



(12) Translation of
european patent specification

(11) NO/EP 2931898 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.	13814368.0
(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, 201361835936 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 CONG, Le, 100 Memorial DriveApt. 8-21B, Cambridge, MA 02142, US-USA PLATT, Randall, Jeffrey, 72 Sixth Street Apt. 1, Cambridge, MA 02141, US-USA RAN, Fei, 30 Clarendon Street, Boston, MA 02116, US-USA SANJANA, Neville, Espi, 2a Union Terrace, Cambridge, MA 02142, US-USA
(74)	Agent or Attorney	Tandbergs Patentkontor AS, Postboks 1570 Vika, 0118 OSLO, Norge

(54)	Title	ENGINEERING AND OPTIMIZATION OF SYSTEMS, METHODS AND COMPOSITIONS FOR SEQUENCE MANIPULATION WITH FUNCTIONAL DOMAINS
(56)	References Cited:	CONG L ET AL: "Comprehensive interrogation of natural TALE DNA-binding modules and transcriptional repressor domains", NATURE COMMUNICATIONS, NATURE PUBLISHING GROUP, LONDON, UK, vol. 3, 24 July 2012 (2012-07-24), pages 968-1, XP002700145, ISSN: 2041-1723, DOI: 10.1038/NCOMMS1962 SANJANA NEVILLE E ET AL: "A transcription activator-like effector toolbox for genome engineering", 1 January 2012 (2012-01-01), NATURE PROTOCOLS, NATURE PUBLISHING GROUP, GB, PAGE(S) 171 - 192, XP009170390, ISSN: 1750-2799 page 172, column 1,

paragraph 2 - page 173, column 1, last paragraph; figures 1,3

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

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 ikke-naturlig forekommende eller konstruert sammensetning omfattende:

et leveringssystem som er operativt konfigurert for å levere CRISPR-Cas-komplekskomponenter eller polynukleotidsekvenser som omfatter eller koder for nevnte komponenter i en eukaryot celle, karakterisert ved at CRISPR-Cas-komplekset er opererbart i den eukaryote cellen;

I. en eller flere CRISPR-Cas-kompleks-polynukleotidsekvenser omfattende eller som koder for ekspresjon i eukaryote celle:

- (a) en styresekvens som er i stand til å hybridisere til en målsekvens i en eukaryot celle,
- (b) en tracr mate-sekvens, og
- (c) en tracr-sekvens, og

II. et CRISPR-enzym omfattende ett eller flere heterologe funksjonelle domener eller et polynukleotid som koder for et CRISPR-enzym omfattende ett eller flere heterologe funksjonelle domener for ekspresjon i eukaryote cellen;

hvor:

tracr mate-sekvensen hybridiserer til tracr-sekvensen, styresekvensen leder sekvens-spesifikk binding av et CRISPR-kompleks til målsekvensen, CRISPR-komplekset omfatter CRISPR-enzymet kompleksert med (1) styresekvensen som er hybridisert til målsekvensen, og (2) tracr mate-sekvensen som er hybridisert til tracr-sekvensen, CRISPR-enzymet omfatter en eller flere mutasjoner, slik at enzymet har endret nuklease-aktivitet sammenlignet med villtype-enzymet, hvor ett eller flere heterologe funksjonelle domener omfatter minst en eller flere nukleære lokaliseringssignaler NLS(er).

2. Sammensetning ifølge krav 1, hvor leveringssystemet omfatter et vektorsystem som omfatter en eller flere vektorer, og hvor komponent (I) omfatter et første regulator-element operativt koblet til en polynukleotidsekvens som består av styresekvensen,

tracr mate-sekvensen og tracr-sekvensen, og hvor komponent (II) omfatter et andre regulatorisk element operativt knyttet til en polynukleotidsekvens som koder for CRISPR-enzymet.

5 **3.** Sammensetning ifølge krav 1, hvor leveringssystemet omfatter et vektorsystem som omfatter en eller flere vektorer, og hvor komponent (I) omfatter et første regulator-
element operativt koblet til styresekvensen og tracr mate-sekvensen, og et tredje
regulatorisk element som er operativt knyttet til tracr-sekvensen, og hvor komponent
10 (II) omfatter et andre regulatorisk element operativt knyttet til en polynukleotid-
sekvens som koder for CRISPR-enzymet.

4. Sammensetning ifølge hvilket som helst av kravene 2 eller 3, hvor komponentene I og II ligger i de samme eller forskjellige vektorer i systemet.

15 **5.** Sammensetning ifølge krav 4, hvor komponentene I og II ligger i den samme vektoren.

6. Sammensetning ifølge hvilket som helst av de foregående krav, som er en
multiplekset sammensetning som omfatter flere styresekvenser som er i stand til å
20 hybridisere til flere målsekvenser.

7. Sammensetning ifølge hvilket som helst av kravene 2 til 6, hvor en eller flere vektorer omfatter en eller flere virale vektorer.

25 **8.** Sammensetning ifølge krav 7, hvor en eller flere av virale vektorer omfatter et eller flere retrovirus-, lentivirus-, adenovirus-, adeno-assosiert virus- og herpes simplex virus-vektorer.

9. Sammensetning ifølge hvilket som helst av kravene 1 til 6, hvor leveringssystemet
30 omfatter et gjærsystem, et lipofeksjonssystem, et mikroinjeksjonssystem, et biolistisk system, virosomer, liposomer, immunliposomer, polykationer, lipid: nukleinsyre-konjugater eller kunstige virioner.

10. Sammensetning ifølge hvilket som helst av de foregående krav, hvor CRISPR-
35 enzymet omfatter en eller flere mutasjoner i to eller flere katalytisk aktive domener.

- 11.** Sammensetning ifølge hvilket som helst av de foregående krav, hvor CRISPR-enzymet har redusert eller opphevet nuklease-aktivitet sammenlignet med villtype-enzymet.
- 5 **12.** Sammensetning ifølge hvilket som helst av de foregående krav, hvor en eller flere mutasjoner omfatter mutasjoner i D10 SpCas9, H840 SpCas9, N854 SpCas9 eller N863 SpCas9, eller tilsvarende rester av andre CRISPR-enzymmer.
- 10 **13.** Sammensetning ifølge krav 12, hvor en eller flere mutasjoner omfatter D10A, H840A, N854A eller N863A.
- 14.** Sammensetning ifølge hvilket som helst av kravene 12 eller 13, hvor en eller flere mutasjoner omfatter to mutasjoner.
- 15 **15.** Sammensetning ifølge krav 14, hvor mutasjonene omfatter D10A SpCas9 og H840A SpCas9, eller tilsvarende rester av andre CRISPR-enzymmer.
- 20 **16.** Sammensetning ifølge hvilket som helst av de foregående krav, hvor CRISPR-enzymet er et DNA-bindende protein som ikke leder til spaltning av noen strenger på lokasjonen til målsekvensen.
- 17.** Sammensetning ifølge hvilket som helst av de foregående krav, hvor en eller flere mutasjoner er i et katalytisk aktivt domene av CRISPR-enzymet omfattende RuvCI, RuvCII eller RuvCIII.
- 25 **18.** Sammensetning ifølge hvilket som helst av de foregående krav, hvor CRISPR-enzymet omfatter to eller flere heterologe funksjonelle domener.
- 19.** Sammensetning ifølge hvilket som helst av de foregående krav, omfattende i det minste to eller flere NLSs.
- 30 **20.** Sammensetning ifølge hvilket som helst av de foregående krav, hvor i det minste en eller flere eller i det minste to eller flere nukleære lokaliseringssekvenser er på eller nær den amino-terminale enden av enzymet og/eller ved eller nær den karboksy-
- 35 terminale enden av enzymet.
- 21.** Sammensetning ifølge hvilket som helst av de foregående krav, hvor et funksjonelt domene omfatter et transkripsjonsaktiveringsdomene.

22. Sammensetning ifølge hvilket som helst av de foregående krav, hvor et funksjonelt domene omfatter VP64.

23. Sammensetning ifølge hvilket som helst av kravene 1 til 20, hvor et funksjonelt domene er et transkripsjonelt repressordomene.

24. Sammensetning ifølge krav 23, hvor det funksjonelle domenet omfatter et KRAB-domene eller et SID-domene.

25. Sammensetning ifølge hvilket som helst av de foregående krav, hvor den enzymkodende sekvens koder for to eller flere heterologe funksjonelle domener.

26. Sammensetning ifølge hvilket som helst av de foregående krav, hvor den enzymkodende sekvens koder for en eller flere heterologe funksjonelle domener fusjonert til CRISPR-enzymet.

27. Sammensetning ifølge hvilket som helst av de foregående krav, hvor den enzymkodende sekvens ytterligere omfatter en linkersekvens mellom hvilke som helst to domener.

28. Sammensetning ifølge hvilket som helst av de foregående krav, hvor en eller flere funksjonelle domener har en eller flere av følgende aktiviteter: metylaseaktivitet, demetylaseaktivitet, transkripsjonsaktiveringsaktivitet, transkripsjonsundertrykkelsesaktivitet, transkripsjonsfrigjøringsfaktor-aktivitet, histonmodifikasjonsaktivitet, RNA-spaltingsaktivitet og nukleinsyrebindingsaktivitet.

29. Sammensetning ifølge hvilket som helst av de foregående krav, hvor et funksjonelt domene binder DNA.

30. Sammensetning ifølge hvilket som helst av de foregående krav, hvor et funksjonelt domene påvirker transkripsjonen av målnukleinsyren.

31. Sammensetning ifølge hvilket som helst av de foregående krav, hvor den eukaryote cellen omfatter en pattedyrceelle.

32. Sammensetning ifølge krav 31, hvor pattedyrcellen omfatter en human celle.

33. Sammensetning ifølge hvilket som helst av de foregående krav, hvor CRISPR-enzymet er kodon optimalisert for ekspresjon i en eukaryot celle.

34. Sammensetning ifølge hvilket som helst av de foregående krav, hvor CRISPR-enzymet er et type II Cas9 CRISPR-enzym.

35. Sammensetning ifølge hvilket som helst av de foregående krav, hvor Cas9-enzymet er fra en organisme valgt fra gruppen bestående av slektene Streptococcus, Campylobacter, Nitratifactor, Staphylococcus, Parvibaculum, Roseburia, Neisseria, Gluconacetobacter, Azospirillum, Sphaerochaeta, Lactobacillus, Eubacterium eller Corynebacter.

36. Sammensetning ifølge hvilket som helst av kravene 1-34, hvor Cas9 er fra *Staphylococcus, aureus*.

37. Sammensetning ifølge hvilket som helst av de foregående krav, hvor CRISPR-enzymet er et Cas9-enzym som er et kimært protein som omfatter Cas9-fragmenter fra forskjellige Cas9-homologer.

38. Sammensetning ifølge hvilket som helst av de foregående krav, hvor målsekvensen er tilstøtende til en Protospacer Adjacent Motif (PAM) som gjenkjennes av CRISPR-enzymet.

39. Sammensetning ifølge hvilket som helst av kravene 2 til 38, hvor nevnte første og andre regulatoriske elementer hver omfatter en vev-spesifikk promoter.

40. Sammensetning ifølge krav 39, hvor den vev-spesifikke promoter leder ekspresjonen av CRISPR-transkripter i blod.

41. Sammensetning ifølge hvilket som helst av de foregående krav, hvor tracr-sekvensen er 30 eller flere nukleotider i lengde.

42. En fremgangsmåte for å modulere genekspresjon på et genomisk locus av interesse i en celle i en eukaryot organisme ved å kontakte cellen med sammensetningen ifølge hvilket som helst av de foregående krav; forutsatt at organismen ikke er et menneske eller et annet dyr.

- 5 **43.** En *ex vivo*- eller *in vitro*-metode for å modulere genekspresjon på et genomisk locus av interesse i en celle i en eukaryot organisme ved å kontakte cellen med sammensetningen ifølge hvilket som helst av kravene 1 til 41; forutsatt at nevnte fremgangsmåte ikke omfatter en fremgangsmåte for å modifisere den bakteriellinje-genetiske identiteten til et menneske.
- 10 **44.** Anvendelse av en sammensetning ifølge hvilket som helst av kravene 1 til 41 i *ex vivo* eller *in vitro* gen- eller genom-redigering; forutsatt at nevnte redigering ikke omfatter en fremgangsmåte for å modifisere den genetiske kimcellelinje-identiteten til et menneske.
- 15 **45.** Sammensetning ifølge hvilket som helst av kravene 1 til 41, for anvendelse som et terapeutisk middel.
- 15 **46.** Sammensetning for anvendelse som angitt i krav 45, hvor nevnte terapeutiske middel er for gen- eller genom-redigering, eller genterapi.
- 20 **47.** En *in vitro* eller *ex vivo* eukaryot vertscelle som omfatter sammensetningen ifølge hvilket som helst av kravene 1 til 41; forutsatt at vertscellen ikke er en human kimcellelinje.
- 25 **48.** En *in vitro* eller *ex vivo* eukaryot vertscelle som omfatter CRISPR-Cas-komplekset som definert ifølge hvilket som helst av kravene 1 til 41; forutsatt at vertscellen ikke er en human kimcellelinje.
- 25 **49.** Etterkommer av vertscellen ifølge krav 47 eller 48; forutsatt at etterkommerne ikke omfatter en menneskekropp.