



(12) Translation of
European patent specification

(11) NO/EP 3502253 B1

NORWAY

(19) NO
(51) Int Cl.
C12N 15/113 (2010.01)
C12N 9/22 (2006.01)
C12N 15/10 (2006.01)
C12N 15/82 (2006.01)

Norwegian Industrial Property Office

(45) Translation Published 2020.10.19

(80) Date of The European Patent Office Publication of the Granted Patent 2020.05.27

(86) European Application Nr. 18188126.9

(86) European Filing Date 2016.06.17

(87) The European Application's Publication Date 2019.06.26

(30) Priority 2016.01.07, EP, 16150428
2015.06.18, US, 201562181739 P
2015.07.16, US, 201562193507 P
2015.08.05, US, 201562201542 P
2015.08.16, US, 201562205733 P
2015.09.24, US, 201562232067 P
2015.12.18, US, 201514975085

(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 EP3310917, 2016.06.17

(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 Street Apt 11, Cambridge, MA 02139, USA
Zetsche, Bernd, 383 Washington Street, Gloucester, MA 01930, USA
Gootenberg, Jonathan, S., 303 Third Street Apt 510, Cambridge, MA 02142, USA
Abudayyeh, Omar, O., 49 Bristol St unit 2, Cambridge, MA 02141, USA
Slaymaker, Ian, 1783 Massachusetts Ave. Apt 1, Cambridge, MA 02140, USA

(74) Agent or Attorney TANDBERG INNOVATION AS, Postboks 1570 Vika, 0118 OSLO, Norge

(54) Title **NOVEL CRISPR ENZYMES AND SYSTEMS**

(56) References Cited: WO-A2-2015/089419

KIRA S. MAKAROVA ET AL: "An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems", NATURE REVIEWS. MICROBIOLOGY, vol. 13, no. 11, 28 September 2015 (2015-09-28), pages 722-736, XP055271841, GB ISSN: 1740-1526, DOI: 10.1038/nrmicro3569

EVA SCHUNDER ET AL: "First indication for a functional CRISPR/Cas system in *Francisella tularensis*", INTERNATIONAL JOURNAL OF MEDICAL MICROBIOLOGY, vol. 303, no. 2, 1 March 2013 (2013-03-01) , pages 51-60, XP055271835, DE ISSN: 1438-4221, DOI: 10.1016/j.ijmm.2012.11.004

Haft, D.H.: "HMM Summary Page: TIGR04330", , 17 May 2012 (2012-05-17), XP002757584, Retrieved from the Internet: URL:<http://www.jcvi.org/cgi-bin/tigrfams/HmmReportPage.cgi?acc=TIGR04330>

BERND ZETSCHE ET AL: "Cpf1 Is a Single RNA-Guided Endonuclease of a Class 2 CRISPR-Cas System", CELL, vol. 163, no. 3, 25 September 2015 (2015-09-25), pages 759-771, XP055267511, US ISSN: 0092-8674, DOI: 10.1016/j.cell.2015.09.038

GISLE VESTERGAARD ET AL: "CRISPR adaptive immune systems of Archaea", RNA BIOLOGY, vol. 11, no. 2, 14 February 2014 (2014-02-14), pages 156-167, XP055271855, US ISSN: 1547-6286, DOI: 10.4161/rna.27990

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

5 **1.** Et konstruert, ikke-naturlig forekommende «Clustered Regularly Interspersed Short Palindromic Repeat (CRISPR)-CRISPR assosiert (Cas) (CRISPR-Cas)» sammensetning som omfatter

a) én eller flere CRISPR-Cas polynukleotid-sekvenser som omfatter a) guide-RNA som omfatter en guide-sekvens bundet til en direkte repeterende-sekvens, hvor guide-sekvensen er i stand til å hybridisere til en sekvens på mål-lokuset, eller én eller flere nukleotid-sekvenser som koder for den ene eller flere CRISPR-Cas polynukleotid-sekvenser, og

b) et Cpf1-effektorprotein, eller én eller flere nukleotid-sekvenser som koder for Cpf1-effektorproteinet,

15 hvor den ene eller flere guide-sekvensene hybridiserer til nevnte sekvens på mål-lokuset, og nevnte guide-RNA danner et kompleks med Cpf1-effektorproteinet, og hvor et «Protospacer Adjacent Motif» (PAM) styrer binding av effektor-komplekset til mål-lokuset av interesse og ved binding av effektor-komplekset til lokuset av interesse, induserer effektorproteinet modifisering av sekvensens assosiert med mål-lokuset av interesse og hvor modifiseringen er introduksjonen av et tråd-brudd, og tråd-bruddet er forskjøvet kuttet med et 5'-overheng.

20 **2.** Et konstruert, ikke-naturlig forekommende «Clustered Regularly Interspersed Short Palindromic Repeat (CRISPR)-CRISPR assosiert (Cas) (CRISPR-Cas)» vektorsystem som omfatter én eller flere vektorer som omfatter

25 a) et første reguleringsselement operabelt bundet til én eller flere nukleotid-sekvenser som koder for én eller flere CRISPR-Cas polynukleotid-sekvenser som omfatter a) guide-RNA som omfatter en guide-sekvens bundet til en direkte repeterende-sekvens, hvor guide-sekvensen er i stand til å hybridisere med en sekvens på mål-lokuset,

30 b) et andre reguleringsselement operabelt bundet til nukleotid-sekvens som koder for et Cpf1-effektorprotein;

hvor komponenter (a) og (b) er lokalisert på den samme eller forskjellige vektorer i systemet,

35 hvor når transkribert, den ene eller flere guide-sekvensene hybridiserer til nevnte sekvens på mål-lokuset, og nevnte guide-RNA danner et kompleks med Cpf1-effektorproteinet, og hvor et «Protospacer Adjacent Motif» (PAM) styrer binding av effektor-komplekset til mål-lokuset av interesse og ved binding av effektor-komplekset til

lokuset av interesse, induserer effektorproteinet modifisering av sekvensens assosiert med mål-lokuset av interesse, og hvor modifiseringen er introduksjonen av et tråd-brudd, og tråd-bruddet er forskjøvet kutt.

- 5 **3.** Sammensetningen eller vektorsystemet ifølge krav 1 eller 2, hvor overhenget av det forskjøvede kuttet er et 5'-overheng på 4 eller 5 nukleotider.
- 4.** Sammensetningen eller vektorsystemet ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 3 hvor mål-lokuset av interesse omfatter lineært eller super-viklet DNA.
- 10
- 5.** Sammensetningen eller vektorsystemet ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 3 hvor mål-lokuset av interesse er i et DNA-molekyl i en celle.
- 6.** Sammensetningen eller vektorsystemet ifølge krav 5 hvor cellen omfatter en
- 15 eukariot celle.
- 7.** Sammensetningen eller vektorsystemet i henhold til et hvilket som helst av de foregående kravene, hvor PAM-et omfatter et 5' T-rikt motiv.
- 20 **8.** Sammensetningen eller vektorsystemet i henhold til et hvilket som helst av de foregående kravene, hvor effektorproteinet er et Cpf1-effektorprotein avledet fra en bakterieart listet opp i Figur 64.
- 9.** Sammensetningen eller vektorsystemet i henhold til et hvilket som helst av de
- 25 foregående kravene, hvor Cpf1-effektorproteinet er avledet fra en bakterieart valgt fra gruppen bestående av *Francisella tularensis* 1, *Francisella tularensis* subsp. *novicida*, *Prevotella albensis*, *Lachnospiraceae* bacterium MC2017 1, *Butyrivibrio proteoclasticus*, *Peregrinibacteria* bacterium GW2011_GWA2_33_10, *Parcubacteria* bacterium GW2011_GWC2_44_17, *Smithella* sp. SCADC, *Acidaminococcus* sp. BV3L6,
- 30 *Lachnospiraceae* bacterium MA2020, *Candidatus Methanoplasma termitum*, *Eubacterium eligens*, *Moraxella bovoculi* 237, *Leptospira inadai*, *Lachnospiraceae* bacterium ND2006, *Porphyromonas crevioricanis* 3, *Prevotella disiens* og *Porphyromonas macacae*.
- 10.** Sammensetningen eller vektorsystemet i henhold til krav 9, hvor PAM-sekvensen er
- 35 TTN, hvor N er A/C/G eller T og effektorproteinet er FnCpf1, eller hvor PAM-sekvensen er TTTV, hvor V er A/C eller G og effektorproteinet er PaCpf1p, LbCpf1 eller AsCpf1.

11. Sammensetningen eller vektorsystemet i henhold til et hvilket som helst av de foregående kravene, hvor Cpf1-effektorproteinet omfatter ett eller flere nukleære lokaliseringssignaler, og eventuelt to eller flere NLS-er.

5 **12.** Sammensetningen eller vektorsystemet i henhold til et hvilket som helst av de foregående kravene, hvor nukleinsyre-sekvensen som koder for Cpf1-effektorproteinet er kodon-optimalisert for ekspresjon i en eukariot celle.

10 **13.** Sammensetningen eller vektorsystemet i henhold til et hvilket som helst av de foregående kravene hvor nukleotid-sekvensen som koder for komponenter (a) og (b) er på én vektor.

15 **14.** En *in vitro* eller *ex vivo* fremgangsmåte for å modifisere et mål-lokus av interesse som omfatter å levere en sammensetning eller et vektorsystem i henhold til et hvilket som helst av de foregående kravene til nevnte lokus eller en celle som inneholder lokuset, hvor fremgangsmåten ikke er utført på et humant embryo.

20 **15.** En *in vitro* eller *ex vivo* fremgangsmåte for å modifisere et mål-lokus av interesse, hvor fremgangsmåten omfatter å levere til nevnte lokus en ikke-naturlig forekommende eller konstruerte sammensetning som omfatter et Cpf1-effektorprotein og én eller flere nukleinsyrekomponenter, hvor Cpf1-effektorproteinet danner et kompleks med den ene eller flere nukleinsyrekomponenter og ved binding av det nevnte komplekset til et mål-lokus av interesse inducerer effektorproteinet en modifisering av mål-lokuset av interesse, hvor et «Protospacer Adjacent Motif» (PAM) styrer binding av effektorkomplekset til mål-lokuset av interesse, og hvor modifiseringen er introduksjonen av et tråd-brudd, og tråd-bruddet er forskjøvet kutt, hvor fremgangsmåten ikke er utført på et humant embryo.

30 **16.** Fremgangsmåten ifølge krav 15, hvor det forskjøvede kuttet er med et 5'-overheng på 4 eller 5 nukleotider.

17. Fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av kravene 15 eller 16, hvor mål-lokuset av interesse er i et DNA-molekyl i en celle.

35 **18.** Fremgangsmåten ifølge krav 17, hvor cellen er en eukariot celle, slik som en pattedyr-celle, eller en plantecelle, eller en celle fra et menneske eller et ikke-humant dyr.

19. Fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av kravene 15 eller 16, hvor mål-lokuset av interesse er omfattet av et DNA-molekyl *in vitro*.

20. Fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av kravene 15 eller 16, hvor mål-lokuset av interesse og sekvensens at mål-lokuset omfatter lineært eller super-viklet DNA.

5

21. Fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av kravene 15 til 20, hvor sammensetningen omfatter en enkelt nukleinsyre komponent, som eventuelt omfatter en guide-sekvens bundet til en direkte repeterende-sekvens.

10 **22.** Fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av kravene 15 til 21, hvor mål-lokuset av interesse er modifisert ved integreringen av et DNA-innskudd inn i det forskjøvede dobbeltrådede DNA bruddet.

15 **23.** Fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av kravene 15 til 22, hvor Cpf1-effektorproteinet omfatter ett eller flere nukleære lokaliseringssignal(er) (NLS(-er)).

24. Fremgangsmåten ifølge krav 15, hvor nevnte ikke-naturlig forekommende eller konstruerte sammensetning som omfatter et Cpf1-effektorprotein og én eller flere nukleinsyrekomponenter blir levert til cellen som én eller flere polynukleotidmolekyler.

20

25. Fremgangsmåten ifølge krav 24, hvor det ene eller flere polynukleotidmolekyler er omfattet i én eller flere vektorer.

25 **27.** Fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av kravene 23 til 26, hvor det ene eller flere polynukleotidmolekyler eller den ene eller flere vektorer er omfattet i avleveringssystem, slik som avlevering via partikler, vesikler, eller én eller flere virusvektorer.

30 **28.** Fremgangsmåten ifølge krav 27, hvor partiklene omfatter et lipid, et sukker, et metall eller et protein, eller hvor vesiklene omfatter eksosomer eller liposomer.

29. Fremgangsmåten ifølge krav 27, hvor den ene eller flere virale vektorer omfatter ett eller flere av adenovirus, ett eller flere lentivirus eller ett eller flere adeno-assosiert virus.

35 **30.** Fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av kravene 15 til 29 som er en fremgangsmåte for å modifisere en celle, eller en cellelinje ved manipulering av én eller flere målsekvenser på genomiske loci av interesse.

31. En *in vitro*, *ex vivo* eller *in vivo* vertscelle eller cellelinje eller avkom derav som omfatter en sammensetning eller vektorsystemet i henhold til krav 1 eller 2, hvor cellen eller cellelinjen ikke er et humant embryo eller en human kimcelle.

5 **32.** Vertscellen eller cellelinjen eller avkommet derav i henhold til krav 31, hvor cellen er en eukariot celle, fortrinnsvis en dyrecelle, en human celle, en plantecelle eller som omfatter en stamcelle eller en stamcellelinje.

33. En fremgangsmåte for å produsere en plante, som har en modifisert egenskap av interesse som er kodet av et gen av interesse, hvor nevnte fremgangsmåte omfatter å kontakte en plantecelle med en sammensetning eller vektorsystemet i henhold til krav 1 eller 2, eller å underkaste plantecellen for en fremgangsmåte i henhold til krav 15, derved enten å modifisere eller å introdusere nevnte gen av interesse, og å regenerere en plante fra nevnte plantecelle.

15 **34.** En fremgangsmåte for å identifisere en egenskap av interesse i en plante, nevnte egenskap av interesse som er kodet av et gen av interesse, hvor nevnte fremgangsmåte omfatter å kontakte en plantecelle med en sammensetning eller vektorsystemet i henhold til krav 1 eller 2 eller å underkaste plantecellen for en fremgangsmåte i henhold til krav 20 15, derved å identifisere nevnte gene av interesse.

35. Fremgangsmåten ifølge krav 34, som videre omfatter å introdusere det identifiserte genet av interesse inn i en plantecelle eller en plantecellelinje eller plantekimplasma og å generere en plante derfra, hvorved planten inneholder genet av interesse.

25 **36.** Fremgangsmåten ifølge krav 35 hvor planten oppviser egenskapen av interesse.

37. En partikkel som omfatter en sammensetning eller vektorsystemet i henhold til et hvilket som helst av kravene 1 til 3.

30 **38.** Partikkelen ifølge krav 37, hvor partikkelen inneholder Cpf1-effektorproteinet i kompleks med guide-RNA-et.

39. Sammensetningen eller vektorsystemet ifølge krav 1 eller 2, eller fremgangsmåten ifølge krav 15, hvor komplekset, guide-RNA-et eller proteinet er konjugert til minst én sukkerenhet, eventuelt N-acetylgalaktosamin (GalNAc), særlig triantennært GalNAc.

35

40. Sammensetningen eller vektorsystemet ifølge krav 1 eller 2, eller fremgangsmåten ifølge krav 15, hvor konsentrasjonen av Mg^{2+} er omtrent 1mM til omtrent 15 mM.

41. Sammensetningen eller vektorsystemet i henhold til et hvilket som helst av kravene
5 1 til 13 for anvendelse i terapi.