



(12) Translation of
European patent specification

(11) NO/EP 3252160 B1

NORWAY

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

Norwegian Industrial Property Office

(45)	Translation Published	2021.04.19
(80)	Date of The European Patent Office Publication of the Granted Patent	2020.10.28
(86)	European Application Nr.	17162030.5
(86)	European Filing Date	2013.12.12
(87)	The European Application's Publication Date	2017.12.06
(30)	Priority	2012.12.12, US, 201261736527 P 2013.01.02, US, 201361748427 P 2013.01.29, US, 201361757972 P 2013.02.25, US, 201361768959 P 2013.03.15, US, 201361791409 P 2013.06.17, US, 201361835931 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	EP2825654, 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 02142-1324, USA President and Fellows of Harvard College, 17 Quincy Street, Cambridge, MA 02138-3876, USA
(72)	Inventor	ZHANG, Feng, 100 Pacific St.Apt. 11, Cambridge, MA 02139, USA BIKARD, David, Olivier, 238 E. 81st St., New York, NY 10028, USA CONG, Le, 100 Memorial Dr.Apt 8-21 B, Cambridge, MA 02142, USA COX, David, Benjamin, Turitz, 375A Harvard St.Apt. 12A, Cambridge, MA 02138, USA HSU, Patrick, 10010 N. Torrey Pines Rd., La Jolla, CA 92037, USA JIANG, Wenyan, 15-08 150 Place, Whitestone, NY 11357, USA LIN, Shauiliang, 790 Main St.Apt. 12, Cambridge, MA 02139, USA MARRAFFINI, Luciano, 1230 York Ave., New York, NY 10065, USA PLATT, Randall, Jeffrey, 72 Sixth St.Apt. 1, Cambridge, MA 02141, USA RAN, Fei, 30 Clarendon St., Boston, MA 02116, USA SANJANA, Neville, Espi, 4 Washington Square VLG Apt 16L, New York, NY 10012-1910, USA

(74) Agent or Attorney TANDBERG INNOVATION AS, Postboks 1570 Vika, 0118 OSLO, Norge

-
- (54) Title **CRISPR-CAS COMPONENT SYSTEMS, METHODS AND COMPOSITIONS FOR SEQUENCE MANIPULATION**
- (56) References
Cited:
- WO-A1-2014/065596
 WO-A1-2013/176772
 WO-A1-2008/093152
 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
 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
 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
 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
 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
 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, XP055067744, ISSN: 0036-8075, DOI: 10.1126/science.1231143

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 Clustered Regularly Interspersed Short
5 Palindromic Repeats (CRISPR)-system, hvor CRISPR-systemet omfatter:

- et Cas9-protein som omfatter en eller flere kjernelokaliseringssekvenser (NLS);
- en styresekvens som er knyttet til en tracr-mate-sekvens, og
- en tracr-sekvens som er 30 eller flere nukleotider i lengden;

hvor styresekvensen dirigerer sekvensspesifikk binding av et CRISPR-kompleks til en
10 målsekvens i en eukaryotisk celle.

2. Sammensetningen ifølge krav 1, hvor nevnte styresekvens, tracr-mate og tracr-sekvens er omfattet innenfor et kimært RNA.

3. Sammensetningen ifølge krav 1 eller 2, hvor nevnte Cas9 styrer spaltning av en eller
15 to strenger på stedet av målsekvensen.

4. Sammensetningen ifølge krav 3, hvor nevnte Cas9 er mutert i forhold til et tilsvarende
vill-type enzym slik at nevnte muterte Cas9 mangler evnen til å spalte en eller begge
20 strengene av et målpolynukleotid som inneholder en målsekvens.

5. Sammensetningen ifølge krav 4, hvor nevnte Cas9 omfatter en mutasjon som er valgt
fra gruppen som består av D10A, H840A, N854A og N863A med referanse til
posisjonsnummereringen av en *Streptococcus pyogenes* Cas9 (SpCas9)-protein.

6. Sammensetningen ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 5, hvor nevnte Cas9
omfatter en eller flere NLS ved aminoterminalen, eller en eller flere NLS ved karboksy-
terminalen, eller en kombinasjon av disse.

7. Sammensetningen ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 6, hvor nevnte Cas9-
sammensetningen omfatter i det minste to NLS-er.

8. Sammensetningen ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 7, hvor nevnte Cas9 er
S. pyogenes, eller *S. thermophilus* Cas9.

9. Sammensetningen ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 8, hvor tracr-sekvensen er 50 eller flere nukleotider i lengden.

10. Sammensetningen ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 9, hvor tracr-sekvensen omfatter en vill-type tracr-sekvens.

11. Sammensetningen ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 10, hvor nevnte Cas9 inkluderer et eller flere heterologe proteindomener.

12. Et Clustered Regularly Interspersed Short Palindromic Repeats (CRISPR)-CRISPR assosiert (Cas)-(CRISPR-Cas)-vektorsystem som omfatter en eller flere vektorer som omfatter:

a) et første regulatorisk element som er operativt koblet til et eller flere elementer av et type-II CRISPR-system som omfatter sekvenser som koder for:

1) en styresekvens som er knyttet til en tracr-mate-sekvens,

2) en tracr-sekvens,

b) et annet regulatorisk element som er operativt koblet til en proteinkodende sekvens som koder for et Cas9-protein som omfatter en eller flere kjernelokaliseringssekvenser (NLS-er);

hvor komponentene (a) og (b) er lokalisert på samme eller forskjellige vektorer av systemet, og hvor hybridisering mellom en målsekvens og en styresekvens fremmer dannelsen av et CRISPR-kompleks i en eukaryotisk celle.

13. Vektorsystemet ifølge krav 12, hvor komponentene (a) og (b) er lokalisert på den samme vektoren.

14. Vektorsystemet ifølge et hvilket som helst av kravene 12 eller 13, hvor nevnte Cas9-proteinet omfatter i det minste to NLS-er.

15. Vektorsystemet ifølge et hvilket som helst av kravene 12 til 14, hvor tracr-sekvensen er 30 eller flere nukleotider i lengden, eventuelt er tracr-sekvensen 50 eller flere nukleotider i lengden.

16. Vektorsystemet ifølge et hvilket som helst av kravene 12 til 15, hvor tracr-sekvensen og tracr-mate-sekvensen er inneholdt i et enkelt transkript, slik at hybridisering mellom de to produserer en sekundær struktur som er en hårnål.

5 **17.** Vektorsystemet ifølge et hvilket som helst av kravene 12 til 16, hvor vektorsystemet koder to eller flere styresekvenser, hvor hver av de to eller flere styresekvensene, når de uttrykkes, retter sekvensspesifikk binding av et CRISPR-kompleks til en annen målsekvens i en eukaryotisk celle.

10 **18.** Vektorsystemet ifølge et hvilket som helst av kravene 12 til 17, hvor vektoren er en viral vektor.

19. Vektorsystemet ifølge krav 18, hvor den virale vektoren er et retrovirus, lentivirus, adenovirus, adeno-assosiert virus eller herpes-simplex virusvektor.

15 **20.** Vektorsystemet ifølge et hvilket som helst av kravene 12 til 19, som omfatter en eller flere pol-III-promotorer.

21. Sammensetningen ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 11, eller
20 vektorsystemet ifølge et hvilket som helst av kravene 12 til 20, for bruk i terapi.

22. Sammensetningen eller vektorsystemet for bruk ifølge krav 21, hvor terapien er genterapi.

25 **23.** Sammensetningen eller vektorsystemet ifølge krav 22, for bruk ved modifisering av et målpolynukleotid i en eukaryotisk celle, hvor fremgangsmåten omfatter å la et CRISPR-kompleks binde til målpolynukleotidet for å bevirke spaltning av nevnte målpolynukleotid, og derved å modifisere målpolynukleotidet.

30 **24.** Bruk av sammensetningen ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 11 eller vektorsystemet ifølge et hvilket som helst av kravene 12 til 20, i produksjonen av et genetisk modifisert ikke-humant dyr, forutsatt at bruken ikke er en fremgangsmåte for behandling av dyrekroppen ved terapi.

35 **25.** Bruk av sammensetningen ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 11 eller vektorsystemet ifølge et hvilket som helst av kravene 12 til 20, i produksjonen av et ikke-humant transgenet dyr eller en transgen plante.

26. En fremgangsmåte for å modifisere et målpolynukleotid i en eukaryotisk celle, hvor fremgangsmåten omfatter å la et CRISPR-kompleks binde nevnte målpolynukleotid for å bevirke spaltning av nevnte målpolynukleotid, og derved å modifisere nevnte målpolynukleotid, hvor CRISPR-komplekset omfatter et Cas9-protein som omfatter et eller flere kjernelokaliseringssekvenser (NLS) som er kompleksbundet med en styresekvens som er hybridisert til en målsekvens i nevnte målpolynukleotid hvor styresekvensen er koblet til en tracr-mate-sekvens som igjen hybridiserer til en tracr-sekvens som er 30 eller flere nukleotider i lengden, hvor fremgangsmåten er ikke en fremgangsmåte for behandling ved terapi av menneskekroppen eller dyrekroppen, og hvor fremgangsmåten ikke er en prosess for å modifisere genetiske identitet av kimbanen av mennesker.

27. En eukaryotisk vertscelle som omfatter den ene eller de flere vektorene av vektorsystemet ifølge et hvilket som helst av kravene 12 til 20.

28. En *ex vivo* eller *in vitro* fremgangsmåte for å modifisere et målpolynukleotid i en eukaryotisk celle, hvor fremgangsmåten omfatter å la et CRISPR-kompleks binde til målpolynukleotidet for å bevirke spaltning av nevnte polynukleotid, og derved å modifisere målpolynukleotidet, hvor CRISPR-komplekset omfatter et Cas9-protein som omfatter et eller flere kjernelokaliseringssekvenser (NLS) som er kompleksbundet med en styresekvens som er hybridisert til en målsekvens i nevnte målpolynukleotid hvor styresekvensen er koblet til en tracr-mate-sekvens som igjen hybridiserer til en tracr-sekvens som er 30 eller flere nukleotider i lengden, hvor nevnte fremgangsmåte er ikke en prosess for å modifisere genetiske identitet av kimbanen av mennesker.

29. Et CRISPR-kompleks for bruk i modifisering av et målpolynukleotid i en eukaryotisk celle i en fremgangsmåte for genterapi, hvor fremgangsmåten omfatter å la et CRISPR-kompleks binde til målpolynukleotidet for å bevirke spaltning av nevnte polynukleotid, og derved å modifisere målpolynukleotidet, hvor CRISPR-komplekset omfatter et Cas9-protein som omfatter en eller flere kjernelokaliseringssekvenser (NLS) som er kompleksbundet med en styresekvens som er hybridisert til en målsekvens i nevnte målpolynukleotid hvor styresekvensen er koblet til en tracr-mate-sekvens som igjen hybridiserer til en tracr-sekvens som er 30 eller flere nukleotider i lengden.