



(12) Translation of
European patent specification

(11) NO/EP 3011029 B1

NORWAY

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

Norwegian Industrial Property Office

(45)	Translation Published	2020.05.04
(80)	Date of The European Patent Office Publication of the Granted Patent	2019.12.11
(86)	European Application Nr.	14734708.2
(86)	European Filing Date	2014.06.10
(87)	The European Application's Publication Date	2016.04.27
(30)	Priority	2013.06.17, US, 201361836123 P 2013.07.17, US, 201361847537 P 2013.08.05, US, 201361862355 P 2013.08.05, US, 201361862468 P 2013.08.28, US, 201361871301 P 2013.12.12, US, 201361915407 P 2014.04.15, US, 201461979942 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, USA Massachusetts Institute of Technology, 77 Massachusetts Avenue, Cambridge, MA 02139, USA President and Fellows of Harvard College, 17 Quincy Street, Cambridge, MA 02138, USA
(72)	Inventor	ZHANG, Feng, 100 Pacific Street Apt. 11, Cambridge, MA 02139, USA LIN, Chie-yu, c/o Massachusetts Institute Of Technology 77 Massachusetts Avenue, Cambridge, MA 02142, USA RAN, Fei, 30 Clarendon Street, Boston, MA 02116, USA
(74)	Agent or Attorney	TANDBERG INNOVATION AS, Postboks 1570 Vika, 0118 OSLO, Norge

(54)	Title	DELIVERY, ENGINEERING AND OPTIMIZATION OF TANDEM GUIDE SYSTEMS, METHODS AND COMPOSITIONS FOR SEQUENCE MANIPULATION
------	-------	---

(56)	References Cited:	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
------	-------------------	---

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

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

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,

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

S. J. J. BROUNS: "A Swiss Army Knife of Immunity", SCIENCE, vol. 337, no. 6096, 17 August 2012 (2012-08-17), pages 808-809, XP055113718, ISSN: 0036-8075, DOI: 10.1126/science.1227253

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, ISSN: 0036-8075, DOI: 10.1126/science.1231143

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

G. GASUNAS 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

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

HSU PATRICK D ET AL: "Development and Applications of CRISPR-Cas9 for Genome Engineering", CELL, vol. 157, no. 6, 5 June 2014 (2014-06-05), pages 1262-1278, XP028849523, ISSN: 0092-8674, DOI: 10.1016/J.CELL.2014.05.010

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 for ekspresjon i en
5 celle, som omfatter:

et enkelt polynukleotid som omfatter sekvenser for ekspresjon av to eller flere CRISPR-Cas9 systemguider fra en enkelt promotor, hvor hver systemguide er et kimærisk RNA (chiRNA) og omfatter fra 5' til 3' en guidesekvens som hybridiserer til et DNA mål ved et lokus av interesse, en tracr-mate-sekvens og en tracr-sekvens, og hvor tracr-sekvensen
10 av et første chiRNA er koblet til guidesekvensen av et andre chiRNA ved en koblingssekvens.

2. Sammensetning ifølge krav 1, hvor guidesekvensen omfatter i det minste 5 nukleotider, foretrukket i det minste 10 nukleotider, mer foretrukket i det minste 20
15 nukleotider, eller hvor linkerens har 8 eller 12 nukleotider.

3. Sammensetning ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 2, som videre omfatter en Cas9 eller en kodonoptimalisert polynukleotidsekvens som koder for Cas9.

20 4. Sammensetning ifølge krav 3, hvor Cas9 omfatter en eller flere kjernelokaliseringsssekvenser.

5. Sammensetning ifølge et hvilket som helst av kravene 3 til 4, hvor Cas9 er SaCas9 eller SpCas9.

25 6. Sammensetning ifølge krav 3 til 5, hvor Cas9 er en nickase.

7. Sammensetning ifølge krav 6, hvor Cas9 omfatter en eller flere mutasjoner i et katalytisk domene, fortrinnsvis der den ene eller de flere mutasjonene er valgt fra gruppen som består av D10A, E762A, H840A, N854A, N863A og D986A av SpCas9, eller
30 tilsvarende posisjoner i andre Cas9s, og mest foretrukket der Cas9 har D10A mutasjonen.

8. Sammensetning ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 7, hvor den første guidesekvensen er i stand til å styre spaltning av en streng av DNA duplekse nær den
35 første målsekvensen og den andre guidesekvensen er i stand til å styre spaltning av den andre strengen nær den andre målsekvensen, og den første og andre guidesekvensen er konfigurert for å generere et 5' overheng.

9. Sammensetning ifølge krav 8, hvor:

- (a) 5' overhenget er på det meste 200 basepar, eller er på det meste 100 basepar, eller er på det meste 50 basepar; eller
- (b) 5' overhenget er i det minste 26 basepar, eller er i det minste 30 basepar, eller er 34-50 basepar.

10. Sammensetning ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 7, hvor den første guidesekvensen er i stand til å styre spaltning av en streng av DNA duplekse nær den første målsekvensen og den andre guidesekvensen er i stand til å styre spaltning av den andre strengen nær den andre målsekvensen, og den første og andre guidesekvensen er konfigurert for å generere et 3' overheng.

11. Sammensetning ifølge krav 10, hvor:

- (a) 3' overhenget er på det meste 150 basepar, eller er på det meste 100 basepar, eller er på det meste 25 basepar; eller
- (b) 3' overhenget er i det minste 10 basepar, eller er i det minste 15 basepar.

12. Fremgangsmåte for å modifisere et genomlokus av interesse i en celle, eller for å modifisere en ikke-menneskelig organisme, eller for å modifisere et DNA dupleks ved et lokus av interesse i en celle, hvor fremgangsmåten omfatter å levere den ikke-naturlig forekommende eller konstruerte sammensetningen som omfatter sammensetningen ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 11, hvor fremgangsmåten ikke er en fremgangsmåte for behandling av menneskets eller dyrs kropp ved terapi som blir utøvet på menneskets eller dyrs kropp, og hvor fremgangsmåten ikke er en prosess for å modifisere den kimbanen genetiske identiteten av mennesker.

13. Fremgangsmåte ifølge krav 12, hvor det enkelte polynukleotid som omfatter sekvenser for ekspresjon av to eller flere CRISPR-Cas9 systemguider fra en enkelt promoter er tilveiebrakt som en første DNA sekvens, og hvor sammensetningen omfatter en kodonoptimert polynukleotidsekvens som koder for Cas9 og polynukleotidet er tilveiebrakt som en DNA sekvens, hvor hver av den første DNA sekvensen og den andre DNA sekvensen er tilveiebrakt i en vektor.

14. Fremgangsmåte ifølge krav 13, hvor hver av den første DNA sekvensen og den andre DNA sekvensen er tilveiebrakt i den samme eller en annen vektor.

15. Sammensetning ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 11 for bruk i terapi.

16. En vertscelle som omfatter sammensetningen ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 11, der vertscellen ikke er en menneskelig kimcelle og ikke et menneskelig embryo.