



(12) Translation of
European patent specification

(11) NO/EP 3291679 B1

NORWAY

(19) NO
(51) Int Cl.
A01N 63/00 (2020.01)
A61K 31/7105 (2006.01)
C12N 9/16 (2006.01)
C12N 15/113 (2010.01)

Norwegian Industrial Property Office

(45)	Translation Published	2022.03.07
(80)	Date of The European Patent Office Publication of the Granted Patent	2021.12.15
(86)	European Application Nr.	16719873.8
(86)	European Filing Date	2016.05.03
(87)	The European Application's Publication Date	2018.03.14
(30)	Priority	2015.05.06, GB, 201507773 2015.05.06, GB, 201507774 2015.05.06, GB, 201507775 2015.05.06, GB, 201507776 2015.05.17, GB, 201508461 2015.05.31, GB, 201509366 2015.06.20, GB, 201510891 2015.10.17, GB, 201518402 2016.01.10, GB, 201600417 2016.01.10, GB, 201600418
(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	SNIPR Technologies Limited, Kemp House 152 City Road, London EC1V 2NX, Storbritannia
(72)	Inventor	CLUBE, Jasper, Kemp House 152 City Road, London EC1V 2NX, Storbritannia SOMMER, Morten, c/o SNIPR Biome ApS Lersø Parkallé 44, 2100 Copenhagen, Danmark GRØNDAHL, Christian, c/o SNIPR Biome ApS Lersø Parkallé 44, 2100 Copenhagen, Danmark VAN DER HELM, Eric, c/o SNIPR Biome ApS Lersø Parkallé 44, 2100 Copenhagen, Danmark VAZQUEZ-URIBE, Ruben, c/o SNIPR Biome ApS Lersø Parkallé 44, 2100 Copenhagen, Danmark
(74)	Agent or Attorney	BRYN AARFLOT AS, Stortingsgata 8, 0161 OSLO, Norge

(54)	Title	ALTERING MICROBIAL POPULATIONS & MODIFYING MICROBIOTA
(56)	References Cited:	WO-A1-2014/124226 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, XP055229606, US ISSN: 0036-8075, DOI: 10.1126/science.1225829

Z. XIE ET AL: "Development of a Tunable Wide-Range Gene Induction System Useful for the Study of Streptococcal Toxin-Antitoxin Systems", APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, vol. 79, no. 20, 9 August 2013 (2013-08-09), pages 6375-6384, XP055281880, US ISSN: 0099-2240, DOI: 10.1128/AEM.02320-13

KIMBERLEY D. SEED ET AL: "A bacteriophage encodes its own CRISPR/Cas adaptive response to evade host innate immunity", NATURE, vol. 494, no. 7438, 27 February 2013 (2013-02-27), pages 489-491, XP055281884, United Kingdom ISSN: 0028-0836, DOI: 10.1038/nature11927 cited in the application

ROBERT J CITORIK ET AL: "Sequence-specific antimicrobials using efficiently delivered RNA-guided nucleases", NATURE BIOTECHNOLOGY, NATURE PUBLISHING GROUP, US, vol. 32, no. 11, 1 November 2014 (2014-11-01), pages 1141-1145, XP002742964, ISSN: 1087-0156, DOI: 10.1038/NBT.3011 [retrieved on 2014-09-21]

KURT SELLE ET AL: "Harnessing CRISPR-Cas systems for bacterial genome editing", TRENDS IN MICROBIOLOGY., vol. 23, no. 4, 1 April 2015 (2015-04-01), pages 225-232, XP055281790, GB ISSN: 0966-842X, DOI: 10.1016/j.tim.2015.01.008

A. A. GOMAA ET AL: "Programmable Removal of Bacterial Strains by Use of Genome-Targeting CRISPR-Cas Systems", MBIO, vol. 5, no. 1, 28 January 2014 (2014-01-28), pages e00928-13, XP055227960, DOI: 10.1128/mBio.00928-13

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 nukleinsyrevektor som omfatter en konstruert vertsmodifiserende (HM) CRISPR-matrise for anvendelse i behandling eller forebygging, hos et menneske eller dyr, en tilstand eller sykdom mediert av bakterielle vertsceller ved å endre det relative forholdet mellom underpopulasjoner av første og andre bakterier i en blandet populasjon av bakterier, den andre bakterien omfatter vertsceller, hvori den blandede populasjonen er omfattet av individet,

hvori den andre underpopulasjonen består av en annen bakterieart enn den til den første underpopulasjonen,
 hvori hver vertscelle har en vertsmålesekvens og minst én nukleinsyresekvens som koder for en Cas-nuklease endogen for vertscellen,
 hvori den konstruerte vertsmodifiserende (HM) CRISPR-matrisen omfatter en spacer-sekvens (HM-spacer) og repetisjoner som koder for et HM-crRNA, hvor HM-crRNA omfatter en sekvens som er i stand til å hybridisere til vertsmålesekvensen;
 hvor vektoren kan transformere vertscellen,
 hvori HM-crRNA leder Cas-nukleasen til målet for å modifisere målesekvensen i vertscellen, hvorved vertscellen blir drept eller vertscellevekst reduseres,
 hvori nukleinsyrevektoren er en plasmidvektor omfattet av en bærerbakterie, eller vektoren er en fagvektor.

2. En nukleinsyrevektor som omfatter en konstruert vertsmodifiserende (HM) CRISPR-matrise og en nukleinsyresekvens som koder for en Cas-nuklease for anvendelse ved behandling eller forebygging hos et menneske eller dyr en tilstand eller sykdom mediert av bakterielle vertsceller ved å endre det relative forholdet mellom underpopulasjoner av første og andre bakterier i en blandet populasjon av bakterier, den andre bakterien omfatter vertsceller, hvori den blandede populasjonen er omfattet av individet,

hvori den andre underpopulasjonen består av en annen bakterieart enn den første underpopulasjonen,
 hvor hver vertscelle har en vertsmålesekvens,
 hvor vektoren kan transformere vertscellen,
 hvori den konstruerte vertsmodifiserende (HM) CRISPR-matrisen omfatter en spacer-sekvens (HM-spacer) og repetisjoner som koder for et HM-crRNA, HM-crRNA omfatter en sekvens som er i stand til å hybridisere til vertsmålesekvensen,
 hvori HM-crRNA leder Cas-nukleasen til målet for å modifisere målesekvensen i vertscellen, hvorved vertscellen blir drept eller vertscellevekst reduseres,
 hvori nukleinsyrevektoren er en plasmidvektor omfattet av en bærerbakterie, eller vektoren er en fagvektor.

3. Anvendelse av en nukleinsyrevektor som omfatter en konstruert vertsmodifiserende (HM) CRISPR/Cas-matrise for å endre det relative forholdet mellom underpopulasjoner av første og andre bakterier i en *ex vivo* blandet populasjon av bakterier, den andre bakterien omfatter vertsceller,

hvori den andre underpopulasjonen består av en annen bakterieart enn den første underpopulasjonen,
 hvori hver vertscelle har en vertsmålesekvens og minst én nukleinsyresekvens som koder for en Cas-nuklease endogen for vertscellen,
 hvori den konstruerte vertsmodifiserende (HM) CRISPR-matrisen omfatter en spacer-sekvens (HM-spacer) og repetisjoner som koder for et HM-crRNA, hvor

HM-crRNA omfatter en sekvens som er i stand til å hybridisere til vertsmålesekvensen;
 hvor vektoren kan transformere vertscellen,
 hvori HM-crRNA leder Cas-nukleasen til målet for å modifisere målesekvensen i vertscellen, hvorved vertscellen blir drept eller vertscellevekst reduseres,
 hvori nukleinsyrevektoren er en plasmidvektor omfattet av en bærerbakterie, eller vektoren er en fagvektor.

4. Anvendelse av en nukleinsyrevektor som omfatter en konstruert vertsmodifiserende (HM) CRISPR/Cas-matrise og en nukleinsyresekvens som koder for en Cas-nuklease for å endre det relative forholdet mellom underpopulasjoner av første og andre bakterier i en *ex vivo* blandet populasjon av bakterier, den andre bakterien består av vertsceller,

hvor den andre underpopulasjonen består av en annen bakterieart enn den til den første underpopulasjonen,
 hvor hver vertscelle har en vertsmålesekvens,
 hvor vektoren kan transformere vertscellen,
 hvori den konstruerte vertsmodifiserende (HM) CRISPR-matrisen omfatter en spacer-sekvens (HM-spacer) og repetisjoner som koder for et HM-crRNA, HM-crRNA omfatter en sekvens som er i stand til å hybridisere til vertsmålesekvensen, hvori HM-crRNA leder Cas-nukleasen til målet for å modifisere målesekvensen i vertscellen, hvorved vertscellen blir drept eller vertscellevekst reduseres,
 hvori nukleinsyrevektoren er en plasmidvektor omfattet av en bærerbakterie, eller vektoren er en fagvektor.

5. Anvendelse ifølge krav 3 eller 4 for behandling av en industriell eller et *ex vivo* medisinsk fluid, overflate, apparat eller beholder; eller for behandling av en vannvei, vann, en drikkevare, en matvare eller en kosmetikk, hvori vertscellen(e) er omfattet av eller på fluidet, overflaten, apparatet, beholderen, vannveien, vannet, drikken, matvaren eller kosmetikken.

6. Anvendelse eller vektor for anvendelse ifølge hvilket som helst av de foregående krav, hvori alternativt HM-crRNA og tracrRNA er omfattet av et enkelt guide-RNA (gRNA).

7. Anvendelse eller vektor for anvendelse ifølge hvilket som helst av de foregående krav, hvori vertscellepopulasjonsveksten reduseres med minst 5 ganger sammenlignet med veksten av en populasjon av vertscellene som ikke er transformert med nevnte HM-matrise eller en nukleotidsekvens som koder for nevnte gRNA.

8. Anvendelsen ifølge krav 3, krav 4 eller hvilket som helst av kravene 5-7 når avhengig av krav 3 eller 4, hvori vertscellepopulasjonsvekst på en overflate hemmes.

9. Anvendelse eller vektor for anvendelse ifølge hvilket som helst av kravene 1 eller 3, eller hvilket som helst av kravene 5-8 når avhengig av hvilket som helst av kravene 1 eller 3, hvori hver vektor mangler en Cas-nuklease-kodende sekvens.

10. Anvendelse eller vektor for anvendelse ifølge hvilket som helst av de foregående krav, hvori vektoren omfatter en DNA-sekvens for å uttrykke en tracrRNA-sekvens.

11. Anvendelse eller vektor for anvendelse ifølge hvilket som helst av de foregående krav, hvori den blandede populasjonen omfatter *S. thermophilus*, *L. lactis* og *E. coli*.

12. Anvendelse eller vektor for anvendelse ifølge hvilket som helst av de foregående krav, hvori Cas-nukleasen er en Cas-nuklease av type I, en Cas-nuklease av type II eller

en Cas-nuklease av type III.

13. Vektor for anvendelse, eller anvendelse ifølge hvilket som helst av de foregående krav, hvor vektoren omfatter nukleinsyresekvenser for å uttrykke et flertall forskjellige crRNA-er (f.eks. omfattet av gRNA-er) hvori en første av nevnte crRNA-er er i stand til å hybridisere til en første nukleinsyresekvens i vertscellen; og en andre av crRNAene er i stand til å hybridisere til en andre nukleinsyresekvens i vertscellen, hvori den andre sekvensen er forskjellig fra den første sekvensen; og

- (a) den første sekvensen er omfattet av et antibiotikaresistensgen (eller RNA deriv) og den andre sekvensen er omfattet av et antibiotikaresistensgen (eller RNA deriv); valgfritt hvor genene er forskjellige;
- (b) den første sekvensen er omfattet av et antibiotikaresistensgen (eller RNA deriv) og den andre sekvensen er omfattet av et essensielt eller virulensgen (eller RNA deriv);
- (c) den første sekvensen er omfattet av et essensielt gen (eller RNA deriv) og den andre sekvensen er omfattet av et essensielt eller virulensgen (eller RNA deriv); eller
- (d) den første sekvensen er omfattet av et virulensgen (eller RNA deriv) og den andre sekvensen er omfattet av et essensielt eller virulensgen (eller RNA deriv).

14. Vektor for anvendelse, eller anvendelse ifølge hvilket som helst av kravene 1, 3 og 6-12 når avhengig av krav 1 eller 3, vektoren omfatter mer enn 1,4 kb eksogen DNA-sekvens, hvori det eksogene DNA koder for én eller flere komponenter av et CRISPR/Cas-system og omfatter en konstruert oppstilling for å uttrykke HM-crRNA eller gRNA i vertsceller; hvori minst 2 forskjellige cRNA-er eller gRNA-er er kodet av det eksogene DNA-et (f.eks. av minst 2 HM-CRISPR-matriser).

15. Vektor for anvendelse, eller anvendelse ifølge hvilket som helst av kravene 1, 3 og 6-14 når avhengig av krav 1 eller 3, hvori vektoren mangler en nukleotidsekvens som koder for en Cas-nuklease som er knyttet til cRNA(ene) eller gRNA(er).