



(12) Translation of
European patent specification

(11) NO/EP 3064585 B1

NORWAY

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

Norwegian Industrial Property Office

(45)	Translation Published	2020.06.22
(80)	Date of The European Patent Office Publication of the Granted Patent	2020.02.05
(86)	European Application Nr.	16151694.3
(86)	European Filing Date	2013.12.12
(87)	The European Application's Publication Date	2016.09.07
(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, 201361836101 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
(62)	Divided application	EP2898075, 2013.12.12
(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 Street Apt. 11, Cambridge, MA 02139, USA RAN, Fei, 30 Clarendon Street, Boston, MA 02116, USA SHALEM, Ophir, 435 Gooding Way No. 453, Albany, CA 94706, USA
(74)	Agent or Attorney	TANDBERG INNOVATION AS, Postboks 1570 Vika, 0118 OSLO, Norge

(54)	Title	ENGINEERING AND OPTIMIZATION OF IMPROVED SYSTEMS, METHODS AND ENZYME COMPOSITIONS FOR SEQUENCE MANIPULATION
------	-------	--

(56) References

Cited:

- 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
- 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
- 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
- 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
- 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,

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 som omfatter et
5 vektorsystem som omfatter en eller flere vektorer som omfatter

I. et første reguleringselement som er operabelt knyttet til et CRISPR-Cas-
systemguide-RNA som omfatter:

(a) et guide-RNA-polynukleotid som er i stand til å hybridisere en
målsekvens i en eukaryotisk celle,

10 (b) en tracr-mate-RNA-polynukleotid, og

(c) et tracr-RNA-polynukleotid, og

II. et andre reguleringselement som er operabelt knyttet til en proteinkodende
sekvens som koder for et Cas9-protein som omfatter i det minste en eller flere
nukleære lokaliseringsssekvenser,

15 hvor (a), (b) og (c) er anordnet i en 5' til 3' orientering,
hvor komponentene I og II er lokalisert på de samme eller på forskjellige vektorer i
systemet,

hvor når transkribert, tracr-mate-RNA-polynukleotidet hybridiseres til tracr-RNA-
polynukleotidet, og guide-RNA-polynukleotidet leder sekvensspesifikk binding av et
20 CRISPR-kompleks til målsekvensen, og

hvor CRISPR-komplekset omfatter Cas9-protein-komplekset med (1) guide RNA-
polynukleotidet som er hybridisert til målsekvensen, og (2) tracr-mate-RNA-
polynukleotidet som er hybridisert til tracr-RNA-polynukleotidet,
hvor Cas9-proteinet er *Staphylococcus aureus* Cas9 (SaCas9).

25 2. En sammensetning ifølge krav 1, hvor Cas9-proteinet har en eller flere mutasjoner i
hvilket som helst domene av proteinet.

30 3. En sammensetning ifølge krav 2, hvor Cas9-proteinet har en eller flere mutasjoner i et
katalytisk domene.

4. En sammensetning eller protein ifølge krav 2 eller 3, hvor den ene eller de flere
mutasjonene er i et RuvC I, RuvC II, RuvC III eller HNH domene av Cas9-proteinet.

35 5. En sammensetning eller protein ifølge krav 3 eller 4, hvor Cas9-proteinet omfatter en
eller flere mutasjoner tilsvarende posisjonsnummereringen av SpCas9 ved D10A, H840A,
N854A eller N863A.

6. En sammensetning ifølge et hvilket som helst av de foregående krav, hvor Cas9-proteinet videre omfatter et funksjonelt domene.

7. En sammensetning ifølge krav 6, hvor det funksjonelle domenet er et transkripsjonelt aktivator domene.

8. En sammensetning ifølge krav 7, hvor det transkripsjonelle aktivator domenet er VP64.

9. En sammensetning ifølge krav 6, hvor det funksjonelle domenet er et transkripsjonelt repressor domene.

10. En sammensetning ifølge krav 9, hvor det transkripsjonelle repressor domenet er KRAB, SID eller SID4X.

11. En sammensetning ifølge krav 6, hvor det funksjonelle domenet er en rekombinase, en transposase, en histon omformer, en DNA metyltransferase, et kryptokrom og et lett induserbart / kontrollerbart domene eller et kjemisk induserbart / kontrollerbart domene.

12. En sammensetning ifølge et hvilket som helst av de foregående krav, hvor polynukleotidsekvensen som koder for Cas9-proteinet er kodonoptimalisert for ekspresjon i en eukaryotisk celle.

13. En sammensetning ifølge et hvilket som helst av de foregående krav, som omfatter to guide-RNA-er.

14. En sammensetning ifølge et hvilket som helst av de foregående krav, som omfatter et vektorsystem som omfatter en eller flere vektorer, og hvor polynukleotidsekvenser som omfatter eller som koder komponentene I og II, er lokalisert på de samme eller på forskjellige vektorer av systemet.

15. En sammensetning ifølge krav 14, hvor vektorsystemet omfatter en enkelt vektor.

16. En sammensetning ifølge krav 14, hvor den eller de flere vektorene omfatter en eller flere virale vektorer.

17. En sammensetning ifølge krav 16, hvor den ene eller de flere virale vektorene omfatter en eller flere retrovirus, lentivirus, adenovirus, adeno-assosiert virus eller herpes simplex virus vektorer.

18. En sammensetning ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 15, som omfatter en nanopartikkel, liposom, eksosom, gjærsystem eller mikrovesikkel.

5 19. En *ex vivo* eller *in vitro* vertscelle eller cellelinje, som omfatter sammensetningen ifølge et hvilket som helst av de foregående krav, eller etterkommere derav.

20. En *ex vivo* eller *in vivo* vertscelle, cellelinje eller etterkommere derav ifølge krav 19, som er en stamcelle eller stamcellelinje.

10 21. En fremgangsmåte for å modifisere en organisme ved manipulering av en eller flere målsekvenser på genomiske lokasjoner av interesse, som omfatter å avgi til organismen sammensetningen ifølge et hvilket som helst av kravene 1-18, hvor organismen er en ikke-animalsk organisme.

15 22. En *ex vivo* fremgangsmåte for å modifisere en celle eller en organisme ved manipulering av en eller flere målsekvenser på genomiske lokasjoner av interesse, som omfatter å avgi til cellen en sammensetning ifølge et hvilket som helst av kravene 1-18, hvor fremgangsmåten ikke omfatter en prosess for å modifisere kimbanen genetisk identitet av et menneske.

20 23. En fremgangsmåte ifølge krav 21 eller 22, hvor organismen er en plante eller alge.

24. Anvendelse av sammensetningen ifølge et hvilket som helst av kravene 1-18 for *ex vivo* gen- eller genomredigering, hvor anvendelsen ikke omfatter en prosess for å
25 modifisere det kimbanen genetiske identiteten av et menneske.

25. Anvendelse av en sammensetning ifølge et hvilket som helst av kravene 1-18 for fremstilling av et medikament.

30 26. Sammensetning ifølge et hvilket som helst av kravene 1-18, for anvendelse i korrigering av okulære defekter som oppstår fra genetiske mutasjoner.