



(12) Translation of
European patent specification

(11) NO/EP 3011031 B1

NORWAY

(19) NO
(51) Int Cl.
C12N 15/63 (2006.01)
C12N 9/22 (2006.01)
C12N 15/10 (2006.01)
C40B 40/08 (2006.01)

Norwegian Industrial Property Office

(45)	Translation Published	2021.02.22
(80)	Date of The European Patent Office Publication of the Granted Patent	2020.09.30
(86)	European Application Nr.	14734710.8
(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 2013.08.28, US, 201361871301 P 2013.12.12, US, 201361915325 P 2014.04.15, US, 201461979733 P 2013.12.12, WO, PCT/US13/074667
(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 02142, USA President and Fellows of Harvard College, 17 Quincy Street, Cambridge, MA 02138, USA
(72)	Inventor	ZHANG, Feng, 100 Pacific StreetApt. 11, Cambridge, MA 02139, USA CONG, Le, 100 Memorial DriveApt. 8-21B, 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 AND USE OF THE CRISPR-CAS SYSTEMS, VECTORS AND COMPOSITIONS FOR HEPATIC TARGETING AND THERAPY
------	-------	---

(56) References

Cited:

US-A1- 2006 234 247

WO-A2-2015/006747

L. CONG ET AL: "Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems", SCIENCE, vol. 339, no. 6121, 3 January 2013 (2013-01-03), 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 1-25, XP002730884, ISSN: 0036-8075, DOI: 10.1126/science.1231143

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, 2 May 2013 (2013-05-02), pages 910-918, XP028538358, CELL PRESS, US ISSN: 0092-8674, DOI: 10.1016/J.CELL.2013.04.025

LI P ET AL: "Biallelic knockout of the alpha-1,3 galactosyltransferase gene in porcine liver-derived cells using zinc finger nucleases", JOURNAL OF SURGICAL RESEARCH, ACADEMIC PRESS INC., SAN DIEGO, CA, US, vol. 181, no. 1, 3 July 2012 (2012-07-03), pages E39-E45, XP002717543, ISSN: 0022-4804, DOI: 10.1016/J.JSS.2012.06.035 [retrieved on 2012-07-03]

O HIBBITT ET AL: "RNAi-mediated knockdown of HMG CoA reductase enhances gene expression from physiologically regulated low-density lipoprotein receptor therapeutic vectors in vivo", GENE THERAPY, vol. 19, no. 4, 1 April 2012 (2012-04-01), pages 463-467, XP55073263, ISSN: 0969-7128, DOI: 10.1038/gt.2011.103

KOORNNEEF ANNEMART ET AL: "Apolipoprotein B Knockdown by AAV-delivered shRNA Lowers Plasma Cholesterol in Mice", April 2011 (2011-04), MOLECULAR THERAPY, VOL. 19, NR. 4, PAGE(S) 731-740, XP002732021, ISSN: 1525-0016 the whole document

S NOMURA ET AL: "Low-density lipoprotein receptor gene therapy using helper-dependent adenovirus produces long-term protection against atherosclerosis in a mouse model of familial hypercholesterolemia", GENE THERAPY, vol. 11, no. 20, 22 October 2004 (2004-10-22), pages 1540-1548, XP55139705, ISSN: 0969-7128, DOI: 10.1038/sj.gt.3302310

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

SHALEM OPHIR ET AL: "Genome-Scale CRISPR-Cas9 Knockout Screening in Human Cells", January 2014 (2014-01), SCIENCE (WASHINGTON D C), VOL. 343, NR. 6166, PAGE(S) 84-87, XP002723432, ISSN: 0036-8075(print) the whole document

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

P. MALI ET AL: "RNA-Guided Human Genome Engineering via Cas9", SCIENCE, vol. 339, no. 6121, 3 January 2013 (2013-01-03), pages 823-826, XP055111247, ISSN: 0036-8075, DOI: 10.1126/science.1232033

PRASHANT MALI ET AL: "Supplementary Materials for RNA-Guided Human Genome Engineering via Cas9", INTERNET CITATION, 15 February 2013 (2013-02-15), pages 1-36, XP002723674, ISSN: 0036-8075 Retrieved from the Internet:

URL:<http://www.sciencemag.org/content/suppl/2013/01/03/science.1232033.DC1> [retrieved on 2013-01-03]

BANASZEWSKA ANNA ET AL: "Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9: A new target molecule for gene therapy", June 2012 (2012-06), CELLULAR & MOLECULAR BIOLOGY LETTERS, VOL. 17, NR. 2, PAGE(S) 228-239, XP002732020, ISSN: 1425-8153(print) the whole document

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 sammensetning som omfatter et CRISPR-Cas-system som omfatter en Cas9, en
5 guidesekvens som er i stand til å hybridisere til en hepatisk målsekvens uttrykt i
leverceller, en tracr-mate-sekvens og en tracr-sekvens, eller ett eller flere polynukleotider
som koder for nevnte CRISPR-Cas-system for bruk ved behandling av leversykdom eller
forstyrrelser,
10 hvor nevnte CRISPR-Cas-system administreres ved bruk av en stabil nukleinsyre-lipid-
partikkel (SNALP) eller av en dsAAV2/8-vektor.

2. Sammensetningen for bruk ifølge krav 1, hvor Cas9 omfatter i det minste en
kjernelokaliseringssekvens.

3. Sammensetningen for bruk ifølge krav 1 eller 2 for behandling eller inhibering av en
15 tilstand som er forårsaket av en defekt i en hepatisk målsekvens i et genomisk lokus i et
subjekt og som uttrykkes i leverceller.

4. Sammensetningen for bruk ifølge et hvilket som helst av de foregående kravene, hvor
20 nevnte bruk omfatter innføring i en celle, eller i en celle i en organisme, en dsAAV2/8-
vektor som omfatter

a) et første regulatorisk element som er operativt koblet til en nukleotidsekvens
som koder for guidesekvensen som er i stand til å hybridisere til en hepatisk
målsekvens som er uttrykt i leverceller, og

25 b) et andre regulatorisk element som er operativt koblet til en nukleotidsekvens
som koder for Cas9 som omfatter i det minste en kjernelokaliseringssekvens,

hvor komponentene a) og b) er lokalisert på identiske eller forskjellige vektorer.

5. Sammensetningen for bruk ifølge et hvilket som helst av de foregående kravene, hvor
30 sammensetningen omfatter:

I. en polynukleotidsekvens som omfatter:

(a) en guidesekvens som er i stand til å hybridisere til en hepatisk
målsekvens som er uttrykt i leverceller,

(b) en tracr-mate-sekvens, og

(c) en tracr-sekvens, og

II. en polynukleotidsekvens som koder for en Cas9, og som omfatter i det minste én eller flere kjernelokaliseringsssekvenser, hvor (a), (b) og (c) er anordnet i en 5'-til-3' orientering,

hvor tracr-mate-sekvensen hybridiserer til tracr-sekvensen og guidesekvensen styrer den sekvens-spesifikke bindingen av et CRISPR-kompleks til målsekvensen, og

hvor CRISPR-komplekset omfatter Cas9 kompleksert med (1) guidesekvensen som er hybridisert eller kan hybridiseres til målsekvensen, og (2) tracr-mate-sekvensen som er hybridisert eller kan hybridiseres til tracr-sekvensen, og hvor polynukleotidsekvensen som koder for en Cas9 er DNA eller RNA.

6. Sammensetningen for bruk ifølge et hvilket som helst av de foregående kravene, hvor sammensetningen omfatter:

I. en polynukleotidsekvens som omfatter:

(a) en guidesekvens som er i stand til å hybridisere til en hepatisk målsekvens som er uttrykt i leverceller, og

(b) i det minste én eller flere tracr-mate-sekvenser,

II. en polynukleotidsekvens som koder for en Cas9 og i det minste én eller flere kjernelokaliseringsssekvenser, og

III. en polynukleotidsekvens som omfatter en tracr-sekvens,

hvor, hvis transkribert, tracr mate-sekvensen hybridiseres til tracr-sekvensen og guidesekvensen styrer den sekvens-spesifikke bindingen av et CRISPR-kompleks til målsekvensen, og

hvor CRISPR-komplekset omfatter Cas9 som er kompleksert med (1) guidesekvensen som er hybridisert eller kan hybridiseres til målsekvensen, og (2) tracr-mate-sekvensen som er hybridisert eller kan hybridiseres til tracr-sekvensen, og hvor polynukleotidsekvensen som koder for en Cas9 er DNA eller RNA.

7. Sammensetningen for bruk ifølge et hvilket som helst av de foregående kravene, hvor to eller flere hepatiske genprodukter er endret.

5 **8.** Sammensetningen for bruk ifølge et hvilket som helst av kravene 4 til 7, hvor guidesekvensen er smeltet sammen med en tracr-mate og en tracr-sekvens.

9. Sammensetningen for bruk ifølge et hvilket som helst av kravene 4 til 8, hvor nukleotidsekvensen som koder for Cas9 er kodonoptimalisert for uttrykk i subjektet eller
10 organismen.

10. Sammensetningen for bruk ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 9, hvor Cas9 er eller er avledet fra *S. pyogenes* Cas9.

15 **11.** Sammensetningen for bruk ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 9, hvor Cas9 er eller er avledet fra *S. aureus* Cas9.

12. Sammensetningen for bruk ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 11, hvor den hepatiske målsekvensen uttrykker proprotein-konvertase-subtilisin-kexin 9 (PCSK9),
20 Alpha-1-antitrypsin (A1AT), Hmgcr, Apolipoprotein B (ApoB) eller lipoproteinreseptor med lav tetthet (LDL-R).

13. Sammensetningen for bruk ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 12, hvor polynukleotidet som koder for Cas9 er operativt koblet til en leverspesifikk promoter.

25 **14.** Sammensetningen for bruk ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 13, hvor polynukleotidet som koder for Cas9 er operativt koblet til en TBG-promoter.

15. Sammensetning for bruk ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 14, hvor nevnte
30 behandling er *in vivo* eller *ex vivo*.

16. Sammensetningen for bruk ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 15, hvor leversykdommen eller forstyrelsen er AAT-mangel.

35 **17.** Sammensetningen for bruk ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 16, hvor nevnte bruk er korreksjonen av en eller flere mangelfulle genotyper.

18. Sammensetningen for bruk ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 6, hvor leversykdommen eller forstyrelsen er en HBV-infeksjon.

19. Sammensetningen for bruk ifølge et hvilket som helst av kravene 1-3 og 5-17, hvor nevnte CRISPR-Cas-system administreres som RNA-polynukleotider ved bruk av en stabil nukleinsyre-lipid-partikkel (SNALP).

5

20. Sammensetningen for bruk ifølge et hvilket som helst av kravene 1-3 og 5-17, hvor nevnte CRISPR-Cas-system administreres ved bruk av dsAAV2/8-vektor.