



(12) Translation of
European patent specification

(11) NO/EP 3401400 B1

NORWAY

(19) NO
(51) Int Cl.
C12N 15/11 (2006.01)
A61K 38/46 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)
C12N 15/10 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
C12N 15/90 (2006.01)

Norwegian Industrial Property Office

(21)	Translation Published	2019.08.26
(80)	Date of The European Patent Office Publication of the Granted Patent	2019.04.03
(86)	European Application Nr.	18152360.6
(86)	European Filing Date	2013.03.15
(87)	The European Application's Publication Date	2018.11.14
(30)	Priority	2012.05.25, US, 201261652086 P 2012.10.19, US, 201261716256 P 2013.01.28, US, 201361757640 P 2013.02.15, US, 201361765576 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
	Designated Extension States:	BA ; ME
(62)	Divided application	EP3241902, 2013.03.15
(73)	Proprietor	The Regents of the University of California, 1111 Franklin Street, 12th Floor, Oakland, CA 94607, USA University of Vienna, Universitätsring 1, 1010 Vienna, Østerrike Charpentier, Emmanuelle, Department Of Regulation in Infection Biology Max Planck Institute for Infection Biology Charitéplatz 1, 10117 Berlin, Tyskland
(72)	Inventor	CHARPENTIER, Emmanuelle, Department Of Regulation in Infection BiologyMax Planck Institute for Infection BiologyCharitéplatz 1, 10117 Berlin, Tyskland JINEK, Martin, 1846 Spruce Street, Berkeley, CA 94709, USA DOUDNA CATE, James Harrison, 164 Vicente Road, Berkeley, CA 94705, USA LIM, Wendell, 149 Collins Street, San Francisco, CA 94118, USA QI, Lei, 730 Kinkead Way, 302, Albany, CA 94706, USA CHYLINSKI, Krzysztof, Simmeringer Hauptstrasse 45/8, 1110 Vienna, Østerrike DOUDNA, Jennifer A., 164 Vicente Road, Berkeley, CA 94705, USA

(74) Agent or Attorney CURO AS, Vestre Rosten 81, 7075 TILLER, Norge

-
- (54) Title **METHODS AND COMPOSITIONS FOR RNA-DIRECTED TARGET DNA MODIFICATION AND FOR RNA-DIRECTED MODULATION OF TRANSCRIPTION**
- (56) References Cited:
- WO-A1-2010/021692
 WO-A1-2014/093712
 WO-A2-2014/093661
 WO-A2-2011/072246
 WO-A1-2014/065596
 WO-A1-2014/089290
 WO-A1-2014/099744
- L. CONG ET AL: "Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems", SCIENCE, vol. 339, no. 6121, 15 February 2013 (2013-02-15), pages 819-823, XP055067741, 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
- MAKAROVA KIRA S ET AL: "Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems", NATURE REVIEWS. MICROBIO, NATURE PUBLISHING GROUP, GB, vol. 9, no. 6, 9 May 2011 (2011-05-09), pages 467-477, XP009155547, ISSN: 1740-1526, DOI: 10.1038/NRMICRO2577
- 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, XP055299674, 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), XP055067747, US ISSN: 0036-8075, DOI: 10.1126/science.1225829
- ELITZA DELTCHEVA ET AL: "CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III", NATURE, vol. 471, no. 7340, 31 March 2011 (2011-03-31), pages 602-607, XP055308803, ISSN: 0028-0836, DOI: 10.1038/nature09886
- MARTIN JINEK ET AL: "RNA-programmed genome editing in human cells", E-LIFE, SAM LTD, GB, vol. 2, 29 January 2013 (2013-01-29), pages e00471-1, XP002699851, ISSN: 2050-084X, DOI: 10.7554/ELIFE.00471 [retrieved on 2013-06-28] & Martin Jinek ET AL: "RNA-programmed genome editing in human cells (Figures and figure supplements)", eLife, vol. 2, 29 January 2013 (2013-01-29), XP055167481, DOI: 10.7554/eLife.00471
- BLAKE WIEDENHEFT ET AL: "RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea", NATURE, vol. 482, no. 7385, 15 February 2012 (2012-02-15), pages 331-338, XP055116249, ISSN: 0028-0836, DOI: 10.1038/nature10886
- PAPWORTH M ET AL: "Designer zinc-finger proteins and their applications", GENE, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 366, no. 1, 17 January 2006 (2006-01-17), pages 27-38, XP024934269, ISSN: 0378-1119, DOI: 10.1016/J.GENE.2005.09.011 [retrieved on 2006-01-17]
- P. MALI ET AL: "RNA-Guided Human Genome Engineering via Cas9", SCIENCE, vol. 339, no. 6121, 3 January 2013 (2013-01-03), pages 823-826, XP055111247, ISSN: 0036-8075, DOI: 10.1126/science.1232033 & P. Mali ET AL: "Supplementary information for RNA-Guided Human Genome Engineering via Cas9 (XP 055337932)", Science, vol. 339, no. 6121, 3 January 2013 (2013-01-03), pages 823-826, XP055403737, ISSN: 0036-8075, DOI: 10.1126/science.1232033

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. Framgangsmåte for modifisering av et mål-DNA, hvilken framgangsmåte omfatter kontakt av mål-DNA'et med et kompleks som omfatter:

(a) et Cas9-polypeptid; og

5 (b) et DNA-målrettet RNA som omfatter:

(i) et DNA-målrettet segment som omfatter en nukleotidsekvens som er komplementær med en sekvens i mål-DNA'et, og

(ii) et protein-bindende segment som samvirker med Cas9-polypeptidet, hvori det protein-bindende segmentet omfatter to komplementære nukleotidavsnitt som

10 hybridiserer for å danne et dobbelttrådet RNA-(dsRNA)-dupleks,

hvori mål-DNA'et er til stede i en enkelt-cellet eukaryotisk organisme, en dyrecelle eller en plantecelle,

hvori nevnte modifisering er spalting av mål-DNA'et,

hvori:

15 (A) kontakten er *in vitro* eller i en celle *ex vivo*; og/eller

(B) framgangsmåten ikke er en framgangsmåte for behandling av menneske- eller dyrekroppen ved terapi.

2. Framgangsmåte ifølge krav 1, hvori det DNA-målrettede RNA omfatter én eller flere av en modifisert nukleobase, en modifisert stamme eller ikke-naturlig internukleosid-binding, en
20 modifisert sukkerkomponent, en Locked-nukleinsyre, eller en peptid-nukleinsyre.

3. Framgangsmåte ifølge krav 1 eller krav 2, hvori dsRNA-duplekset har:

(i) en lengde fra 8 basepar (bp) til 15 bp;

(ii) en lengde fra 8 basepar (bp) til 30 bp; eller

(iii) en lengde fra 15 basepar (bp) til 18 bp.

25 4. Framgangsmåte ifølge ett av kravene 1-3, hvori prosentverdien av komplementaritet mellom nukleotidene som hybridiserer for å danne dsRNA-duplekset ved det protein-bindende segmentet er større enn 70%.

5. Framgangsmåte ifølge ett av kravene 1-4, hvori kontakten omfatter å innføre inn i en celle (a) Cas9-polypeptidet, eller et polynukleotid som koder for Cas9-polypeptidet, og (b) det DNA-

målrettede RNA, eller ett eller flere DNA-polynukleotider som koder for det DNA-målrettede RNA; valgfritt hvori framgangsmåten i tillegg omfatter innføring av et donor-polynukleotid i cellen.

6. Framgangsmåte ifølge ett av kravene 1-5, hvori nukleotidsekvensen som er komplementær med en sekvens i mål-DNA'et er 15 til 18 nukleotider (nt) lang, 18 til 20 nt lang eller 20 til 25 nt lang.

5 7. Framgangsmåte ifølge ett av kravene 1-6, hvori et proteintransduksjonsdomene er kovalent bundet til amino-terminus av Cas9-polypeptidet, hvori proteintransduksjonsdomenet letter traverseringen av Cas9-polypeptidet fra nevnte cytosol i en organelle i en celle.

8. Framgangsmåte ifølge ett av kravene 1-6, hvori et proteintransduksjonsdomene er kovalent bundet til karboksyl-terminus av Cas9-polypeptidet, hvori proteintransduksjonsdomenet letter
10 traverseringen av Cas9-polypeptidet fra nevnte cytosol i en organelle i en celle.

9. Framgangsmåte ifølge ett av kravene 1-8, hvori det DNA-målrettede RNA et to-molekyl-RNA og omfatter to separate RNA-molekyler, som hver omfatter ett av de to komplementære nukleotidavsnittene som hybridiserer til å danne dsRNA-duplekset.

10. Framgangsmåte ifølge ett av kravene 1-9, hvori mål-DNA'et er kromosomalt DNA.

15 11. Framgangsmåte ifølge ett av kravene 1 til 10, hvori mål-DNA'et er til stede i en celle fra virvelløse dyr, en celle fra et virveldyr, en celle fra et pattedyr, en celle fra en gnager eller en celle fra et menneske.

12. Blanding omfattende:

(a) et Cas9-polypeptid eller et polynukleotid som koder for nevnte Cas9-polypeptid, og

20 (b) et DNA-målrettet RNA eller ett eller flere DNA-polynukleotider som koder for nevnte DNA-målrettede RNA, hvori det DNA-målrettede RNA omfatter:

(i) et DNA-målrettet segment som omfatter en nukleotidsekvens som er komplementær med en sekvens i et mål-DNA, og

25 (ii) et proteinbindende segment som samvirker med nevnte Cas9-polypeptid, hvori det proteinbindende segmentet omfatter to komplementære nukleotidavsnitt som hybridiserer for å danne et dobbelttrådet RNA-(dsRNA)-dupleks;

hvor mål-DNA'et er til stede i en enkelt-cellet eukaryotisk organisme, en dyrecelle eller en plantecelle.

13. Én eller flere nukleinsyrer som omfatter:

30 (a) en første nukleotidsekvens som koder for et DNA-målrettet RNA som omfatter:

- (i) et DNA-målrettet segment som omfatter en nukleotidsekvens som er komplementær med en målsekvens i et mål-DNA, og
- (ii) et proteinbindende segment som samvirker med et Cas9-polyeptid, hvori det proteinbindende segmentet omfatter to komplementære nukleotidavsnitt som hybridiserer for å danne et dobbelttrådet RNA-(dsRNA)-dupleks;
- 5 hvori den første nukleotidsekvensen som koder for det DNA-målrettede RNA er operativt bundet til en promoter; og, valgfritt,
- (b) en andre nukleotidsekvens som koder for et Cas9-polyeptid, hvori nukleotidsekvensen som koder for nevnte Cas9-polyeptid er operativt bundet til en promoter;
- 10 hvori mål-DNA'et er til stede i en enkelt-cellet eukaryotisk organisme, en dyrecelle eller en plantecelle.
14. Én eller flere nukleinsyrer ifølge krav 13, hvori nukleinsyrene er én eller flere rekombinante ekspresjonsvektorer, valgfritt hvori nevnte én eller flere rekombinante ekspresjonsvektorer er én eller flere virale vektorer.
- 15 15. Én eller flere nukleinsyrer ifølge krav 13 eller krav 14, hvori nukleotidsekvensen som koder for det DNA-målrettede RNA er operativt bundet til en promoter som er funksjonell i en eukaryotisk celle, og/eller nukleotidsekvensen som koder for et Cas9-polyeptid er operativt bundet til en promoter som er funksjonell i en eukaryotisk celle.
16. Sett omfattende:
- 20 (a) et Cas9-polyeptid, eller et polynukleotid som koder for Cas9-polyeptidet; og
- (b) et DNA-målrettet RNA, eller ett eller flere DNA-polynukleotider som koder for det DNA-målrettede RNA, hvori det DNA-målrettede RNA omfatter:
- (i) et DNA-målrettet segment som omfatter en nukleotidsekvens som er komplementær med en sekvens i et mål-DNA, og
- 25 (ii) et proteinbindende segment som samvirker med Cas9-polyeptidet, hvori det proteinbindende segmentet omfatter to komplementære nukleotidavsnitt som hybridiserer for å danne et dobbelttrådet RNA-(dsRNA)-dupleks,
- hvori (a) og (b) er i de samme eller separate beholderne, og
- hvori mål-DNA'et er til stede i en enkelt-cellet eukaryotisk organisme, en dyrecelle eller en
- 30 plantecelle.

17. Genetisk modifisert vertscelle, som er en eukaryotisk celle, omfattende:

(a) et Cas9-polypeptid, eller et polynukleotid som koder for Cas9-polypeptidet; og/eller

(b) et DNA-målrettet RNA, eller ett eller flere DNA-polynukleotider som koder for det DNA-målrettede RNA, hvori det DNA-målrettede RNA omfatter:

5 (i) et DNA-målrettet segment som omfatter en nukleotidsekvens som er komplementær med en sekvens i et mål-DNA, og

(ii) et protein-bindende segment som samvirker med Cas9-polypeptidet, hvori det protein-bindende segmentet omfatter to komplementære nukleotidavsnitt som hybridiserer for å danne et dobbelttrådet RNA-(dsRNA)-dupleks;

10 og hvori

(A) den genetisk modifiserte vertscellen er *in vitro* eller *ex vivo*; og/eller

(B) den genetisk modifiserte vertscellen ikke er en menneskecelle.

18. Blanding ifølge krav 12, én eller flere nukleinsyrer ifølge ett av kravene 13-15, eller sett ifølge krav 16, eller genetisk modifisert vertscelle ifølge krav 17, hvori det DNA-målrettede RNA omfatter
15 én eller flere av en modifisert nukleobase, en modifisert stamme eller en ikke-naturlig internukleosid-binding, en modifisert sukkerkomponent, en Locked-nukleinsyre, eller en peptid-nukleinsyre.

19. Blanding ifølge krav 12 eller 18, én eller flere nukleinsyrer ifølge ett av kravene 13-15 og 18, eller sett ifølge krav 16 eller 18, eller genetisk modifisert vertscelle ifølge krav 17 eller krav 18 hvori:

20 (i) dsRNA-duplekset har en lengde fra 8 basepar (bp) til 15 bp;

(ii) dsRNA-duplekset har en lengde fra 8 basepar (bp) til 30 bp; eller

(iii) dsRNA-duplekset har en lengde fra 15 basepar (bp) til 18 bp.

20. Blanding ifølge ett av kravene 12 og 18-19, én eller flere nukleinsyrer ifølge ett av kravene 13-15 og 18-19, eller sett ifølge ett av kravene 16 og 18-19, genetisk modifisert vertscelle ifølge ett av
25 kravene 17-19, hvori:

(i) prosentverdien for komplementaritet mellom nukleotidene som hybridiserer til å danne dsRNA-duplekset ved det protein-bindende segmentet er større enn 70%; og/eller

(ii) mål-DNA'et er kromosomalt DNA.

21. Blanding ifølge ett av kravene 12 og 18-20, én eller flere nukleinsyrer ifølge ett av kravene 13-15
30 og 18-20, eller sett ifølge ett av kravene 16 og 18-20, eller genetisk modifisert vertscelle ifølge ett

av kravene 17-20, hvori et proteintransduksjonsdomene er kovalent bundet til amino-terminus av Cas9-polypeptidet, hvori proteintransduksjonsdomenet letter traverseringen av Cas9-polypeptidet fra nevnte cytosol i en organelle i en celle.

22. Blanding ifølge ett av kravene 12 og 18-20, én eller flere nukleinsyrer ifølge ett av kravene 13-15 og 18-20, eller sett ifølge ett av kravene 16 og 18-20, eller genetisk modifisert vertscelle ifølge ett av kravene 17-20, hvori et proteintransduksjonsdomene er kovalent bundet til karboksyl-terminus av Cas9-polypeptidet, hvori proteintransduksjonsdomenet letter traverseringen av Cas9-polypeptidet fra nevnte cytosol i en organelle i en celle.

23. Blanding ifølge ett av kravene 12 og 18-22, én eller flere nukleinsyrer ifølge ett av kravene 13-15 og 18-22, eller sett ifølge ett av kravene 16 og 18-22, eller genetisk modifisert vertscelle ifølge ett av kravene 17-22, hvori det DNA-måltrettede RNA er et to-molekyl-RNA som er målrettet mot DNA og omfatter to separate RNA-molekyler, som hver omfatter ett av de to komplementære nukleotidavsnittene som hybridiserer til å danne dsRNA-duplekset.

24. Blanding ifølge ett av kravene 12 og 18-23, én eller flere nukleinsyrer ifølge ett av kravene 13-15 og 18-23, eller sett ifølge ett av kravene 16 og 18-23, for anvendelse i en framgangsmåte for terapeutisk behandling av en pasient.

25. Blanding ifølge ett av kravene 12 og 18-23, én eller flere nukleinsyrer ifølge ett av kravene 13-15 og 18-23, eller sett ifølge ett av kravene 16 og 18-23, hvori mål-DNA'et er til stede i en celle fra et virvelløst dyr, en celle fra et virveldyr, en celle fra et pattedyr, en celle fra en gnager, eller en celle fra et menneske.