



(12) Translation of
European patent specification

(11) NO/EP 3445388 B1

NORWAY

(19) NO

(51) Int Cl.

A61K 38/46 (2006.01)

C12N 15/10 (2006.01)

C12N 9/22 (2006.01)

C12N 15/113 (2010.01)

Norwegian Industrial Property Office

(45)	Translation Published	2024.07.01
(80)	Date of The European Patent Office Publication of the Granted Patent	2024.04.17
(86)	European Application Nr.	17727373.7
(86)	European Filing Date	2017.04.18
(87)	The European Application's Publication Date	2019.02.27
(30)	Priority	2016.04.18, US, 201662324024 P 2016.09.01, US, 201662382522 P 2016.12.02, US, 201662429428 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
	Designated Validation States:	MA; MD
(73)	Proprietor	Vertex Pharmaceuticals Incorporated, 50 Northern Avenue, Boston, MA 02210, USA
(72)	Inventor	COWAN, Chad, Albert, 610 Main Street North Building 7th Floor, Cambridge, MA 02139, USA LUNDBERG, Ante, Sven, 610 Main Street North Building 7th Floor, Cambridge, MA 02139, USA CHAKRABORTY, Tirtha, 610 Main Street North Building 7th Floor, Cambridge, MA 02139, USA LIN, Michelle, I-ching, 610 Main Street North Building 7th Floor, Cambridge, MA 02139, USA MISHRA, Bibhu, Prasad, 610 Main Street North Building 7th Floor, Cambridge, MA 02139, USA PAIK, Elizabeth, Jae-eun, 610 Main Street North Building 7th Floor, Cambridge, MA 02139, USA KERNYTSKY, Andrew, 610 Main Street North Building 7th Floor, Cambridge, MA 02139, USA BORLAND, Todd, Douglass, 610 Main Street North Building 7th Floor, Cambridge, MA 02139, USA
(74)	Agent or Attorney	ZACCO NORWAY AS, Postboks 488, 0213 OSLO, Norge

(54) Title **MATERIALS AND METHODS FOR TREATMENT OF HEMOGLOBINOPATHIES**

(56) References
Cited:

US-A1- 2015 044 772, WO-A2-2015/168547, WO-A1-2015/183025, US-A1- 2015 307 867,
US-A1- 2016 029 604, US-A1- 2015 166 969
DANIEL E BAUER: "Blood Journal | Fine-Mapping and Genome Editing Reveal An Essential
Erythroid Enhancer At The HbF-Associated BCL11A Locus", BLOOD, vol. 122, no. 21, 15
November 2013 (2013-11-15), pages 437-437, XP055203587, ISSN: 0006-4971

MATTHEW C. CANVER ET AL: "BCL11A enhancer dissection by Cas9-mediated in situ saturating mutagenesis", NATURE, vol. 527, no. 7577, 1 November 2015 (2015-11-01), pages 192-197, XP55274680, ISSN: 0028-0836, DOI: 10.1038/nature15521

D. E. BAUER ET AL: "An Erythroid Enhancer of BCL11A Subject to Genetic Variation Determines Fetal Hemoglobin Level", SCIENCE, vol. 342, no. 6155, 11 October 2013 (2013-10-11), pages 253-257, XP055203754, ISSN: 0036-8075, DOI: 10.1126/science.1242088

LI HOJUN ET AL: "Genome Editing in Erythroid Progenitor Cells Mediated By Crispr/Cas9", BLOOD, vol. 124, no. 21, December 2014 (2014-12), XP002771899, & 56TH ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN-SOCIETY-OF-HEMATOLOGY; SAN FRANCISCO, CA, USA; DECEMBER 06 -09, 2014

BAUER DANIEL E ET AL: "Crispr-Cas9 Saturating Mutagenesis Reveals an Achilles Heel in the BCL11A Erythroid Enhancer for Fetal Hemoglobin Induction (by Genome Editing)", BLOOD, vol. 126, no. 23, December 2015 (2015-12), XP002771900, & 57TH ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN-SOCIETY-OF-HEMATOLOGY; ORLANDO, FL, USA; DECEMBER 05 -08, 2015

LI HOJUN ET AL: "Efficient CRISPR-Cas9 mediated gene disruption in primary erythroid progenitor cells.", HAEMATOLOGICA JUN 2016, vol. 101, no. 6, 11 March 2016 (2016-03-11), pages e216-e219, XP002773432, ISSN: 1592-8721

STUART H. ORKIN: "Recent advances in globin research using genome-wide association studies and gene editing", ANNALS OF THE NEW YORK ACADEMY OF SCIENCES, vol. 1368, no. 1, 11 February 2016 (2016-02-11), pages 5-10, XP055274553, US ISSN: 0077-8923, DOI: 10.1111/nyas.13001

BAUER DANIEL E ET AL: "Hemoglobin switching's surprise: the versatile transcription factor BCL11A is a master repressor of fetal hemoglobin", CURRENT OPINION IN GENETICS & DEVELOPMENT, vol. 33, 14 September 2015 (2015-09-14), pages 62-70, XP029324656, 14.09.2015 ISSN: 0959-437X, DOI: 10.1016/J.GDE.2015.08.001

BLOBEL GERD A ET AL: "An international effort to cure a global health problem: A report on the 19th Hemoglobin Switching Conference", EXPERIMENTAL HEMATOLOGY, vol. 43, no. 10, 1 October 2015 (2015-10-01), pages 821-837, XP029284406, ISSN: 0301-472X, DOI: 10.1016/J.EXPHEM.2015.06.008

CANVER MATTHEW C ET AL: "Customizing the genome as therapy for the beta-hemoglobinopathies", 6 April 2016 (2016-04-06), BLOOD, VOL. 127, NR. 21, PAGE(S) 2536-2545, XP002771817, ISSN: 0006-4971(print) page 2539, column 1, paragraph 3 - page 2539, column 2, paragraph 4; figure 1 page 2541, column 1, paragraph 3

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. Et enkeltmolekyl-guide-RNA (sgRNA) som omfatter nukleinsyresekvensen av SEKV. ID NR.: 71,959, hvor sgRNA-et omfatter tre 2'O-metylfosforotioat-rester
5 ved hver av sine 5'- og 3'-ender.
2. Et enkeltmolekyl-guide-RNA (sgRNA) som omfatter nukleinsyresekvensen av SEKV. ID NR.: 71,959, hvor baser 1-3 og 97-99 er modifiserte 2'-O-metylfosforotioat-nukleotider.
10
3. En nukleinsyre som omfatter en nukleotidsekvens som koder for sgRNA-et ifølge krav 1 eller 2.
4. En vektor som omfatter nukleinsyren ifølge krav 3.
15
5. SgRNA-et ifølge krav 1 eller 2, nukleinsyren ifølge krav 3, eller vektoren ifølge krav 4, for anvendelse ved behandling av en pasient med hemoglobinopati.
6. SgRNA-et for anvendelse i henhold til krav 5, nukleinsyren for anvendelse i
20 henhold til krav 5, eller vektoren for anvendelse ifølge krav 5, hvor hemoglobinopatien er sigdcelleanemi eller talassemi.
7. SgRNA-et for anvendelse i henhold til krav 6, nukleinsyren for anvendelse i
25 henhold til krav 6, eller vektoren for anvendelse ifølge krav 6, hvor hemoglobinopatien er en talassemi og talassemien er valgt fra gruppen som består av α , β , δ , γ , og kombinasjoner derav, videre eventuelt hvor talassemien er β -talassemi.
8. En *ex vivo* fremgangsmåte for å redigere et B-celle lymfom 11A
30 (BCL11A)-gen i en human celle ved genom-redigering, hvor fremgangsmåten omfatter:
 å innføre inn i den humane cellen én eller flere deoksyribonukleinsyre (DNA) endonukleaser eller en nukleinsyre som omfatter en nukleotid-

- 5 sekvens som koder for den ene eller de flere DNA-endonukleasene eller en vektor som omfatter nevnte nukleinsyre for å bevirke ett eller flere enkelt-trådbrudd (SSB-er) eller dobbelt-trådbrudd (DSB-er) inne i eller nær BCL11A-genet eller andre DNA-sekvens som koder for et regulatorisk element av BCL11A-genet, som resulterer i en permanent delesjon, modulasjon, eller inaktivering av en transkripsjonell kontrollsekvens av BCL11A-genet,
- 10 hvor fremgangsmåten videre omfatter å innføre inn i cellen sgRNA-et ifølge krav 1 eller krav 2, en nukleinsyre som omfatter en nukleotidsekvens som koder for nukleinsyresekvensen til nevnte sgRNA, eller en vektor som omfatter nevnte nukleinsyre, og hvor den ene eller de flere DNA-endonukleasene omfatter en Cas9-endonuklease.
- 15 **9.** Fremgangsmåten ifølge krav 8, hvor nukleinsyren som omfatter en nukleotidsekvens som koder for den ene eller de flere DNA-endonukleasene er én eller flere ribonukleinsyrer (RNA-er).
- 20 **10.** Fremgangsmåten ifølge krav 8 eller 9, hvor den ene eller de flere DNA-endonukleasene hver omfatter, ved N-terminalen, C-terminalen, eller både N-terminalen og C-terminalen, ett eller flere nukleære lokaliseringssignaler (NLS-er), eventuelt hvor den ene eller de flere NLS-ene omfatter et SV40 NLS.
- 25 **11.** Fremgangsmåten ifølge krav 8 eller 10, hvor den ene eller de flere DNA-endonukleasene er pre-kompleksbundet med sgRNA-et for å danne ett eller flere ribonukleoproteiner (RNP-er), eventuelt hvor den ene eller de flere DNA-endonukleasene blir kombinert med sgRNA-et i et vektforhold på 1:1 DNA-endonuklease til sgRNA for å danne den ene eller de flere RNP-ene.
- 30 **12.** Fremgangsmåten ifølge krav 11, hvor den ene eller de flere RNP-ene blir levert til den humane cellen ved elektroporering, eventuelt hvor den ene eller de flere DNA-endonukleasene er en *S. pyogenes* Cas9 som omfatter en N-terminal SV40 NLS og en C-terminal SV40 NLS.

13. Fremgangsmåten ifølge ett av kravene 8-12, hvor den humane cellen er en hematopoietisk stamcelle, eventuelt hvor den hematopoietiske stamcellen er en CD34+ celle.