



(12) Translation of
European patent specification

(11) NO/EP 3009511 B1

NORWAY

(19) NO
(51) Int Cl.
C12N 15/113 (2010.01)
C12N 9/22 (2006.01)
C12N 15/10 (2006.01)
C12N 15/82 (2006.01)

Norwegian Industrial Property Office

(21)	Translation Published	2017.10.30
(80)	Date of The European Patent Office Publication of the Granted Patent	2017.05.31
(86)	European Application Nr.	16150428.7
(86)	European Filing Date	2016.01.07
(87)	The European Application's Publication Date	2016.04.20
(30)	Priority	2015.06.18, US, 201562181739 P 2015.07.16, US, 201562193507 P 2015.08.05, US, 201562201542 P 2015.08.16, US, 201562205733 P 2015.09.24, US, 201562232067 P 2015.12.18, US, 201514975085
(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 02142-1324, US-USA President and Fellows of Harvard College, 17 Quincy Street, Cambridge, MA 02138, US-USA
(72)	Inventor	Zhang, Feng, 100 Pacific Street, Apt. 11, Cambridge, MA 02139, US-USA Zetsche, Bernd, 383 Washington Street, Gloucester, MA 09130, US-USA Gootenberg, Jonathan, c/o President And Fellows of Harvard College 17Quincy Street, Cambridge, MA 02138, US-USA Abudayyeh, Omar, 60 Phillips Street, Boston, MA 02114, US-USA Slaymaker, Ian, c/o The Broad Institute Inc. 415 Main Street,, Cambridge, MA 02142, US-USA
(74)	Agent or Attorney	Tandberg Innovation AS, Postboks 1570 Vika, 0118 OSLO, Norge

(54)	Title	NOVEL CRISPR ENZYMES AND SYSTEMS
(56)	References Cited:	WO-A2-2015/089419 BERND ZETSCHKE ET AL: "Cpf1 Is a Single RNA-Guided Endonuclease of a Class 2 CRISPR-Cas System", CELL, vol. 163, no. 3, 25 September 2015 (2015-09-25), pages 759-771, XP055267511, US ISSN: 0092-8674, DOI: 10.1016/j.cell.2015.09.038 GISLE VESTERGAARD ET AL: "CRISPR adaptive immune systems of Archaea", RNA BIOLOGY, vol. 11, no. 2, 14 February 2014 (2014-02-14), pages 156-167, XP55271855, US ISSN: 1547-6286, DOI: 10.4161/rna.27990 EVA SCHUNDER ET AL: "First indication for a functional CRISPR/Cas system in Francisella tularensis", INTERNATIONAL JOURNAL OF MEDICAL MICROBIOLOGY, vol. 303, no. 2, 1 March 2013 (2013-03-01) , pages 51-60, XP55271835, DE ISSN: 1438-4221, DOI:

10.1016/j.ijmm.2012.11.004

Haft, D.H.: "HMM Summary Page: TIGR04330", , 17 May 2012 (2012-05-17), XP002757584,
Retrieved from the Internet: URL:[http://www.jcvi.org/cgi-bin/tigrfams/H](http://www.jcvi.org/cgi-bin/tigrfams/HmmReportPage.cgi?acc=TIGR04330)

[mmReportPage.cgi?acc=TIGR04330](http://www.jcvi.org/cgi-bin/tigrfams/HmmReportPage.cgi?acc=TIGR04330)

KIRA S. MAKAROVA ET AL: "An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems",
NATURE REVIEWS. MICROBIOLOGY, vol. 13, no. 11, 28 September 2015 (2015-09-28), pages
722-736, XP55271841, GB ISSN: 1740-1526, DOI: 10.1038/nrmicro3569

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 modifisert, ikke naturlig forekommende system av samlokaliserte, regelmessig fordelte, korte palindromiske repetisjoner (Clustered Regularly Interspersed Short Palindromic Repeat, CRISPR)-CRISPR-assosiert (Cas) (CRISPR-Cas) (et CRISPR-Cas-system), omfattende
 - a) en eller flere Type V CRISPR-Cas-polynukleotidsekvenser omfattende et guide-RNA som omfatter en styresekvens koblet til en direkte repetert sekvens, hvori styresekvensen kan hybridisere til en målsekvens, eller en eller flere nukleotidsekvenser som koder for Type V CRISPR-Cas-polynukleotidsekvensen eller -sekvensene, og
 - b) et Cpf1-effektorprotein, eller en eller flere nukleotidsekvenser som koder for Cpf1-effektorproteinet,
 hvori styresekvensen eller -sekvensene hybridiserer til målsekvensen, målsekvensen ligger 3' for et protospacer-nabomotiv (Protospacer Adjacent Motif, PAM), og guide-RNAet danner et kompleks med Cpf1-effektorproteinet, hvori systemet omfatter Mg^{2+} .
2. Modifisert, ikke naturlig forekommende vektorsystem av samlokaliserte, regelmessig fordelte, korte palindromiske repetisjoner (Clustered Regularly Interspersed Short Palindromic Repeat, CRISPR)-CRISPR-assosiert (Cas) (CRISPR-Cas) (et CRISPR-Cas-vektorsystem). omfattende en eller flere vektorer som omfatter
 - c) et første regulatorisk element operativt koblet til en eller flere nukleotidsekvenser som koder for en eller flere Type V CRISPR-Cas-polynukleotidsekvenser som omfatter et guide-RNA som omfatter en styresekvens koblet til en direkte repetert sekvens, hvori styresekvensen kan hybridisere til en målsekvens,
 - d) et andre regulatorisk element operativt koblet til en nukleotidsekvens som koder for et Cpf1-effektorprotein,
 hvori bestanddelene (a) og (b) er plassert på samme vektor eller på forskjellige vektorer i systemet, hvor styresekvensen eller -sekvensene når den eller de transkriberes hybridiserer til målsekvensen, målsekvensen ligger 3' for et protospacer-nabomotiv (Protospacer Adjacent Motif, PAM), og guide-RNAet danner et kompleks med Cpf1-effektorproteinet, hvor systemet omfatter Mg^{2+} .
3. System ifølge krav 1 eller 2, hvori målsekvensene foreligger inne i en celle.

4. System ifølge krav 3, hvori cellen omfatter en eukaryot celle.
5. System ifølge krav 1 eller 2, hvor styresekvensen eller -sekvensene når den eller de transkriberes hybridiserer til målsekvensen og guide-RNAet danner et
5 kompleks med Cpf1-effektorproteinet som forårsaker spalting distalt for målsekvensen.
6. System ifølge krav 5, hvor spaltingen danner et forskjøvet dobbelttråddbrudd med et 5'-overheng på 4 eller 5 nukleotider.
- 10 7. System ifølge krav 1 eller 2, hvor PAM omfatter et 5' T-rikt motiv.
8. System ifølge krav 1 eller 2, hvori effektorproteinet er et Cpf1-effektorprotein avledet fra en bakterieart som er opplistet i Figur 64.
- 15 9. System ifølge krav 8, hvori Cpf1-effektorproteinet er avledet fra en bakterieart utvalgt fra gruppen som består av *Francisella tularensis* 1, *Francisella tularensis* subsp. *novicida*, *Prevotella albensis*, *Lachnospiraceae*-bakterie MC2017 1, *Butyrivibrio proteoclasticus*, *Peregrinibacteria*-bakterie GW2011_GWA2_33_10, *Parcubacteria*-bakterie GW2011_GWC2_44_17, *Smithella* sp. SCADC, *Acidaminococcus* sp.
20 BV3L6, *Lachnospiraceae*-bakterie MA2020, *Candidatus Methanoplasma termitum*, *Eubacterium eligens*, *Moraxella bovoculi* 237, *Leptospira inadai*, *Lachnospiraceae*-bakterie ND2006, *Porphyromonas crevioricanis* 3, *Prevotella disiens* og *Porphyromonas macacae*.
- 25 10. System ifølge krav 9, hvori PAM-sekvensen er TTN, hvor N er A/C/G eller T, og effektorproteinet er FnCpf1, eller hvori PAM-sekvensen er TTTV, hvor V er A/C eller G, og effektorproteinet er PaCpf1p, LbCpf1 eller AsCpf1.
11. System ifølge krav 1 eller 2, hvori Cpf1-effektorproteinet omfatter et eller flere
30 nukleære lokaliseringssignaler.
12. System ifølge krav 1 eller 2, hvori nukleinsyresekvensene som koder for Cpf1-effektorproteinet er kodonoptimalisert for ekspresjon i en eukaryot celle.
- 35 13. System ifølge krav 1 eller 2, hvori bestanddelene (a) og (b) eller nukleotid-sekvensene foreligger i én vektor.
14. System ifølge ethvert av kravene 1 til 13, for anvendelse som et medikament.

15. In vitro- eller ex vivo-fremgangsmåte for modifisering av et mållocus av interesse, omfattende tilførsel av et system ifølge krav 1 eller 2 til locuset eller en celle som inneholder locuset.

16. In vitro- eller ex vivo-fremgangsmåte for modifisering av et mållocus av interesse, hvor fremgangsmåten omfatter tilførsel til locuset av en ikke naturlig forekommende eller modifisert sammensetning som omfatter et Cpf1-effektorprotein og en eller flere nukleinsyrekomponenter, hvori Cpf1-effektorproteinet danner et kompleks med nukleinsyrekomponenten eller -komponentene og hvori effektorproteinet når komplekset bindes til et mållocus av interesse som ligger 3' for et protospacer-nabomotiv (Protospacer Adjacent Motif, PAM) induserer en modifikasjon av mållocuset av interesse, hvor komplekset omfatter Mg^{2+} .

17. Fremgangsmåte for modifisering av et mållocus av interesse, hvor fremgangsmåten omfatter tilførsel til locuset av en ikke naturlig forekommende eller modifisert sammensetning som omfatter et Cpf1-effektorprotein og en eller flere nukleinsyrekomponenter, hvor Cpf1-effektorproteinet danner et kompleks med nukleinsyrekomponenten eller -komponentene og effektorproteinet når komplekset bindes til et mållocus av interesse som ligger 3' for et protospacer-nabomotiv (Protospacer Adjacent Motif, PAM) induserer en modifikasjon av mållocuset av interesse, hvor komplekset omfatter Mg^{2+} , hvor fremgangsmåten ikke er en fremgangsmåte for behandling av menneskekroppen eller en dyrekropp eller en fremgangsmåten for modifisering av den genetiske identiteten av kjønnsceller i mennesker eller anvendelse av et humant embryo for industrielle formål.

18. Fremgangsmåte ifølge ethvert av kravene 15 til 17, hvori mållocuset av interesse foreligger inne i en celle.

19. Fremgangsmåte ifølge krav 18, hvori cellen er en eukaryot celle for eksempel en dyrecelle, menneskecelle eller plantecelle.

20. Fremgangsmåte ifølge ethvert av kravene 15 til 17, hvori mållocuset av interesse foreligger i et DNA-molekyl *in vitro*.

21. Fremgangsmåte ifølge ethvert av kravene 15 til 17, hvori den ikke naturlig forekommende eller modifiserte sammensetningen som omfatter et Cpf1-effektorprotein og en eller flere nukleinsyrekomponenter tilføres til cellen som et eller flere polynukleotidmolekyler, om ønskelig foreliggende i en eller flere vektorer.

22. Fremgangsmåte ifølge ethvert av kravene 15 til 17, hvori mållocuset av interesse omfatter DNA som kan være relaxert eller superkveilet DNA.

23. Fremgangsmåte ifølge ethvert av kravene 15 til 17, hvori sammensetningen omfatter én enkelt nukleinsyrekomponent som fortrinnsvis omfatter en styresekvens koblet til en direkte repetert sekvens.

24. Fremgangsmåte ifølge ethvert av kravene 15 til 17, hvori modifikasjonen av mållocuset av interesse er et trådbrudd, hvor trådbruddet om ønskelig omfatter et forskjøvet DNA-dobbeltrådbrudd med et 5'-overheng på 4 eller 5 nukleotider, og hvor mållocuset om ønskelig modifiseres ved integrasjon av et DNA-innskudd i det forskjøvne DNA-dobbeltrådbruddet.

25. Fremgangsmåte ifølge ethvert av kravene 15 til 17, hvori Cpf1-effektorproteinet omfatter et eller flere nukleære lokaliseringssignaler (NLS).

26. Fremgangsmåte ifølge ethvert av kravene 15 til 19, hvori polynukleotidmolekylet eller -molekylene omfatter en eller flere regulatoriske elementer som er operativt konfigurert til å uttrykke Cpf1-effektorproteinet og/eller nukleinsyrekomponenten(e), om ønskelig hvor det eller de regulatoriske elementene omfatter induserbare promotere.

27. Fremgangsmåte ifølge krav 21, hvori polynukleotidmolekylet eller -molekylene eller vektoren(e) foreligger i et tilførselssystem.

28. Fremgangsmåte ifølge krav 21, hvori systemet eller polynukleotidmolekylet eller -molekylene tilføres ved hjelp av partikler, vesikler eller en eller flere virusvektorer.

29. Fremgangsmåte ifølge krav 28, hvori partiklene omfatter et lipid, et sukker, et metall eller et protein, eller hvori vesiklene omfatter eksosomer eller liposomer.

30. Fremgangsmåte ifølge krav 28, hvori virusvektoren eller -vektorene omfatter en eller flere adenovirus, et eller flere lentivirus eller et eller flere adenoassosierte virus.

31. Fremgangsmåte ifølge ethvert av kravene 15 til 17, som er en fremgangsmåte for modifisering av en celle, en cellelinje eller en organisme ved å manipulere en eller flere målsekvenser i genomiske loci av interesse.

5 32. Isolert vertscelle eller cellelinje eller avkom av disse som omfatter et system ifølge krav 1 eller 2, hvor den isolerte vertscellen, cellelinjen eller avkommet av disse ikke er en menneskekropp i sine forskjellige dannelses- og utviklingsstadier.

10 33. Isolert vertscelle eller cellelinje eller avkom av disse ifølge krav 32, hvor cellen er en eukaryot celle.

34. Isolert vertscelle eller cellelinje eller avkom av disse ifølge krav 33, hvor cellen er en dyrecelle eller en menneskecelle.

15 35. Isolert vertscelle, cellelinje eller avkom av disse ifølge krav 33, omfattende en stamcelle eller en stamcellelinje.

20 36. Vertscelle eller cellelinje eller avkom av disse som omfatter systemet ifølge krav 1 eller 2, hvor cellen er en plantecelle.

37. Fremgangsmåte for fremstilling av en plante med en modifisert egenskap av interesse som kodes av et gen av interesse, hvor fremgangsmåten omfatter å sette en plantecelle, plantecellelinje eller plantearvemasse i forbindelse med et system ifølge krav 1 eller 2 eller behandle plantecellen, plantecellelinjen eller plantearvemassen med
25 en fremgangsmåte ifølge ethvert av kravene 15 til 31, slik at genet av interesse modifiseres eller innføres, og så regenerere en plante fra plantecellen, plantecellelinjen eller plantearvemassen.

30 38. Fremgangsmåte for påvisning av en egenskap av interesse i en plante hvor egenskapen av interesse kodes av et gen av interesse, hvor fremgangsmåten omfatter å sette en plantecelle i forbindelse med et system ifølge krav 1 eller 2 eller å behandle plantecellen med en fremgangsmåte ifølge krav 7, hvorved genet av interesse påvises.

35 39. Fremgangsmåte ifølge krav 37, hvori planten fremviser egenskapen av interesse.

40. Partikkel, omfattende et system ifølge krav 1 eller 2.

41. Partikkel ifølge krav 40, hvor partikkelen inneholder Cpf1-effektorproteinet i kompleks med guide-RNAet.

5 42. System eller fremgangsmåte ifølge krav 1, 2, 15 til 17, hvori komplekset, guide-RNAet eller proteinet er konjugert til minst én sukkergruppe, om ønskelig N-acetylgalaktosamin (GalNAc), fortrinnsvis GalNAc med tre antenner.

43. System eller fremgangsmåte ifølge krav 1, 2 eller 15 til 17, hvori konsentrasjonen av Mg^{2+} er fra tilnærmet 1 mM til tilnærmet 15 mM.