



(12) Translation of
European patent specification

(11) NO/EP 3327127 B1

NORWAY

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

Norwegian Industrial Property Office

- (45) Translation Published 2021.09.13
- (80) Date of The European Patent Office Publication of the Granted Patent 2021.03.24
- (86) European Application Nr. 17199166.4
- (86) European Filing Date 2013.12.12
- (87) The European Application's Publication Date 2018.05.30
- (30) Priority 2012.12.12, US, 201261736527 P 2013.04.20, US, 201361814263 P
2013.01.02, US, 201361748427 P 2013.05.06, US, 201361819803 P
2013.01.30, US, 201361758468 P 2013.05.28, US, 201361828130 P
2013.02.25, US, 201361769046 P 2013.06.17, US, 201361835931 P
2013.03.15, US, 201361791409 P 2013.06.17, US, 201361836123 P
2013.03.15, US, 201361802174 P 2013.07.17, US, 201361847537 P
2013.03.28, US, 201361806375 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 EP2931897, 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 02139, USA
President and Fellows of Harvard College, 17 Quincy Street, Cambridge, MA 02138, USA
- (72) Inventor Zhang, Feng, 100 Pacific StreetApt. 11, Cambridge, MA 02139, USA
Heidenreich, Matthias, 100 Pier 4 Blvd, Apt. 1719, Boston, MA 02210, USA
Ran, Fei, 30 Claredon Street, Boston, MA 02116, USA
Swiech, Lukasz, 6 Greenwich StreetApt. 3, Boston, MA 02120, USA
- (74) Agent or Attorney TANDBERG INNOVATION AS, Postboks 1570 Vika, 0118 OSLO, Norge
-
- (54) Title **DELIVERY, ENGINEERING AND OPTIMIZATION OF SYSTEMS, METHODS AND COMPOSITIONS FOR SEQUENCE MANIPULATION AND THERAPEUTIC APPLICATIONS**
- (56) References
Cited: L. CONG ET AL: "Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems", SCIENCE, vol. 339, no. 6121, 3 January 2013 (2013-01-03), 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

JIANG WENYAN ET AL: "RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems", NATURE BIOTECHNOLOGY,, vol. 31, no. 3, 29 January 2013 (2013-01-29), pages 233-239, XP002699849,

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

PRASHANT MALI ET AL: "Supplementary Materials for RNA-Guided Human Genome Engineering via Cas9", INTERNET CITATION, 15 February 2013 (2013-02-15), pages 1-36, XP002723674, ISSN: 0036-8075 Retrieved from the Internet:
URL:<http://www.sciencemag.org/content/supp/l/2013/01/03/science.1232033.DC1> [retrieved on 2013-01-03]

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

P. MALI ET AL: "RNA-Guided Human Genome Engineering via Cas9", SCIENCE, vol. 339, no. 6121, 15 February 2013 (2013-02-15), pages 823-826, XP055159412, ISSN: 0036-8075, DOI: 10.1126/science.1232033

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

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 CRISPR-kompleks, som omfatter

a) et *Staphylococcus aureus* Cas9 (SaCas9) som omfatter én eller flere kjernelokaliseringssekvenser

b) et guide-RNA som omfatter en guide-sekvens som er i stand til å hybridisere til en målsekvens i en eukaryot celle eller en celle i en flercellet eukaryot organisme, en tracr-mate-sekvens og en tracr-sekvens,

for bruk i terapi.

2. En sammensetning som omfatter:

I. en polynukleotid som omfatter (a) guide-sekvensen, (b) tracr-mate-sekvensen og (c) tracr-sekvensen, hvor (a), (b) og (c) er anordnet i en 5` til 3` orientering, som er en

CRISPR-Cas-system kimærisk RNA (chiRNA) polynukleotidsekvens, og

II. en polynukleotidsekvens som koder SaCas9,

hvor, når den blir transkribert, SaCas9 blir kompleksert med guide-RNA til å forme CRISPR-komplekset, tracr-mate-sekvensen hybridiserer til tracr-sekvensen og guide-sekvensen leder sekvens-spesifikk binding av et CRISPR-kompleks til målsekvensen og polynukleotidet som koder SaCas9 er DNA eller RNA for bruk i terapi.

3. En sammensetning som omfatter:

I. et polynukleotid som omfatter guide-sekvensen og tracr-mate-sekvensen,

II. et polynukleotid som koder SaCas9, og

III. et polynukleotid som omfatter tracr-sekvensen,

hvor, når den blir transkribert, SaCas9 blir kompleksert med guide-RNA til å forme CRISPR-komplekset, tracr-mate-sekvensen hybridiserer til tracr-sekvensen og guide-sekvensen leder sekvens-spesifikk binding av et CRISPR-kompleks til målsekvensen og polynukleotidet som koder SaCas9 er DNA eller RNA for bruk i terapi.

4. En sammensetning ifølge krav 2 eller 3, som omfatter ett eller flere regulatoriske

elementer, én eller flere nukleotidsekvenser som hver koder guide RNA og/eller SaCas9, hvor det ene eller de flere regulatoriske elementene driver ekspresjon eller transkripsjon av nukleotidsekvensene, og guide-RNA leder sekvens-spesifikk binding av et CRISPR-

kompleks til målsekvensen i en eukaryot celle eller en celle i en flercellet eukaryot organisme, hvor SaCas9 som er kompleksert med (1) guide-sekvensen som er hybridisert til målsekvensen, og (2) tracr-mate-sekvensen som er hybridisert til tracr-sekvensen, hvor et CRISPR-kompleks er tilveiebragt og systemet, når det ikke blir forsynt av

nukleotidsekvensene som ekspresseres eller transkriberes, inkluderer én eller flere guide-RNA og/eller Cas9-proteiner for bruk i terapi.

5. En sammensetning for bruk i terapi ifølge krav 2, som omfatter et vektorsystem som omfatter én eller flere vektorer som omfatter:

I. et første regulatorisk element som er operativt koblet til CRISPR-Cas-system kimærisk RNA (chiRNA) polynukleotid-sekvensen, og

II. et andre regulatorisk element som er operativt koblet til et SaCas9-kodingsekvens som koder et CRISPR-enzym som omfatter i det minste én eller flere

kjernelokaliseringssekvenser, hvor komponentene I og II er lokalisert på det same eller forskjellige vektorer av systemet.

6. Sammensetningen for bruk i terapi ifølge krav 3, som er et vektorsystem som omfatter én eller flere vektorer som omfatter

I. et første regulatorisk element som er operativt koblet til (a) polynukleotidsekvensen som koder guide-sekvensen og tracr-mate-sekvensen,

II. et andre regulatorisk element som er operativt koblet til SaCas9-kodingsekvensen, og

III. et tredje regulatorisk element som er operativt koblet til en sekvens som koder trace-sekvensen,

hvor komponentene I, II og III er lokalisert på det samme eller forskjellige vektorer av systemet.

7. Sammensetningen for bruk ifølge krav 5 eller 6, hvor I og II er lokalisert på den same vektoren, eller hvor I, II og III er lokalisert på den same vektoren.

8. Sammensetningen for bruk ifølge et hvilket som helst av kravene 5 til 7, hvor den ene eller de flere vektorene omfatter én eller flere virale vektorer.

9. Sammensetningen for bruk ifølge krav 8, hvor det ene eller de flere virale vektorene omfatter én eller flere lentivirale, bakulovirale, adenovirale eller adeno-assosierte virale (AAV) vektorer.

10. Sammensetningen for bruk ifølge krav 9, hvor AAV-vektoren(e) omfatter AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV8 eller AAV9, eller en hvilken som helst kombinasjon av disse.

11. Sammensetningen for bruk ifølge krav 9 eller krav 10, hvor AAV-vektoren(e) omfatter AAV-serotyper 1, 2, 5 eller et hybrid eller kapsid AAV1, AAV2, AAV5, eller en hvilken som helst kombinasjon av disse for målretting mot hjerne- eller nevronale celler.

12. Sammensetningen for bruk ifølge krav 9 eller krav 10, hvor AAV-vektoren(e) omfatter AAV4 for målretting mot hjertevev.

5 13. Sammensetningen for bruk ifølge krav 9 eller krav 10, hvor AAV-vektoren(e) omfatter AAV1, AAV5, AAV6 eller AAV9 for målretting mot lungeepitel.

14. Sammensetningen for bruk ifølge krav 9 eller krav 10, hvor AAV-vektoren(e) omfatter AAV8 for levering til leveren.

10

15. Sammensetningen for bruk ifølge et hvilket som helst av kravene 9 til 14, hvor den ene eller de flere vektorene omfatter en promoter for å drive ekspresjon av SaCas9-kodende nukleinsyremolekyl, og hvor nevnte promoter er for enten ubikvitær ekspresjon eller vevsspesifikk ekspresjon.

15

16. Sammensetningen for bruk ifølge krav 15, hvor nevnte promoter er for ubikvitær ekspresjon og er en CMV-promoter, en CAG-promoter, en CBh-promoter, en PGK-promoter eller en SV40-promoter, eller promoter for Ferritin med tunge eller lette kjeder.

20

17. Sammensetningen for bruk ifølge krav 15, hvor nevnte promoter er for vevsspesifikk ekspresjon og som leder ekspresjon i et vev omfattende muskel, nevron, ben, hud, blod, lever, bukspyttkjertel eller lymfocytter.

25

18. Sammensetningen for bruk ifølge krav 15, hvor nevnte promoter er for vevsspesifikk ekspresjon og er synapsin-I-promotor for nevroner, CaMKIIalfa-promotor for eksitatoriske nevroner, GAD67 eller GAD65 eller VGAT-promotor for GABAerge nevroner, albumin-promoter for leverekspresjon, SP-B-promotor for lungeekspresjon, ICAM-promotor for endotelceller, IFNbeta eller CD45-promotor for hematopoetiske celler eller OG-2-promotor for osteoblaster.

30

19. Sammensetningen for bruk ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 18, hvor terapien omfatter *ex vivo*-terapi.

35

20. Sammensetningen for bruk ifølge krav 19, hvor *ex vivo*-terapien utføres på stamceller eller iPS-celler.

21. Sammensetningen for bruk ifølge krav 20, hvor stamcellene er HSC'er (hematopoetiske stamceller).

22. Sammensetningen for bruk ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 21, hvor terapien omfatter behandling eller undertrykkelse av en lidelse forårsaket av en gendefekt i et genlocus av interesse.

23. Sammensetningen for bruk ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 22, hvor terapien omfatter behandling av blod- og koagulasjonssykdom eller -lidelse; celledysregulerings- og svulstsykdom eller -lidelse; inflammasjons- og immunrelatert sykdom eller lidelse; metabolsk, lever-, lunge-, nyre- eller proteinsykdom eller -lidelse; muskel-/skjelettsykdom eller -lidelse; nevrologisk eller nevronal sykdom eller lidelse; eller øyesykdom eller -lidelse.

24. Sammensetningen for bruk ifølge krav 23, hvor blod- og koagulasjonssykdommene og -lidelsene omfatter: anemi; Bare lymfocyttsyndrom; blødningslidelse; faktor H og faktor H-liknende 1; faktor V og faktor VIII; faktor VII-mangel; faktor X-mangel; faktor XI-mangel; faktor XII-mangel; faktor XIII A-mangel; faktor XIII B-mangel; Fanconis anemi; hemofagocytisk lymfocytoselidelse; hemofili A; hemofili B; hemorragisk lidelse; leukocytmangel eller -lidelse; sigdcelleanemi eller talassemi.

25. Sammensetningen for bruk ifølge krav 23, hvor celledysregulerings- og svulstsykdommene og -lidelsene omfatter: B-celle ikke-Hodgkin lymfom eller leukemi.

26. Sammensetningen for bruk ifølge krav 23, hvor de inflammasjons- og immunrelaterte sykdommene og lidelsene omfatter AIDS; autoimmun lymfoproliferativt syndrom; kombinert immunsvikt; HIV-1; HIV-mottakelighet eller -infeksjon; immunsvikt; inflammasjon; eller alvorlig kombinert immunsvikt (SCID).

27. Sammensetningen for bruk ifølge krav 23, hvor de metabolske, lever-, nyre og proteinsykdommene og -lidelsene omfatter: amyloid nevropati; amyloidose; TTR-amyloidose (spesifikt ATTR), cystisk fibrose; glukogenlagringssykdom; hepatisk adenom; hepatisk svikt; nevrologisk lidelse; hepatisk lipase-mangel; hepatoblastom, kreft eller karsinom; medullær cystisk nyresykdom; fenylketonuri; polycystisk nyre; eller hepatisk sykdom.

28. Sammensetningen for bruk ifølge krav 23, hvor muskel-/skjelettsykdommene og -lidelsene omfatter: muskeldystrofi; osteoporose; eller muskelatrofi.

29. Sammensetningen for bruk ifølge krav 23, hvor de nevrologiske og nevronale sykdommene og lidelsene omfatter: ALS; Alzheimers sykdom; autisme; fragilt X syndrom; Huntingtons sykdom og sykdomsliknende lidelser; Parkinsons sykdom;

schizofreni; sekretaserelaterte lidelser; trinukleotid repetisjonslidelser; Kennedys sykdom; Friedreichs ataksi; Machado-Josephs sykdom; spinocerebellær ataksi; myotonisk distrofi; Dentatorubral Pallidoluysisk Atrofi-(DRPLA)-sykdom; eller global creb BP-instabilitet.

5

30. Sammensetningen for bruk ifølge krav 23, hvor øyesykdommene og -lidelsene omfatter: aldersrelatert makuladegenerasjon, hornhinne-fordunkling og -dystrofi; cornea plana congenital; glaukom; Lebers congenitale amaurose; retinitis pigmentosa; og/eller makula-dystrofi.

10

31. Sammensetningen for bruk ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 22, hvor terapien omfatter behandling av en postmitotisk lidelse.

32. Sammensetningen for bruk ifølge krav 31, hvor den postmitotiske lidelsen omfatter en nevronlidelse.

15

33. Sammensetningen for bruk ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 22, hvor terapien omfatter behandling av en metabolsk lidelse, amyloidose eller proteinaggregasjonsrelatert sykdom, celleforandring med opphav i genetisk mutasjon eller translokasjon, dominante negative effekter av genmutasjon, eller latent virusinfeksjon, eller målretting mot en kromosomsekvens omfattende SERPINA1 (serpin peptidase-hemmer, klade A (alfa-1 antiproteinase, antitrypsin), element 1).

20

34. Sammensetningen for bruk ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 33, hvor SCas9 omfatter én eller flere mutasjoner i et RuvC1-domene av SaCas9.

25

35. Sammensetningen for bruk ifølge krav 34, hvor SaCas9 er en nickase som leder spalting på lokasjonen til målsekvensen.

36. Sammensetningen for bruk ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 35, som omfatter to eller flere guide-RNA.

30

37. Sammensetningen for bruk ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 33, hvor SaCas9 har endret nukleaseaktivitet sammenliknet med villtype-enzym og eventuelt hvor enzymet videre omfatter én eller flere heterologe funksjonelle domener.

35

38. Sammensetningen for bruk ifølge krav 37, hvor enzymkodingssekvensen koder to eller flere heterologe funksjonelle domener.

39. Sammensetningen for bruk ifølge krav 37 eller krav 38, hvor enzymkodingssekvensen koder en eller flere heterologe funksjonelle domener som er smeltet til SaCas9.

5 40. Sammensetningen for bruk ifølge krav 38 eller krav 39, hvor enzymkodingssekvensen videre omfatter en linker-sekvens mellom hvilke som helst to domener.

41. Sammensetningen for bruk ifølge et hvilket som helst av kravene 37 til 39, hvor det ene eller de flere heterologe funksjonelle domenene har én eller flere av de følgende aktivitetene: metylaseaktivitet, demetylaseaktivitet, transkripsjonsaktiveringsaktivitet, 10 transkripsjonsrepresjonsaktivitet, transkripsjonsfrigivelsesfaktoraktivitet, histonmodifikasjonsaktivitet, RNA-spaltningaktivitet, kjernelokaliseringsaktivitet eller nukleinsyrebindingsaktivitet.

15 42. Sammensetningen for bruk ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 41, omfattende en rekombinasjonstemplat.