA-polynukleotid, og
- 20 (c) en tracr-RNA-polynukleotid, og
- II. en polynukleotidsekvens som koder Cas9-proteinet
- hvor, når den blir transkribert, tracr-mate-sekvensen hybridiserer til tracr-sekvensen og guidesekvensen leder sekvens-spesifikk binding av et CRISPR-kompleks til
- 25 målsekvensen, og hvor CRISPR-komplekset omfatter Cas9-proteinet kompleksert med
- (1) guide-RNA-polynukleotiden som er i stand til å hybridisere til målsekvensen, og
 - (2) tracr-mate-RNA-polynukleotiden som er hybridisert til tracr-RNA-polynukleotiden, og polynukleotidsekvensen som koder et Cas9-protein er DNA eller RNA.
- 30
3. Sammensetning for bruk ifølge krav 1, hvor CRISPR-komplekset er tilveiebragt av et CRISPR-system som omfatter:

I. polynukleotider, omfattende:

(a) en guide-RNA-polynukleotid i stand til å hybridisere til en målsekvens i en eukaryot celle eller en celle i en flercellet eukaryot organism, og

(b) minst én eller flere tracr-mate-RNA-polynukleotider,

5 II. en polynukleotidsekvens som koder Cas9-proteinet, og

III. en polynukleotidsekvens omfattende en tracr-RNA-polynukleotid,

hvor, når den blir transkribert, tracr-mate-RNA-polynukleotiden hybridiserer til tracr-RNA-polynukleotiden og guide-RNA-polynukleotiden leder sekvens-spesifikk binding av et CRISPR-kompleks til målsekvensen, og hvor CRISPR-komplekset omfatter

10 Cas9-proteinet kompleksert med (1) guide-RNA-polynukleotiden som er i stand til å hybridisere til målsekvensen, og (2) tracr-mate-RNA-polynukleotiden som er hybridisert til tracr-RNA-polynukleotiden, og polynukleotidsekvensen som koder et Cas9-protein er DNA eller RNA.

15 4. Sammensetning for bruk ifølge krav 1, hvor CRISPR-komplekset er tilveiebragt av et CRISPR-system som omfatter: ett eller flere regulatoriske elementer, én eller flere nukleotidsekvenser som hver koder guide RNA-polynukleotid, tracr-mate-RNA-polynukleotid og tracr-RNA-polynukleotid og/eller Cas9-proteinet, hvor det ene eller de flere regulatoriske elementene driver ekspresjon eller transkripsjon av

20 nukleotidsekvensene, og guide-RNA-polynukleotiden, tracr-mate-RNA-polynukleotiden og tracr-RNA-polynukleotiden leder sekvens-spesifikk binding av et CRISPR-kompleks til målsekvensen i en eukaryot celle eller en celle i en flercellet eukaryot organisme, hvor CRISPR-komplekset omfatter Cas9-proteinet kompleksert med (1) guide-RNA-polynukleotiden som er i stand til å hybridisere til målsekvensen,

25 og (2) tracr-mate-RNA-polynukleotiden som er hybridisert til tracr-RNA-polynukleotiden, hvor et CRISPR-kompleks er tilveiebragt og systemet, når det ikke blir forsynt av nukleotidsekvensene som ekspresseres eller transkriberes, inkluderer én eller flere guide-RNA og/eller Cas9-proteiner.

30 5. Sammensetning for bruk ifølge krav 1 eller 2, hvor CRISPR-komplekset er tilveiebragt av et CRISPR-system som omfatter: én eller flere guide-RNA-

polynukleotider, tracr-mate-RNA-polynukleotid og tracr-RNA-polynukleotid og Cas9-protein, hvor guide-RNA'en leder sekvens-spesifikk binding av et CRISPR-kompleks til målsekvensen i en eukaryot celle eller en celle i en flercellet eukaryot organisme, hvor CRISPR-komplekset omfatter Cas9-proteinet kompleksert med (1) guide-RNA-polynukleotiden som er i stand til å hybridisere til målsekvensen, og (2) tracr-mate-RNA-polynukleotiden som er hybridisert til tracr-RNA-polynukleotiden.

6. Sammensetning for bruk ifølge et hvilket som helst av kravene 1-5, hvor CRISPR-systemet er omfattet i et vektorsystem omfattende én eller flere vektorer.

7. Sammensetning for bruk ifølge krav 2, hvor I og II er beliggende på samme vektor.

8. Sammensetning for bruk ifølge krav 3, hvor I, II, og III er beliggende på samme vektor.

9. Sammensetning for bruk ifølge krav 4, hvor nukleotidsekvensene er beliggende på samme vektor.

10. Sammensetning for bruk ifølge et hvilket som helst av kravene 6-9, hvor den ene eller de flere vektorene omfatter én eller flere virale vektorer.

11. Sammensetning for bruk ifølge krav 10, hvor det ene eller de flere virale vektorene omfatter én eller flere lentivirale, bakulovirale, adenovirale eller adeno-assosierte virale (AAV-) vektorer.

12. Sammensetning for bruk ifølge krav 11, hvor AAV-vektoren(e) omfatter AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV8 eller AAV9, eller en hvilken som helst kombinasjon av disse.

13. Sammensetning for bruk ifølge krav 11 eller krav 12, hvor AAV-vektoren(e) omfatter AAV-serotyper 1, 2, 5 eller et hybrid eller kapsid AAV1, AAV2, AAV5, eller en hvilken som helst kombinasjon av disse for målretting mot hjerne- eller nevronale celler.

5

14. Sammensetning for bruk ifølge krav 11 eller krav 12, hvor AAV-vektoren(e) omfatter AAV4 for målretting mot hjertevev.

15. Sammensetning for bruk ifølge krav 11 eller krav 12, hvor AAV-vektoren(e) omfatter AAV1, AAV5, AAV6 eller AAV9 for målretting mot lungeepitel.

10

16. Sammensetning for bruk ifølge krav 11 eller krav 12, hvor AAV-vektoren(e) omfatter AAV8 for levering til leveren.

17. Sammensetning for bruk ifølge et hvilket som helst av kravene 6 til 16, hvor vektoren omfatter en promoter for å drive ekspresjon av Cas9-kodende nukleinsyremolekyl, og hvor promoteren er for enten ubikvitær ekspresjon eller vevsspesifikk ekspresjon.

15

18. Sammensetning for bruk ifølge krav 17, hvor promoteren er for ubikvitær ekspresjon og omfatter en CMV-promoter, en CAG-promoter, en CBh-promoter, en PGK-promoter eller en SV40-promoter, eller promoter for Ferritin med tunge eller lette kjeder.

20

19. Sammensetning for bruk ifølge krav 17, hvor promoteren er for vevsspesifikk ekspresjon og som leder ekspresjon i et vev omfattende muskel, nevron, ben, hud, blod, lever, bukspyttkjertel eller lymfocytter.

25

20. Sammensetning for bruk ifølge krav 17, hvor promoteren er for vevsspesifikk ekspresjon og omfatter synapsin I for nevroner, CaMKIIalfa for eksitatoriske nevroner, GAD67 eller GAD65 eller VGAT for GABAerge nevroner, albumin-promoter for

30

leverekspresjon, SP-B for lungeekspresjon, ICAM for endotelceller, IFNbeta eller CD45 for hematopoetiske celler eller OG-2 for osteoblaster.

21. Sammensetning for bruk ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 20, hvor
5 Cas9-proteinet er eller er avledet fra en organisme i en slekt omfattende *Corynebacter*,
Sutterella, *Legionella*, *Treponema*, *Filifactor*, *Eubacterium*, *Streptococcus*,
Lactobacillus, *Mycoplasma*, *Bacteroides*, *Flaviivola*, *Flavobacterium*, *Sphaerochaeta*,
Azospirillum, *Gluconacetobacter*, *Neisseria*, *Roseburia*, *Parvibaculum*,
Staphylococcus, *Nitratifactor*, *Mycoplasma* eller *Campylobacter*.
- 10 22. Sammensetning for bruk ifølge krav 21, hvor Cas9-proteinet er eller er avledet
fra en *Streptococcus pyogenes*, en *Staphylococcus aureus* eller en *Streptococcus*
thermophilus.
- 15 23. Sammensetning for bruk ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 22, hvor
terapien omfatter *ex vivo*-terapi.
24. Sammensetning for bruk ifølge krav 23, hvor *ex vivo*-terapien utføres på
stamceller eller iPS-celler.
- 20 25. Sammensetning for bruk ifølge krav 24, hvor stamcellene er HSC'er
(hematopoetiske stamceller).
26. Sammensetning for bruk ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 25, hvor
25 terapien omfatter behandling eller undertrykkelse av en lidelse forårsaket av en
gendefekt i et genlocus av interesse.
27. Sammensetning for bruk ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 26, hvor
terapien omfatter behandling av: blod- og koagulasjonssykdom eller -lidelse;
30 celledysregulerings- og svulstsykdom eller -lidelse; inflammasjons- og immunrelatert
sykdom eller lidelse; metabolsk, lever-, lunge-, nyre- eller proteinsykdom eller -

lidelse; muskel-/skjelettsykdom eller -lidelse; nevrologisk eller nevronal sykdom eller lidelse; eller øyesykdom eller -lidelse.

28. Sammensetning for bruk ifølge krav 27, hvor blod- og
5 koagulasjonssykdommene og -lidelsene omfatter: anemi; Bare lymfocytt syndrom; blødningslidelse; faktor H og faktor H-liknende 1; faktor V og faktor VIII; faktor VII-mangel; faktor X-mangel; faktor XI-mangel; faktor XII-mangel; faktor XIII A-mangel; faktor XIII B-mangel; Fanconis anemi; hemofagocytisk lymfocytose; hemofili A; hemofili B; hemorragisk lidelse; leukocyt mangel eller -lidelse;
10 sigdcelleanemi eller talassemi.

29. Sammensetning for bruk ifølge krav 27, hvor celledysregulerings- og svulstsykdommene og -lidelsene omfatter: B-celle ikke-Hodgkin lymfom eller leukemi.

15 30. Sammensetning for bruk ifølge krav 27, hvor de inflammasjons- og immunrelaterte sykdommene og lidelsene omfatter AIDS; autoimmun lymfoproliferativt syndrom; kombinert immunsvikt; HIV-1; HIV-mottakelighet eller -infeksjon; immunsvikt; inflammasjon; eller alvorlig kombinert immunsvikt (SCID).

20 31. Sammensetning for bruk ifølge krav 27, hvor de metabolske, lever-, nyre og proteinsykdommene og -lidelsene omfatter: amyloid nevropati; amyloidose; TTR-amyloidose (spesifikt ATTR), cystisk fibrose; glukogenlagringssykdom; hepatisk adenom; hepatisk svikt; nevrologisk lidelse; hepatisk lipase-mangel; hepatoblastom, kreft eller karsinom; medullær cystisk nyresykdom; fenyketonuri; polycystisk nyre;
25 eller hepatisk sykdom.

32. Sammensetning for bruk ifølge krav 27, hvor muskel-/skjelettsykdommene og -lidelsene omfatter: muskeldystrofi; osteoporose; eller muskelatrofi.

30

33. Sammensetning for bruk ifølge krav 27, hvor de nevrologiske og nevronale sykdommene og lidelsene omfatter: ALS; Alzheimers sykdom; autisme; fragilt X syndrom; Huntingtons sykdom og sykdomsliknende lidelser; Parkinsons sykdom; schizofreni; sekretaserelaterte lidelser; trinukleotid repetisjonslidelser; Kennedys sykdom; Friedrichs ataksi; Machado-Josephs sykdom; spinocerebellær ataksi; myotonisk distrofi; Dentatorubral Pallidoluysisk Atrofi-(DRPLA)-sykdom; eller global creb BP-instabilitet.
34. Sammensetning for bruk ifølge krav 27, hvor øyesykdommene og -lidelsene omfatter: aldersrelatert makuladegenerasjon, hornhinne-fordunkling og -dystrofi; cornea plana congenital; glaukom; Lebers congenitale amaurose; retinitis pigmentosa; og/eller makula-dystrofi.
35. Sammensetning for bruk ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 26, hvor terapien omfatter behandling av en postmitotisk lidelse.
36. Sammensetning for bruk ifølge krav 35, hvor den postmitotiske lidelsen omfatter en nevronlidelse.
37. Sammensetning for bruk ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 26, hvor terapien omfatter: behandling av en metabolsk lidelse, amyloidose eller proteinaggregasjonsrelatert sykdom, celleforandring med opphav i genetisk mutasjon eller translokasjon, dominante negative effekter av genmutasjon, eller latent virusinfeksjon, eller målretting mot en kromosomsekvens omfattende SERPINA1 (serpin peptidase-hemmer, klade A (alfa-1 antiproteinase, antitrypsin), element 1).
38. Sammensetning for bruk ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 37, hvor Cas9-proteinet omfatter én eller flere mutasjoner.

39. Sammensetning for bruk ifølge krav 38, hvor den ene eller de flere mutasjonene omfatter én eller flere mutasjoner i et RuvC1-domene av Cas9-proteinet.

40. Sammensetning for bruk ifølge krav 39, hvor Cas9-proteinet omfatter en
5 nickase som leder spalting på lokasjonen til målsekvensen.

41. Sammensetning for bruk ifølge krav 40, hvor Cas9-proteinet innfører dobbeltstrengbrudd ved hjelp av multiplekset nickaseaktivitet.

10 42. Sammensetning for bruk ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 41, hvor CRISPR-systemet omfatter et multiplekset Cas9-system omfattende to eller flere guide-RNA-polynukleotider.

15 43. Sammensetning for bruk ifølge et hvilket som helst av kravene 1-42, hvor Cas9-proteinet har endret nukleaseaktivitet sammenliknet med villtypen Cas9.

44. Sammensetning for bruk ifølge et hvilket som helst av kravene 1-43, hvor Cas9-proteinet omfatter én eller flere heterologe funksjonelle domener eller to eller flere heterologe funksjonelle domener.

20 45. Sammensetning for bruk ifølge krav 44, hvor Cas9-kodingssekvensen koder det ene eller de flere eller de to eller flere heterologe funksjonelle domenene.

25 46. Sammensetning for bruk ifølge kravene 44 eller 45, hvor Cas9-kodingssekvensen koder ett eller flere heterologe funksjonelle domener smeltet til Cas9-proteinet.

47. Sammensetning for bruk ifølge et hvilket som helst av kravene 44 til 46, hvor det eller de funksjonelle domenene er smeltet til Cas9-proteinet.

48. Sammensetning for bruk ifølge et hvilket som helst av kravene 44 til 46, omfattende en linker mellom Cas9-proteinet og domenet.

49. Sammensetning for bruk ifølge et hvilket som helst av kravene 44 til 48, hvor det ene eller de flere funksjonelle domenene har én eller flere av følgende aktiviteter: metylaseaktivitet, demetylaseaktivitet, transkripsjonsaktiveringsaktivitet, transkripsjonsrepresjonsaktivitet, transkripsjonsfrigivelsesfaktoraktivitet, histonmodifikasjonsaktivitet, RNA-spaltningaktivitet, kjernelokaliseringsaktivitet eller nukleinsyrebindingsaktivitet.

10

50. Sammensetning for bruk ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 49, hvor komplekset omfatter en nuklease som leder spalting av én eller begge strengene på lokasjonen til målsekvensen.

15 51. Sammensetning for bruk ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 50, omfattende en rekombinasjonstemplat.