



(12) Translation of  
European patent specification

(11) NO/EP 3363902 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                                                      | 2020.02.03                                                                                                                                                                                        |
| (80) | Date of The European<br>Patent Office Publication of<br>the Granted Patent | 2019.11.27                                                                                                                                                                                        |
| (86) | European Application Nr.                                                   | 18160519.7                                                                                                                                                                                        |
| (86) | European Filing Date                                                       | 2013.12.05                                                                                                                                                                                        |
| (87) | The European Application's<br>Publication Date                             | 2018.08.22                                                                                                                                                                                        |
| (30) | Priority                                                                   | 2012.12.06, US, 201261734256 P<br>2013.01.30, US, 201361758624 P<br>2013.02.05, US, 201361761046 P<br>2013.03.15, US, 201361794422 P                                                              |
| (84) | Designated Contracting<br>States:                                          | AL ; AT ; BE ; BG ; CH ; CY ; CZ ; DE ; DK ; EE ; ES ; FI ; FR ; GB ; GR ; HR ; HU ;<br>IE ; IS ; IT ; LI ; LT ; LU ; LV ; MC ; MK ; MT ; NL ; NO ; PL ; PT ; RO ; RS ; SE ; SI ;<br>SK ; SM ; TR |
| (62) | Divided application                                                        | EP2928496, 2013.12.05                                                                                                                                                                             |
| (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<br>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                | <b>CRISPR-BASED GENOME MODIFICATION AND REGULATION</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| (56) | References<br>Cited: | WO-A1-2013/176772<br>WO-A1-2013/142578<br>US-A1- 2010 076 057<br>WO-A1-2011/146121<br>WO-A2-2014/093655<br>WO-A1-2014/065596<br>WO-A1-2014/099744<br>DANA CARROLL: "A CRISPR Approach to Gene Targeting", MOLECULAR THERAPY, vol. 20,<br>no. 9, 1 September 2012 (2012-09-01), pages 1658-1660, XP055106489, ISSN: 1525-0016,<br>DOI: 10.1038/mt.2012.171 |

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

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

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

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

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. Vektorer, omfattende:**

(a) DNA-kodende sekvens som koder for minst ett guide-RNA operabelt knyttet til en promotorkontrollsekvens for ekspresjon av det minst ene guide-RNA-et i en eukaryotisk celle,  
5 hvert guide-RNA omfattende

(i) første region komplementær med et målsete i en eukaryot kromosomal sekvens som kan baseparet med målsetet,

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

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

10 hvori (i), (ii) og (iii) anordnes i 5'- til 3'-retningen,

(b) DNA-kodende sekvens som koder for en konstruert RNA-guidet endonuklease operabelt koblet til en promotorkontrollsekvens for ekspresjon i en eukaryotisk celle, hvori den RNA-guidede endonukleasen er en CRISPR/Cas9-endonuklease av type II omfattende minst ett nukleært lokaliseringssignal, hvori (a) og (b) lokaliseres på de samme eller forskjellige  
15 vektorene, hvorved den RNA-guidede endonukleasen ledes til spesifikke nukleinsyresekvenser av det minst ene guide-RNA-et og den RNA-guidede endonukleasen spalter de spesifikke nukleinsyresekvensene, hvorved nukleinsyresekvensen modifiseres av en delesjon av minst ett nukleotid, en innsetting av minst ett nukleotid, en substitusjon av minst ett nukleotid eller en kombinasjon derav.

**2. Vektorene ifølge krav 1, hvori guide-RNA-et omfatter to separate molekyler.**

3. Vektorene ifølge krav 2, hvori det første molekylet av guide-RNA-et omfatter den første regionen av guide-RNA-et og den ene halvparten av stammen i den andre regionen til  
25 guide-RNA-et.

4. Vektorene ifølge krav 2, hvori det andre molekylet til guide-RNA-et omfatter den andre halvparten av stammen til den andre regionen til guide-RNA-et og den tredje regionen til  
30 guide-RNA-et.

5. Vektorene ifølge et hvilket som helst av kravene 1-4, hvori den første regionen til guide-RNA-et omfatter fra ca. 10 nukleotider til mer enn ca. 25 nukleotider.

6. Vektorene ifølge et hvilket som helst av kravene 1-5, hvori den andre regionen til

guide-RNA-et er ca. 16 til ca. 60 nukleotider i lengde.

7. Vektorene ifølge et hvilket som helst av kravene 1-6, hvori den tredje regionen til guide-RNA-et er ca. 5 til ca. 60 nukleotider i lengde.

5

8. Vektorene ifølge et hvilket som helst av kravene 1-7, hvori CRISPR/Cas9-proteinet av type II bare omfatter ett funksjonelt nukleasedomene.

9. Vektorene ifølge krav 8, hvori CRISPR/Cas9-proteinet av type II omfatter et ikke-funksjonelt RuvC-lignende domene.

10

10. Vektorene ifølge krav 8, hvori CRISPR/Cas9-proteinet av type II omfatter et ikke-funksjonelt HNH-lignende domene.

11. Vektorene ifølge et hvilket som helst foregående krav, hvori CRISPR/Cas9-proteinet av type II er fra en *Streptococcus*-art.

15

12. Vektorene ifølge krav 11, hvori CRISPR/Cas9-proteinet av type II er fra *Streptococcus pyogenes*.

20

13. Vektorene ifølge et hvilket som helst foregående krav, hvori NLS er lokalisert i C-enden til den RNA-guidede endonukleasen.

14. Vektorene ifølge et hvilket som helst foregående krav, hvori CRISPR/Cas9-proteinet av type II kodes av DNA optimalisert for eukaryotisk ekspresjon.

25

15. Vektorene ifølge et hvilket som helst foregående krav, hvori vektorene omfatter ytterligere ekspresjonskontrollsekvenser.

16. Vektorene ifølge et hvilket som helst foregående krav, hvori guide-RNA-et og CRISPR/Cas9-proteinet av type II kodes på de samme vektorene.

30

17. Vektorene ifølge et hvilket som helst foregående krav, hvori målsetet er oppstrøms for en protospacertilstøtende del (PAM).

18. Vektorene ifølge krav 17, hvori PAM-en er umiddelbart nedstrøms fra målsetet.
19. Vektorene ifølge krav 17 eller 18, hvori PAM-en er NGG eller NGGNG, hvori N er  
5 definert som et hvilket som helst nukleotid.
20. Vektorene ifølge et hvilket som helst foregående krav, hvori vektorene er  
plasmidvektorer.
- 10 21. Vektorene ifølge et hvilket som helst av kravene 1-19, hvori vektorene er virusvektorer.
22. Vektorene ifølge et hvilket som helst av kravene 1-7, hvori den RNA-guidede  
endonukleasen introduserer et dobbeltstrengt brudd på målsetet i den eukaryote kromosomale  
sekvensen, som repareres av en DNA-reparasjonsprosess, og derved modifierer sekvensen.  
15
23. Vektorene ifølge et hvilket som helst foregående krav, videre omfattende et  
donorpolynukleotid.
24. Anvendelse av vektorene ifølge et hvilket som helst av kravene 1-21, og eventuelt  
20 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 og hvori anvendelsen ikke omfatter en fremgangsmåte for  
behandling av menneske- eller dyrekroppen ved kirurgi eller terapi.
- 25 25. Anvendelsen ifølge krav 24, hvori den kromosomale sekvensen repareres av 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.
- 30 26. Anvendelsen ifølge krav 25, hvori DNA-reparasjonsprosessen er en ikke-homolog  
endesammenføyende (NHEJ) reparasjonsprosess.
27. Anvendelsen ifølge krav 25, videre omfattende et donorpolynukleotid omfattende  
oppstrøms og nedstrøms sekvenser, hvori DNA-reparasjonsprosessen er homologiledet

reparasjon (HDR), og donorsekvensen integreres i den kromosomale sekvensen.

**28.** Anvendelsen ifølge et hvilket som helst av kravene 24–27, hvori den kromosomale sekvensen er i en eukaryotisk celle, hvori den eukaryote cellen er en human celle, en ikke-human pattedyrce

5 human pattedyrce

**29.** Anvendelsen ifølge et hvilket som helst av kravene 24–27, hvori den kromosomale sekvensen er i en eukaryotisk celle, hvori den eukaryote cellen er en virvelløs celle, en insektcelle, en plantecelle, en gjærce

10 en enkeltcellet eukaryotisk organisme.

**30.** Anvendelsen ifølge krav 29, hvori den eukaryote cellen er en plantecelle.

**31.** Anvendelsen ifølge et hvilket som helst av kravene 24–27, hvori den kromosomale sekvensen er i et ikke-humant pattedyre

bry