



(12) Translation of
European patent specification

(11) NO/EP 3360964 B1

NORWAY

(19) NO
(51) Int Cl.
C12N 15/10 (2006.01)
C12N 9/22 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)

Norwegian Industrial Property Office

(21)	Translation Published	2019.12.09
(80)	Date of The European Patent Office Publication of the Granted Patent	2019.10.02
(86)	European Application Nr.	18156734.8
(86)	European Filing Date	2013.12.05
(87)	The European Application's Publication Date	2018.08.15
(30)	Priority	2012.12.06, US, 201261734256 P 2013.01.30, US, 201361758624 P 2013.02.05, US, 201361761046 P 2013.03.15, US, 201361794422 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
(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 Davis, Gregory D., 3050 Spruce Street, St. Louis, MO 63103, USA
(74)	Agent or Attorney	Nordic Patent Service A/S, Bredgade 30, 1260 KØBENHAVN K, Danmark

(54)	Title	CRISPR-BASED GENOME MODIFICATION AND REGULATION
(56)	References Cited:	WO-A1-2014/099744 WO-A1-2013/176772 WO-A1-2011/146121 WO-A1-2014/065596 US-A1- 2010 076 057 WO-A1-2013/142578 WO-A2-2014/093655 G. GASIUNAS ET AL: "PNAS Plus: Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, vol. 109, no. 39, 25 September 2012 (2012-09-25), pages E2579-E2586, XP055068588, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/pnas.1208507109 LEI S. QI ET AL: "Repurposing CRISPR as an RNA-Guided Platform for Sequence-Specific Control of Gene Expression", CELL, vol. 152, no. 5, 1 February 2013 (2013-02-01), pages 1173-

1183, XP055299671, US ISSN: 0092-8674, DOI: 10.1016/j.cell.2013.02.022
 R. SAPRANAUSKAS ET AL: "The Streptococcus thermophilus CRISPR/Cas system provides immunity in Escherichia coli", NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 39, no. 21, 3 August 2011 (2011-08-03), pages 9275-9282, XP055265024, GB ISSN: 0305-1048, DOI: 10.1093/nar/gkr606
 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 & M. JINEK ET AL: "Supplementary Materials for A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity", SCIENCE, vol. 337, no. 6096, 28 June 2012 (2012-06-28), pages 1-37, XP055067747, US ISSN: 0036-8075, DOI: 10.1126/science.1225829
 MARTIN JINEK ET AL: "RNA-programmed genome editing in human cells", ELIFE, vol. 2, 29 January 2013 (2013-01-29), pages e00471-1, XP055245475, GB ISSN: 2050-084X, DOI: 10.7554/eLife.00471
 DANA CARROLL: "A CRISPR Approach to Gene Targeting", MOLECULAR THERAPY, vol. 20, no. 9, 1 September 2012 (2012-09-01), pages 1658-1660, XP055106489, ISSN: 1525-0016, DOI: 10.1038/mt.2012.171

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. Konstruert RNA-guidet endonukleasekompleks som omfatter:

guide-RNA omfattende

(i) en første region komplementær med et målsted i en eukaryotisk kromosomal

5 sekvens som kan basepares med målstedet, som omfatter fra ca. 10 nukleotider til mer enn ca. 25 nukleotider,

(ii) en andre region som danner en stamme- og løkkestruktur, og

(iii) en tredje region som i det vesentlige er enkeltstrenget,

hvor (i), (ii) og (iii) anordnes i 5'- til 3'-retningen, og guide-RNA-et omfatter to

10 separate molekyler,

hvor et protein-RNA-kompleks dannes mellom guide-RNA-et og et type II

CRISPR/Cas9-protein, som videre omfatter et kjernelokaliseringssignal, og

guide-RNA-et samhandler med type II CRISPR/Cas9-proteinet for å guide proteinet til
15 det spesifikke målstedet.

2. Det konstruerte RNA-guidede endonukleasekomplekset ifølge krav 1, hvor det første
molekylet til guide-RNA-et omfatter den første regionen av guide-RNA-et og halvparten av
stammen av den andre regionen av guide-RNA-et.

20 3. Det konstruerte RNA-guidede endonukleasekomplekset ifølge krav 1 eller krav 2, hvor
det andre molekylet til guide-RNA-et omfatter den andre halvparten av stammen av den andre
regionen av guide-RNA-et og den tredje regionen av guide-RNA-et.

25 4. Det konstruerte RNA-guidede endonukleasekomplekset ifølge et hvilket som helst av
kravene 1–3, hvor den andre regionen av guide-RNA-et er ca. 16 til ca. 60 nukleotider i
lengde.

5. Det konstruerte RNA-guidede endonukleasekomplekset ifølge et hvilket som helst av
kravene 1–4, hvor den tredje regionen av guide-RNA-et er ca. 5 til ca. 60 nukleotider i lengde.

30 6. Det konstruerte RNA-guidede endonukleasekomplekset ifølge et hvilket som helst av
kravene 1–5, hvor type II CRISPR/Cas9-proteinet omfatter kun ett funksjonelt
nukleasedomene.

7. Det konstruerte RNA-guidede endonukleasekomplekset ifølge krav 6, hvori type II CRISPR/Cas9-proteinet omfatter ett ikke-funksjonelt RuvC-lignende domene.
8. Det konstruerte RNA-guidede endonukleasekomplekset ifølge krav 6, hvori type II
5 CRISPR/Cas9-proteinet omfatter ett ikke-funksjonelt HNH-lignende domene.
9. Det konstruerte RNA-guidede endonukleasekomplekset ifølge et hvilket som helst foregående krav, hvori type II CRISPR/Cas9-proteinet er fra en *Streptococcus*-art.
- 10 10. Det konstruerte RNA-guidede endonukleasekomplekset ifølge krav 9, hvori type II CRISPR/Cas9-proteinet er fra *Streptococcus pyogenes*.
11. Det konstruerte RNA-guidede endonukleasekomplekset ifølge et hvilket som helst foregående krav, hvori NLS er lokalisert ved C-enden av den RNA-guidede endonukleasen.
15
12. Det konstruerte RNA-guidede endonukleasekomplekset ifølge et hvilket som helst foregående krav, hvori type II CRISPR/Cas9-proteinet kodes av DNA optimalisert for eukaryotisk ekspresjon.
- 20 13. Det konstruerte RNA-guidede endonukleasekomplekset ifølge krav 12, hvori DNA-et er operativt knyttet til en promotor-kontrollsekvens for eukaryotisk ekspresjon.
14. Det konstruerte RNA-guidede endonukleasekomplekset ifølge krav 12 eller krav 13, hvori DNA-et som koder for den konstruerte RNA-guidede endonukleasen omfattes i en
25 vektor.
15. Det konstruerte RNA-guidede endonukleasekomplekset ifølge et hvilket som helst foregående krav, hvori guide-RNA-et kodes av DNA operativt koblet til en promotorkontrollsekvens for eukaryotisk ekspresjon.
30
16. Det konstruerte RNA-guidede endonukleasekomplekset ifølge krav 15, hvori DNA-et som koder for guide-RNA-et omfattes i en vektor.

17. Det konstruerte RNA-guidede endonukleasekomplekset ifølge et hvilket som helst foregående krav, hvori målstedet er oppstrøms for et tilstøtende protospacermotiv (PAM).

18. Det konstruerte RNA-guidede endonukleasekomplekset ifølge krav 17, hvori PAM-et er rett nedstrøms fra målstedet.

19. Det konstruerte RNA-guidede endonukleasekomplekset ifølge krav 17 eller krav 18, hvori PAM-et er NGG eller NGGNG, hvori N er definert som et hvilket som helst nukleotid.

20. Anvendelse av det konstruerte RNA-guidede endonukleasekomplekset ifølge et hvilket som helst foregående krav, og eventuelt minst ett donorpolynukleotid omfattende en donorsekvens, for å modifisere en kromosomal sekvens, hvori anvendelsen ikke omfatter en prosess for å modifisere den genetiske identiteten til kimbanen til et menneske, hvori anvendelsen ikke omfatter anvendelsen av humane embryoer til industrielle eller kommersielle formål, og hvori fremgangsmåten ikke omfatter en fremgangsmåte for behandling av menneske- eller dyrekroppen ved kirurgi eller behandling.

21. Anvendelsen ifølge krav 20, hvori den kromosomale sekvensen repareres ved en DNA-reparasjonsprosess slik at den kromosomale sekvensen modifiseres ved sletting av minst ett nukleotid, en innsetting av minst ett nukleotid, en substitusjon av minst ett nukleotid, eller en kombinasjon derav.

22. Anvendelsen ifølge krav 21, hvori DNA-reparasjonsprosessen er en ikke-homolog endesammenføyende (NHEJ) reparasjonsprosess.

23. Anvendelsen ifølge krav 21, videre omfattende et donorpolynukleotid omfattende oppstrøms og nedstrøms sekvenser, hvori DNA-reparasjonsprosessen er homologiguidet reparasjon (HDR), og donorsekvensen integreres i den kromosomale sekvensen.

24. Anvendelsen ifølge et hvilket som helst av kravene 20–23, hvori den kromosomale sekvensen er i en eukaryotisk celle, hvori den eukaryote cellen er en human celle, en ikke-human pattedyrceelle eller en ikke-pattedyrvirvelcelle.

25. Anvendelsen ifølge et hvilket som helst av kravene 20–23, hvori den kromosomale sekvensen er i en eukaryotisk celle, hvori den eukaryote cellen er en virvelløs celle, en insektcelle, en plantecelle, en gjærceelle eller en eukaryotisk enkeltcelleorganisme.

5 26. Anvendelsen ifølge krav 25, hvori den eukaryote cellen er en plantecelle.

27. Anvendelsen ifølge et hvilket som helst av kravene 20–23, hvori den kromosomale sekvensen er i et ikke-humant pattedyrembryo.