



(12) Translation of
European patent specification

(11) NO/EP 3241902 B1

NORWAY

(19) NO
(51) Int Cl.
C12N 15/11 (2006.01)
A61K 38/46 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)
C12N 15/10 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
C12N 15/90 (2006.01)

Norwegian Industrial Property Office

(21)	Translation Published	2018.08.06
(80)	Date of The European Patent Office Publication of the Granted Patent	2018.02.28
(86)	European Application Nr.	17163434.8
(86)	European Filing Date	2013.03.15
(87)	The European Application's Publication Date	2017.11.08
(30)	Priority	2012.05.25, US, 201261652086 P 2012.10.19, US, 201261716256 P 2013.01.28, US, 201361757640 P 2013.02.15, US, 201361765576 P
(84)	Designated Contracting States:	AL ; AT ; BE ; BG ; CH ; CY ; CZ ; DE ; DK ; EE ; ES ; FI ; FR ; GR ; HR ; HU ; IE ; IS ; IT ; LI ; LT ; LU ; LV ; MC ; MK ; MT ; NL ; NO ; PL ; PT ; RO ; RS ; SE ; SI ; SK ; SM ; TR
	Designated extension states:	BA; ME
(62)	Divided application	EP2800811, filing date 2013.03.15
(73)	Proprietor	The Regents of the University of California, 1111 Franklin Street, 12th Floor, Oakland, CA 94607, US-USA University of Vienna, Universitätsring 1, 1010 Vienna, AT-Østerrike Charpentier, Emmanuelle, Department Of Regulation in Infection Biology Max Planck Institute for Infection Biology Charitéplatz 1, 10117 Berlin, DE-Tyskland
(72)	Inventor	CHARPENTIER, Emmanuelle, Department of Regulation in Infection BiologyMax Planck Institute for Infection BiologyCharitéplatz 1, 10117 Berlin, DE-Tyskland JINEK, Martin, 1846 Spruce Street, Berkeley, CA 94709, US-USA DOUDNA CATE, James Harrison, 164 Vicente Road, Berkeley, CA 94705, US-USA LIM, Wendell, 149 Collins Street, San Francisco, CA 94118, US-USA QI, Lei, 730 Kinkead Way 302, Albany, CA 94706, US-USA CHYLINSKI, Krzysztof, Simmeringer Hauptstrasse 45/8, 1110 Vienna, AT-Østerrike DOUDNA, Jennifer A., 164 Vicente Road, Berkeley, CA 94705, US-USA

(74) Agent or Attorney ZACCO NORWAY AS, Postboks 2003 Vika, 0125 OSLO, Norge

(54) Title **METHODS AND COMPOSITIONS FOR RNA-DIRECTED TARGET DNA MODIFICATION AND FOR RNA-DIRECTED MODULATION OF TRANSCRIPTION**

(56) References
Cited:

WO-A1-2010/021692, MARTIN JINEK ET AL: "RNA-programmed genome editing in human cells", E-LIFE, SAM LTD, GB, vol. 2, 29 January 2013 (2013-01-29), pages e00471-1, XP002699851, ISSN: 2050-084X, DOI: 10.7554/ELIFE.00471 [retrieved on 2013-06-28] & Martin Jinek ET AL: "RNA-programmed genome editing in human cells (Figures and figure supplements)", eLife, vol. 2, 29 January 2013 (2013-01-29), XP055167481, DOI: 10.7554/eLife.00471, WO-A1-2014/089290, WO-A1-2014/093712, WO-A1-2014/099744, WO-A2-2011/072246, WO-A2-2014/093661, PAPWORTH M ET AL: "Designer zinc-finger proteins and their applications", GENE, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 366, no. 1, 17 January 2006 (2006-01-17), pages 27-38, XP024934269, ISSN: 0378-1119, DOI: 10.1016/J.GENE.2005.09.011 [retrieved on 2006-01-17], 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, XP055308803, ISSN: 0028-0836, DOI: 10.1038/nature09886, MAKAROVA KIRA S ET AL: "Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems", NATURE REVIEWS. MICROBIO, NATURE PUBLISHING GROUP, GB, vol. 9, no. 6, 9 May 2011 (2011-05-09), pages 467-477, XP009155547, ISSN: 1740-1526, DOI: 10.1038/NRMICRO2577, 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, 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 & 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), XP055067747, US ISSN: 0036-8075, DOI: 10.1126/science.1225829, 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, XP055067741, 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, XP055067744, ISSN: 0036-8075, DOI: 10.1126/science.1231143, 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 & P. Mali ET AL: "Supplementary information for RNA-Guided Human Genome Engineering via Cas9 (XP 055337932)", Science, vol. 339, no. 6121, 3 January 2013 (2013-01-03), pages 823-826, XP055403737, ISSN: 0036-8075, DOI: 10.1126/science.1232033, WO-A1-2014/065596

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. Sammensetning omfattende:**

(a) et kimært Cas9-protein, eller et polynukleotid som koder for det kimære Cas9-proteinet, hvori det kimære Cas9-proteinet omfatter et modifisert Cas9-protein med redusert nukleaseaktivitet sammenlignet med det korresponderende villtype-Cas9, og omfatter et heterologt polypeptid som:

(i) har DNA-modifiserende aktivitet, eller

(ii) utviser evnen til å øke eller redusere transkripsjon, eller

(iii) har enzymatisk aktivitet som modifiserer et polypeptid assosiert med DNA; og

(b) et RNA som er målrettet mot DNA, eller ett eller flere DNA-polynukleotider som koder for RNA-et som er målrettet mot DNA, hvori RNA-et som er målrettet mot DNA, omfatter:

(i) et segment som er målrettet mot DNA, omfattende en nukleotidsekvens som er komplementær til en sekvens i et mål-DNA, og

(ii) et proteinbindende segment som samvirker med det kimære Cas9-proteinet, hvori det proteinbindende segmentet omfatter to komplementære strekk av nukleotider som hybridiserer for å danne et dobbelttrådet RNA- (dsRNA-)dupleks.

2. Fremgangsmåte for å modifisere et mål-DNA, der fremgangsmåten omfatter å bringe mål-DNA-et i kontakt med et kompleks omfattende:

(a) et kimært Cas9-protein, som omfatter et modifisert Cas9-protein med redusert nukleaseaktivitet sammenlignet med det korresponderende villtype-Cas9, og omfatter et heterologt polypeptid som har DNA-modifiserende aktivitet; og

(b) et RNA som er målrettet mot DNA, omfattende:

(i) et segment som er målrettet mot DNA, omfattende en nukleotidsekvens som er komplementær til en sekvens i mål-DNA-et, og

(ii) et proteinbindende segment som samvirker med det kimære Cas9-proteinet, hvori det proteinbindende segmentet omfatter to komplementære strekk av nukleotider som hybridiserer for å danne et dobbelttrådet RNA- (dsRNA-)dupleks,

hvori opprettelsen av kontakt foregår *in vitro* eller i en celle *ex vivo*.

3. Fremgangsmåte for å modulere stedsspesifikk transkripsjon i et mål-DNA, der fremgangsmåten omfatter å bringe mål-DNA-et i kontakt med et kompleks omfattende:

5 (a) et kimært Cas9-protein, som omfatter et modifisert Cas9-protein med redusert nukleaseaktivitet sammenlignet med det korresponderende villtype-Cas9, og omfatter et heterologt polypeptid som utviser evnen til å øke eller redusere transkripsjon; og

(b) et RNA som er målrettet mot DNA, omfattende:

10 (i) et segment som er målrettet mot DNA, omfattende en nukleotidsekvens som er komplementær til en sekvens i mål-DNA-et, og

(ii) et proteinbindende segment som samvirker med det kimære Cas9-proteinet, hvori det proteinbindende segmentet omfatter to komplementære strekk av nukleotider som hybridiserer for å danne et dobbelttrådet RNA- (dsRNA-
15)dupleks,

hvori opprettelsen av kontakt foregår *in vitro* eller i en celle *ex vivo*.

4. Fremgangsmåte for å modifisere et polypeptid assosiert med et mål-DNA, der fremgangsmåten omfatter å bringe mål-DNA-et i kontakt med et kompleks omfattende:

20 (a) et kimært Cas9, som omfatter et modifisert Cas9-protein med redusert nukleaseaktivitet sammenlignet med det korresponderende villtype-Cas9, og omfatter et heterologt polypeptid som har enzymatisk aktivitet som modifiserer et polypeptid assosiert med DNA;
25

og

(b) et RNA som er målrettet mot DNA, omfattende:

(i) et segment som er målrettet mot DNA, omfattende en nukleotidsekvens som er komplementær til en sekvens i mål-DNA-et, og

30 (ii) et proteinbindende segment som samvirker med det kimære Cas9-proteinet, hvori det proteinbindende segmentet omfatter to komplementære strekk av nukleotider som hybridiserer for å danne et dobbelttrådet RNA- (dsRNA-
)dupleks,

hvori opprettelsen av kontakt foregår *in vitro* eller i en celle *ex vivo*.

35

5. Sett omfattende:

(a) et kimært Cas9-protein, eller et polynukleotid som koder for det kimære Cas9-proteinet, hvori det kimære Cas9-proteinet omfatter et modifisert Cas9-protein med redusert nukleaseaktivitet sammenlignet med det korresponderende villtype-Cas9, og omfatter et heterologt polypeptid som:

5 (i) har DNA-modifiserende aktivitet, eller

(ii) utviser evnen til å øke eller redusere transkripsjon, eller

(iii) har enzymatisk aktivitet som modifiserer et polypeptid assosiert med DNA;
og

10 (b) et RNA som er målrettet mot DNA, eller ett eller flere DNA-polynukleotider som koder for RNA-et som er målrettet mot DNA, hvori RNA-et som er målrettet mot DNA, omfatter:

(i) et segment som er målrettet mot DNA, omfattende en nukleotidsekvens som er komplementær til en målsekvens i et mål-DNA, og

15 (ii) et proteinbindende segment som samvirker med det kimære Cas9-proteinet, hvori det proteinbindende segmentet omfatter to komplementære strekk av nukleotider som hybridiserer for å danne et dobbelttrådet RNA- (dsRNA-)dupleks,
hvori (a) og (b) er i den samme eller i separate beholdere.

20

6. Sammensetningen ifølge krav 1, eller fremgangsmåten ifølge hvilket som helst av kravene 2 til 4, eller settet ifølge krav 5 hvori dsRNA-duplekset har en lengde fra 8 basepar (bp) til 30 bp.

25

7. Sammensetningen, fremgangsmåten eller settet ifølge krav 6, hvori dsRNA-duplekset har en lengde fra 8 til 10 bp.

30

8. Sammensetningen ifølge hvilket som helst av kravene 1, 6 eller 7, fremgangsmåten ifølge hvilket som helst av kravene 2 til 4, eller 6 til 7, eller settet ifølge hvilket som helst av kravene 5 til 7
hvori prosentandelen komplementaritet mellom nukleotidene som hybridiserer for å danne dsRNA-duplekset til det proteinbindende segmentet, er større enn 70 %.

35

9. Sammensetningen ifølge hvilket som helst av kravene 1 eller 6 til 8, eller fremgangsmåten ifølge hvilket som helst av kravene 2 til 4, eller 6 til 8, eller settet ifølge hvilket som helst av kravene 5 til 8,

hvor RNA-et som er målrettet mot DNA, er et tomolekyl-RNA som er målrettet mot DNA, og omfatter to separate RNA-molekyler, der hvert av dem omfatter ett av de to komplementære strekkene av nukleotider som hybridiserer for å danne dsRNA-duplekset.

5

10. Sammensetningen ifølge hvilket som helst av kravene 1 eller 6 til 8, eller fremgangsmåten ifølge hvilket som helst av kravene 2 til 4, eller 6 til 8, eller settet ifølge hvilket som helst av kravene 5 til 8,

10

hvor RNA-et som er målrettet mot DNA, er et enkeltmolekyl-RNA som er målrettet mot DNA, og hvor, i det proteinbindende segmentet, de to komplementære strekkene av nukleotider er kovalent bundet av intervenerende nukleotider.

15

11. Fremgangsmåten ifølge hvilket som helst av kravene 2 til 4, eller 6 til 10, hvor opprettelsen av kontakt omfatter å føre (a) det kimære Cas9-polypeptidet eller et polynukleotid som koder for det kimære Cas9-polypeptidet, og (b) RNA-et som er målrettet mot DNA, eller ett eller flere DNA-polynukleotider som koder for RNA-et som er målrettet mot DNA, inn i en celle.

20

12. Sammensetningen ifølge hvilket som helst av kravene 1 eller 6 til 10, eller fremgangsmåten ifølge krav 11, eller settet ifølge hvilket som helst av kravene 5 til 10,

hvor

25

(b) ett eller flere DNA-polynukleotider som koder for RNA-et som er målrettet mot DNA, er en eller flere rekombinante ekspresjonsvektorer; og/eller

(b) ett eller flere polynukleotider som koder for det kimære Cas9-polypeptidet, er en eller flere rekombinante ekspresjonsvektorer.

30

13. Sammensetningen, fremgangsmåten eller settet ifølge krav 12, hvor den ene eller de flere rekombinante ekspresjonsvektorene er en eller flere virale vektorer.

35

14. Sammensetningen ifølge hvilket som helst av kravene 1, eller 6 til 10, eller 12 til 13, eller fremgangsmåten ifølge hvilket som helst av kravene 2 til 4, eller 6 til 13, eller settet ifølge hvilket som helst av kravene 5 til 10 eller 12 til 13,

hvor RNA-et som er målrettet mot DNA, omfatter en eller flere av en modifisert nukleobase, en modifisert hovedkjede eller ikke-naturlig internukleosidbinding, en modifisert sukkerdel, en låst nukleinsyre, eller en peptidnukleinsyresyre.

- 5 **15.** Sammensetningen ifølge hvilket som helst av kravene 1, eller 6 til 10, eller 12 til 14, eller fremgangsmåten ifølge hvilket som helst av kravene 2 til 4, eller 6 til 14, eller settet ifølge hvilket som helst av kravene 5 til 10 eller 12 til 14, hvor mål-DNA-et er til stede i en bakteriecelle, en arkecelle, en enkeltcellet eukaryotisk organisme, en plantecelle, en celle fra et virvelløst dyr eller en celle fra et virveldyr.
- 10
- 16.** Sammensetningen ifølge hvilket som helst av kravene 1, eller 6 til 10, 12 til 15, eller fremgangsmåten ifølge hvilket som helst av kravene 2 til 4, eller 6 til 15, eller settet ifølge hvilket som helst av kravene 5 til 10, eller 12 til 15, hvor mål-DNA-et er kromosomalt DNA.
- 15
- 17.** Sammensetningen ifølge hvilket som helst av kravene 1, eller 6 til 10, eller 12 til 16, eller fremgangsmåten ifølge hvilket som helst av kravene 2, eller 6 til 16, eller settet ifølge hvilket som helst av kravene 5 til 10, eller 12 til 16, hvor det heterologe polypeptidet har DNA-modifiserende aktivitet, der aktiviteten er valgt fra: metyltransferaseaktivitet, demetylaseaktivitet, DNA-reparasjonsaktivitet, DNA-skadeaktivitet, deamineringsaktivitet, dismutaseaktivitet, alkyleringsaktivitet, depurineringsaktivitet, oksideringsaktivitet, pyrimidindimerdannelseaktivitet, integraseaktivitet, transposaseaktivitet, rekombinaseaktivitet, polymeraseaktivitet, ligaseaktivitet, 25 helikaseaktivitet, fotolyaseaktivitet eller glykosylaseaktivitet.
- 18.** Sammensetningen ifølge hvilket som helst av kravene 1, eller 6 til 10, eller 12 til 16, eller fremgangsmåten ifølge hvilket som helst av kravene 3, eller 6 til 30 16, eller settet ifølge hvilket som helst av kravene 5 til 10, eller 12 til 16, hvor det heterologe polypeptidet utviser evnen til å øke eller redusere transkripsjon, og hvor det heterologe polypeptidet er et transkripsjonal aktivator- eller transkripsjonal repressor-polypeptid.
- 35 **19.** Sammensetningen ifølge hvilket som helst av kravene 1, eller 6 til 10, eller 12 til 16, eller fremgangsmåten ifølge hvilket som helst av kravene 4, eller 6 til 16, eller settet ifølge hvilket som helst av kravene 5 til 10, eller 12 til 16,

hvor det heterologe polypeptidet har enzymatisk aktivitet som modifierer et polypeptid assosiert med DNA, der aktiviteten er histonmodifiserende aktivitet.

5 **20.** Sammensetningen ifølge hvilket som helst av kravene 1, eller 6 til 10, eller 12 til 16, eller 19, eller fremgangsmåten ifølge hvilket som helst av kravene 4, eller 6 til 16, eller 19, eller settet ifølge hvilket som helst av kravene 5 til 10, eller 12 til 16, eller 19,

10 hvor det heterologe polypeptidet har enzymatisk aktivitet som modifierer et polypeptid assosiert med DNA, der aktiviteten er valgt fra: metyltransferaseaktivitet, demetylaseaktivitet, acetyltransferaseaktivitet, deacetylaseaktivitet, kinaseaktivitet, fosfataseaktivitet, ubiquitinligaseaktivitet, deubiquitinasjonsaktivitet, adenylasjonsaktivitet, deadenylasjonsaktivitet, SUMOylasjonsaktivitet, deSUMOylasjonsaktivitet, ribosylasjonsaktivitet, deribosylasjonsaktivitet, myristoylasjonsaktivitet, demyristoylasjonsaktivitet, 15 glykosylasjonsaktivitet (f.eks. fra O-GlcNAc-transferase) eller deglykosylasjonsaktivitet.

20 **21.** Sammensetningen ifølge hvilket som helst av kravene 1, eller 6 til 10, eller 12 til 20, eller settet ifølge hvilket som helst av kravene 5 til 10, eller 12 til 20, for anvendelse i en fremgangsmåte for terapeutisk behandling av en pasient.