



(12) Translation of
European patent specification

(11) NO/EP 3115457 B1

NORWAY

(19) NO
(51) Int Cl.
C12N 15/09 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)
C12N 9/78 (2006.01)

Norwegian Industrial Property Office

(21)	Translation Published	2019.12.02
(80)	Date of The European Patent Office Publication of the Granted Patent	2019.10.02
(86)	European Application Nr.	15758734.6
(86)	European Filing Date	2015.03.04
(87)	The European Application's Publication Date	2017.01.11
(30)	Priority	2014.03.05, JP, 2014043348 2014.09.30, JP, 2014201859
(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	National University Corporation Kobe University, 1-1 Rokkodai-cho Nada-ku, Kobe-shi, Hyogo 657-8501, Japan
(72)	Inventor	NISHIDA, Keiji, c/o National University Corporation Kobe University1-1 Rokkodai-choNada-ku, Kobe-shiHyogo 657-8501, Japan KONDO, Akihiko, c/o National University Corporation Kobe University1-1 Rokkodai-choNada-ku, Kobe-shiHyogo 657-8501, Japan KOJIMA, Satomi, c/o National University Corporation Kobe University1-1 Rokkodai-choNada-ku, Kobe-shiHyogo 657-8501, Japan
(74)	Agent or Attorney	BRYN AARFLOT AS, Stortingsgata 8, 0161 OSLO, Norge

(54) Title **GENOMIC SEQUENCE MODIFICATION METHOD FOR SPECIFICALLY CONVERTING NUCLEIC ACID BASES OF TARGETED DNA SEQUENCE, AND MOLECULAR COMPLEX FOR USE IN SAME**

(56) References
Cited: WO-A2-2010/132092
 WO-A1-2013/058404
 US-A1- 2011 104 787
 WO-A1-2015/089406
 RAN F ANN ET AL: "Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system", NATURE PROTO, NATURE PUBLISHING GROUP, GB, vol. 8, no. 11, 1 November 2013 (2013-11-01), pages 2281-2308, XP009174668, ISSN: 1750-2799, DOI: 10.1038/NPROT.2013.143
 PLOSKY BRIAN S: "CRISPR-Mediated Base Editing without DNA Double-Strand Breaks",

MOLECULAR CELL, vol. 62, no. 4, 19 May 2016 (2016-05-19), pages 477-478, XP029552452, ISSN: 1097-2765, DOI: 10.1016/J.MOLCEL.2016.05.006

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, XP055299674, ISSN: 0036-8075, DOI: 10.1126/science.1225829

DAESIK KIM ET AL: "Genome-wide target specificities of CRISPR RNA-guided programmable deaminases", NATURE BIOTECHNOLOGY, vol. 35, no. 5, 10 April 2017 (2017-04-10), pages 475-480, XP055383071, US ISSN: 1087-0156, DOI: 10.1038/nbt.3852

K. NISHIDA ET AL: "Targeted nucleotide editing using hybrid prokaryotic and vertebrate adaptive immune systems", SCIENCE, vol. 353, 4 August 2016 (2016-08-04), pages 1-14, XP055367833, ISSN: 0036-8075, DOI: 10.1126/science.aaf8729

CERMAK T. ET AL.: 'Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting' NUCLEIC ACIDS RES. vol. 39, no. 12, July 2011, page E82, XP055130093

ALEXIS C. KOMOR ET AL: "Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage", NATURE, vol. 533, no. 7603, 20 April 2016 (2016-04-20), pages 420-424, XP055343871, ISSN: 0028-0836, DOI: 10.1038/nature17946

MALI P. ET AL.: 'Cas9 as a versatile tool for engineering biology' NAT METHODS 10 October 2013, pages 957 - 963, XP002718606

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. Fremgangsmåte for å modifisere et målrettet sted for et dobbeltstrengt DNA, omfattende et trinn å kontakte et kompleks omfattende en nukleinsyresekvens-gjenkjenningsmodul som spesifikt binder seg til en målnukleotidsekvens i et gitt
5 dobbeltstrengt DNA koblet til et nukleinsyrebasekonverterende enzym, med nevnte dobbeltstrengede DNA, for å omvandle ett eller flere nukleotider i det målrettede stedet til andre ett eller flere nukleotider eller slette ett eller flere nukleotider, eller sette inn ett eller flere nukleotider inn i nevnte målrettede sted, hvor nukleinsyre-sekvensgjenkjenningsmodulen er et CRISPR-Cas-system, hvor CRISPR-Cas-systemet
10 omfatter et Cas-protein med nikaseaktivitet som er i stand til å spalte bare en av strengene til det dobbeltstrengede DNA-et, hvor fremgangsmåten ikke er en fremgangsmåte for behandling av menneskekroppen eller dyrekroppen ved kirurgi eller terapi, og hvor fremgangsmåten ikke er en fremgangsmåte for å modifisere den genetiske identiteten til kimlinjen til mennesker.
15
2. Fremgangsmåte ifølge krav 1, hvor Cas er en Cas9, hvor den 10. Asp-resten blir omvandlet til en Ala-rest eller den 840. His-resten blir omvandlet til en Ala-rest.
- 20 3. Fremgangsmåte ifølge krav 1 eller 2, som anvender to eller flere typer nukleinsyresekvensgjenkjenningsmoduler som hver især binder til en annen målnukleotidsekvens.
4. Fremgangsmåte ifølge krav 3, hvor de forskjellige målnukleotidsekvensene er tilstede i forskjellige gener.
25
5. Fremgangsmåte ifølge hvilket som helst av kravene 1 til 4, hvor det nukleinsyrebasekonverterende enzymet er en deaminase, fortrinnsvis en cytidindeaminase.
6. Fremgangsmåte ifølge hvilket som helst av kravene 1 til 5, hvor det dobbeltstrengede DNA-et bringes i kontakt med komplekset ved å innføre en nukleinsyre som
30 koder for komplekset i en celle med det dobbeltstrengede DNA-et.
7. Fremgangsmåte ifølge krav 6, hvor cellen er en prokaryotisk celle.
- 35 8. Fremgangsmåte ifølge krav 6, hvor cellen er en mikrobiell celle.

9. Fremgangsmåte ifølge krav 6, hvor cellen er en eukaryotisk celle, fortrinnsvis en plantecelle, en insektcelle eller en dyrecelle.
- 5 10. Fremgangsmåte ifølge krav 9, hvor dyrecellen er en virveldyrceelle, fortrinnsvis en pattedyrceelle.
- 10 11. Fremgangsmåte ifølge hvilket som helst av kravene 6 til 10, hvor cellen er en polyploid celle, og alle de målrettede stedene i alleler på homologe kromosomer er modifisert.
- 15 12. Fremgangsmåte ifølge hvilket som helst av kravene 6 til 11, omfattende et trinn med å innføre en ekspresjonsvektor omfattende en nukleinsyre som koder komplekset i en form som tillater kontroll av en uttrykingsperiode i cellen, og et trinn for å inducere uttrykk av nukleinsyren i en periode som er nødvendig for å fikse modifiseringen av det målrettede stedet i det dobbeltstrengede DNA-et.
13. Fremgangsmåte ifølge krav 12, hvor målnukleotidsekvensen i det dobbeltstrengede DNA-et er tilstede i et gen som er essensielt for cellen.
- 20 14. Nukleinsyremodifiserende enzymkompleks omfattende en nukleinsyresekvensgjenkjenningsmodul som spesifikt binder seg til en målnukleotidsekvens i et gitt dobbeltstrengt DNA koblet til et nukleinsyrebasekonverterende enzym og nukleinsyresekvensgjenkjenningsmodulen er et CRISPR-Cas system hvor CRISPR-Cas-systemet omfatter et Cas-protein med nikaseaktivitet som er i stand til å spalte bare
- 25 én av strengene til det dobbeltstrengede DNA-et, komplekset konverterer ett eller flere nukleotider på det målrettede stedet til et eller flere nukleotider eller sletter ett eller flere nukleotider, eller setter inn ett eller flere nukleotider inn i nevnte målrettede sted.
- 30 15. Nukleinsyre som koder for det nukleinsyremodifiserende enzymkomplekset ifølge krav 14.