



(12) Translation of
European patent specification

(11) NO/EP 3272867 B1

NORWAY

(19) NO
(51) Int Cl.
C12N 15/10 (2006.01)
C12N 9/22 (2006.01)

Norwegian Industrial Property Office

(21)	Translation Published	2020.01.27
(80)	Date of The European Patent Office Publication of the Granted Patent	2019.09.25
(86)	European Application Nr.	17157024.5
(86)	European Filing Date	2017.02.20
(87)	The European Application's Publication Date	2018.01.24
(30)	Priority	2016.06.02, US, 201662344858 P 2016.07.05, US, 201662358415 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
(73)	Proprietor	Sigma-Aldrich Co. LLC, 3050 Spruce Street, St. Louis, MO 63103, USA
(72)	Inventor	Chen, Fuqiang, 3050 Spruce Street, St. Louis, MO 63103, USA
(74)	Agent or Attorney	BRYN AARFLOT AS, Stortingsgata 8, 0161 OSLO, Norge

(54)	Title	USING PROGRAMMABLE DNA BINDING PROTEINS TO ENHANCE TARGETED GENOME MODIFICATION
------	-------	--

(56)	References Cited:	WO-A1-2014/191518 WO-A1-2016/036754 WO-A2-2016/073990 WO-A1-2017/070598 WO-A1-2016/007604 WO-A1-2014/089290 WO-A1-2017/096328 BERND ZETSCHKE ET AL: "Cpf1 Is a Single RNA-Guided Endonuclease of a Class 2 CRISPR-Cas System", CELL, vol. 163, no. 3, 1 October 2015 (2015-10-01), pages 759-771, XP055267511, US ISSN: 0092-8674, DOI: 10.1016/j.cell.2015.09.038 F. ANN RAN ET AL: "Double Nicking by RNA-Guided CRISPR Cas9 for Enhanced Genome Editing Specificity", CELL, vol. 154, no. 6, 1 September 2013 (2013-09-01), pages 1380-1389, XP55299681, US ISSN: 0092-8674, DOI: 10.1016/j.cell.2013.08.021 CHEN FUQIANG ET AL: "Targeted activation of diverse CRISPR-Cas systems for mammalian genome editing via proximal CRISPR targeting.", NATURE COMMUNICATIONS APRIL 07 2017, vol. 8, 7 April 2017 (2017-04-07), pages 1-12, XP002776524, ISSN: 2041-1723, DOI:
------	----------------------	--

10.1038/ncomms14958 -& CHEN FUQIANG ET AL: "Supplementary Information: Targeted activation of diverse CRISPR-Cas systems for mammalian genome editing via proximal CRISPR targeting", NATURE COMMUNICATIONS, vol. 8, no. 14958, 7 April 2017 (2017-04-07), pages 1-18, XP002776525, ISSN: 2041-1723, DOI: 10.1038/ncomms14958

Anonymous: "Using Cpf1 for CRISPR . Benchling", , 1 January 2015 (2015-01-01), pages 1-4, XP55396832, Retrieved from the Internet: URL:<https://benchling.com/pub/cpf1> [retrieved on 2017-08-08]

INES FONFARA ET AL: "The CRISPR-associated DNA-cleaving enzyme Cpf1 also processes precursor CRISPR RNA", NATURE, vol. 532, 20 April 2016 (2016-04-20), pages 517-521, XP55349049, ISSN: 0028-0836, DOI: 10.1038/nature17945

CHRISTOPHER D RICHARDSON ET AL: "Enhancing homology-directed genome editing by catalytically active and inactive CRISPR-Cas9 using asymmetric donor DNA", NATURE BIOTECHNOLOGY (ADVANCE ONLINE PUBLICATION), vol. 34, no. 3, 20 January 2016 (2016-01-20), pages 339-344, XP055401340, ISSN: 1087-0156, DOI: 10.1038/nbt.3481 -&

CHRISTOPHER D RICHARDSON ET AL: "Supplementary Information: Enhancing homology-directed genome editing by catalytically active and inactive CRISPR-Cas9 using asymmetric donor DNA", NATURE BIOTECHNOLOGY (ADVANCE ONLINE PUBLICATION), vol. 34, no. 3, 20 January 2016 (2016-01-20), pages 339-344, XP055401621, ISSN: 1087-0156, DOI: 10.1038/nbt.3481

ROBERT D. FAGERLUND ET AL: "The Cpf1 CRISPR-Cas protein expands genome-editing tools", GENOME BIOLOGY, vol. 523, no. 1, 17 December 2015 (2015-12-17), page 481, XP55271439, GB ISSN: 1465-6906, DOI: 10.1186/s13059-015-0824-9

FUQIANG CHEN ET AL: "Improving CRISPR Gene Editing Efficiency by Proximal dCas9 Targeting", BIO-PROTOCOL, vol. 7, no. 15, 5 August 2017 (2017-08-05) , XP55432655, ISSN: 2331-8325, DOI: 10.21769/BioProtoc.2432

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 RNA-guidet clustered regularly interspersed short palindromic repeats (CRISPR) nukleasesystem eller nukleinsyre som koder for CRISPR-nukleasesystemet, hvori CRISPR-nukleasesystemet omfatter (i) et programmerbart DNA-modifiseringsprotein som er et CRISPR-protein, og (ii) et guide-RNA; og

(b) minst ett katalytisk inaktivt CRISPR-system eller nukleinsyre som koder for det minst ene katalytisk inaktive CRISPR-systemet, hvori hvert katalytisk inaktive CRISPR-system omfatter (i) et programmerbart DNA-bindende protein som er et katalytisk inaktivt CRISPR-protein og (ii) et guide-RNA; og hvori

(x) det programmerbare DNA-modifiseringsproteinet er et CRISPR-protein av type II og det minst ene programmerbare DNA-bindende proteinet er et CRISPR-protein av type II, eller

(y) det programmerbare DNA-modifiseringsproteinet er et CRISPR-protein av type V og det minst ene programmerbare DNA-bindende proteinet er et CRISPR-protein av type II; og hvori

sammensetningen som definert ovenfor er ikke beskrevet i WO2017/070598 eller WO2017/096328.

2. Sammensetningen ifølge krav 1, hvori (i) CRISPR-proteinet av type II velges fra *Francisella novicida* CRISPR-Cas9 (FnCas9), *Campylobacter jejuni* CRISPR-Cas9 (CjCas9) og *Streptococcus pyogenes* CRISPR-Cas9 (SpCas9); og/eller (ii) CRISPR-proteinet av type V er *Francisella novicida* CRISPR-Cpf1 (FnCpf1).

3. Sammensetningen ifølge krav 1 eller krav 2, hvori det minst ene programmerbare DNA-bindende proteinet er et CRISPR-protein av Cas9 type II, hvori Cas9-proteinet har én eller flere mutasjoner i hvert av det RuvC-lignende domenet og det HNH-lignende domenet.

4. Sammensetningen ifølge krav 3, hvori (i) den ene eller flere mutasjonene i det RuvC-lignende domenet er D10A, D8A, E762A og/eller D986A; og/eller (ii) den ene eller flere mutasjonene i det HNH-lignende domenet er H840A, H559A, N854A, N856A, og/eller N863A.

5. Sammensetningen ifølge et hvilket som helst foregående krav, hvori nukleinsyre som koder for hvert CRISPR-protein er mRNA eller DNA.
6. Sammensetningen ifølge et hvilket som helst foregående krav, hvori nukleinsyre som koder for hvert CRISPR-protein, er del av en plasmidvektor eller en viral vektor.
7. Sammensetningen ifølge et hvilket som helst foregående krav, hvori nukleinsyre som koder for hvert guide-RNA, er del av en plasmidvektor eller en viral vektor.
8. Sammensetningen ifølge et hvilket som helst foregående krav, hvori guide-RNA-et for hvert CRISPR-system er (a) enzymatisk syntetisert eller (b) er i det minste delvis kjemisk syntetisert.
9. Sett omfattende sammensetningen ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 8.
10. In vitro-fremgangsmåte for å øke målrettet genommodifiseringseffektivitet og/eller spesifisitet i en eukaryotisk celle, fremgangsmåten omfattende innføring i den eukaryote cellen av en sammensetning omfattende:
- (a) et RNA-guidet clustered regularly interspersed short palindromic repeats (CRISPR) nukleasesystem eller nukleinsyre som koder for CRISPR-nukleasesystemet, hvori CRISPR-nukleasesystemet omfatter (i) et programmerbart DNA-modifiseringsprotein som er et CRISPR-protein, og (ii) et guide-RNA; og
- (b) minst ett katalytisk inaktivt CRISPR-system eller nukleinsyre som koder for det minst ene katalytisk inaktive CRISPR-systemet, hvori hvert katalytisk inaktive CRISPR-system omfatter (i) et programmerbart DNA-bindende protein som er et katalytisk inaktivt CRISPR-protein og (ii) et guide-RNA; og hvori
- (x) det programmerbare DNA-modifiseringsproteinet er et CRISPR-protein av type II og det minst ene programmerbare DNA-bindende proteinet er et CRISPR-protein av type II, eller
- (y) det programmerbare DNA-modifiseringsproteinet er et CRISPR-protein av type V og det minst ene programmerbare DNA-bindende proteinet er et CRISPR-protein av type II; hvori det programmerbare DNA-modifiseringsproteinet er målrettet mot en kromosomal målsekvens og hvert av det minst ene programmerbare DNA-bindende proteinet er målrettet mot et sted proksimalt til den kromosomale målsekvensen, og binding av det minst

ene programmerbare DNA-bindende proteinet til stedet proksimalt til målkromosomalsekvensen øker tilgjengeligheten av det programmerbare DNA-modifiseringsproteinet til målkromosomalsekvensen, og øker derved målrettet genommodifiseringseffektivitet og/eller -spesifisitet.

5

11. In vitro-fremgangsmåten ifølge krav 10, hvori stedet proksimalt til målkromosomalsekvensen er lokalisert i omtrent 250, omtrent 100, omtrent 75, omtrent 50 eller omtrent 25 basepar på hver side av målkromosomalsekvensen.

10 12. In vitro-fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av kravene 10 eller 11, hvori den eukaryote cellen er en pattedyrceelle, hvori pattedyrceellen er en human celle eller en ikke-human celle.

15 13. In vitro-fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av kravene 10 til 12, hvori (i) CRISPR-protein av type II velges fra *Francisella novicida* CRISPR-Cas9 (FnCas9), *Campylobacter jejuni* CRISPR-Cas9 (CjCas9) og *Streptococcus pyogenes* CRISPR-Cas9 (SpCas9); og/eller (ii) CRISPR-protein av type V er *Francisella novicida* CRISPR-Cpf1(FnCpf1).

20 14. In vitro-fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av kravene 10 til 13, hvori det minst ene programmerbare DNA-bindende proteinet er et CRISPR-protein av Cas9 type II, hvori Cas9-protein har én eller flere mutasjoner i hvert av det RuvC-lignende domenet og det HNH-lignende domenet.

25 15. In vitro-fremgangsmåten ifølge krav 14, hvori (i) den ene eller flere mutasjonene i det RuvC-lignende domenet er D10A, D8A, E762A og/eller D986A; og/eller (ii) den ene eller flere mutasjonene i det HNH-lignende domenet er H840A, H559A, N854A, N856A, og/eller N863A.

30 16. In vitro-fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av kravene 10 til 15, hvori nukleinsyre som koder for hvert CRISPR-protein er mRNA eller DNA.

17. In vitro-fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av kravene 10 til 16, hvori nukleinsyre som koder for hvert CRISPR-protein er del av en plasmidvektor eller en viral vektor.
- 5 18. In vitro-fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av kravene 10 til 17, hvori nukleinsyre som koder for hvert guide-RNA er del av en plasmidvektor eller en viral vektor.
- 10 19. In vitro-fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av kravene 10 til 18, hvori guide-RNA-et for hvert CRISPR-system er (a) enzymatisk syntetisert eller (b) er i det minste delvis kjemisk syntetisert.
20. Sammensetning ifølge et hvilket som helst av kravene 1-8, eller sett ifølge krav 9, for anvendelse i terapi.
- 15 21. Sammensetning ifølge et hvilket som helst av kravene 1-8, eller sett ifølge krav 9, for anvendelse i behandling av sigdcellesykdom, talassemi, alvorlig kombinert immunsvikt (SCID), Huntingtons sykdom eller retinitis pigmentosa.