



(12) Translation of
European patent specification

(11) NO/EP 3597749 B1

NORWAY

(19) NO

(51) Int Cl.

C12N 15/11 (2006.01)

C12N 9/22 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

A61K 38/46 (2006.01)

C12N 15/10 (2006.01)

C12N 15/90 (2006.01)

Norwegian Industrial Property Office

- (45) Translation Published 2023.10.30
- (80) Date of The European Patent Office Publication of the Granted Patent 2023.07.26
- (86) European Application Nr. 19157590.1
- (86) European Filing Date 2013.03.15
- (87) The European Application's Publication Date 2020.01.22
- (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 EP3401400, 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, Max Planck Unit for the Science of Pathogens
Virchowweg 12, 10117 Berlin, Tyskland
- (72) Inventor CHARPENTIER, Emmanuelle, Department Of Regulation in Infection Biology Max Planck Institute for Infection Biology Charitéplatz 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 Novagraaf Brevets, Bâtiment O2, 2 rue Sarah Bernhardt CS90017, 92665 ASNIÈRES-SUR-SEINE CEDEX, Frankrike
-

(54) Title **METHODS AND COMPOSITIONS FOR RNA-DIRECTED TARGET DNA MODIFICATION AND FOR RNA-DIRECTED MODULATION OF TRANSCRIPTION**

(56) References

Cited:

WO-A1-2014/089290, WO-A1-2014/099744, WO-A1-2014/093712, WO-A2-2011/072246, WO-A1-2010/021692, WO-A2-2014/093661, WO-A1-2014/065596, 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

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

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

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

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

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

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]

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. Fremgangsmåte for å lede et Cas9-polypeptid til et mål-DNA, fremgangsmåten omfattende å bringe mål-DNA-et i kontakt med en encellet eukaryot organisme, en dyrecelle, en plantecelle, en celle fra et pattedyr eller en
5 celle fra et menneske hvori cellen er *in vitro* eller *ex vivo*, med et kompleks omfattende:
 - (a) et Cas9-polypeptid og
 - (b) et DNA-målrettende RNA omfattende
 - (i) et DNA-målrettende segment omfattende en nukleotidsekvens som er
10 komplementær med en sekvens i mål-DNA-et, og
 - (ii) et proteinbindende segment som interagerer med Cas9-polypeptidet, hvori det proteinbindende segmentet omfatter to komplementære strekninger av nukleotider som hybridiserer for å danne et dobbelttrådet RNA (dsRNA) dupleks,
hvori fremgangsmåten ikke er en prosess for å modifisere den genetiske
15 identiteten til menneskers kimlinje.
2. Sammensetning omfattende:
 - (a) et Cas9-polypeptid, eller et polynukleotid som koder for Cas9-polypeptidet, og
 - (b) et DNA-målrettende RNA omfattende
 - (i) et DNA-målrettende segment omfattende en nukleotidsekvens som er
20 komplementær med en sekvens i et mål-DNA, og
 - (ii) et proteinbindende segment som interagerer med Cas9-polypeptidet, hvori det proteinbindende segmentet omfatter to komplementære strekninger av nukleotider som hybridiserer for å danne et dobbelttrådet RNA (dsRNA) dupleks,
25 hvori et proteintransduksjonsdomene er kovalent forbundet til (A) aminoenden eller (B) karboksylenden til Cas9-polypeptidet, hvori

proteintransduksjonsdomenet letter traverseringen av Cas9-polypeptidet fra cytosolen til i en organell.

3. Sammensetningen ifølge krav 2, hvori sammensetningen er en farmasøytisk sammensetning.

5 4. Anvendelse av et DNA-målrettende RNA for å lede et Cas9-polypeptid til et mål-DNA,

hvori det DNA-målrettende RNA-et omfatter

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

10 (ii) et proteinbindende segment som interagerer med Cas9-polypeptidet, hvori det proteinbindende segmentet omfatter to komplementære strekninger av nukleotider som hybridiserer for å danne et dobbelttrådet RNA (dsRNA) dupleks

hvori:

15 anvendelsen er i en encellet eukaryot organisme, en dyrecelle, en plantecelle, en celle fra et pattedyr eller en celle fra et menneske, som er *in vitro* eller *ex vivo*, og hvori anvendelsen ikke er i en prosess for å modifisere den genetiske identiteten til menneskers kimlinje.

5. Anvendelse av et aktivator-RNA i et DNA-målrettende RNA for å lede et Cas9-polypeptid til et mål-DNA,

20 hvori det DNA-målrettende RNA-et omfatter

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

(ii) et proteinbindende segment som interagerer med Cas9-polypeptidet, hvori det proteinbindende segmentet omfatter to komplementære strekninger av
25 nukleotider som hybridiserer for å danne et dobbelttrådet RNA (dsRNA) dupleks

hvori aktivator-RNA-et danner den ene halvparten av dsRNA-dupleksen til det proteinbindende segmentet til det DNA-målrettende RNA-et, og et målretter-

RNA danner den andre halvparten av dsRNA-dupleksen til det proteinbindende segmentet til det DNA-målrettende RNA-et.

hvor:

anvendelsen er i en encellet eukaryot organisme, en dyrecelle, en
5 plantecelle, en celle fra et pattedyr eller en celle fra et menneske, som er *in vitro*
eller *ex vivo*, og hvor anvendelsen ikke er i en prosess for å modifisere den
genetiske identiteten til menneskers kimplinje.

6. DNA-målrettende RNA, eller polynukleotid som koder for det DNA-
målrettende RNA-et, for anvendelse i en fremgangsmåte for behandling av en
10 pasient,

hvor i fremgangsmåten danner det DNA-målrettende RNA-et et kompleks
med et Cas9-polyprotein og hvor det DNA-målrettende RNA-et omfatter

- (i) et DNA-målrettende segment omfattende en nukleotidsekvens som er
komplementær med en sekvens i et mål-DNA, og
- 15 (ii) et proteinbindende segment som interagerer med Cas9-polyprotein, hvor
det proteinbindende segmentet omfatter to komplementære strekninger av
nukleotider som hybridiserer for å danne et dobbelttrådet RNA (dsRNA) dupleks.

7. Cas9-polyprotein, eller et polynukleotid som koder for Cas9-polyprotein,
for anvendelse i en fremgangsmåte for behandling av en pasient,

20 hvor i fremgangsmåten danner Cas9 et kompleks med et DNA-
målrettende RNA

og hvor det DNA-målrettende RNA-et omfatter

- (i) et DNA-målrettende segment omfattende en nukleotidsekvens som er
komplementær med en sekvens i et mål-DNA, og
- 25 (ii) et proteinbindende segment som interagerer med Cas9-polyprotein, hvor
det proteinbindende segmentet omfatter to komplementære strekninger av
nukleotider som hybridiserer for å danne et dobbelttrådet RNA (dsRNA) dupleks.

8. Aktivator-RNA, eller polynukleotid som koder for aktivator-RNA-et, for anvendelse i en fremgangsmåte for behandling av en pasient,

hvor i fremgangsmåten danner RNA-aktivatoren den ene halvparten av en dsRNA-dupleks av et proteinbindende segment av et DNA-målrettende RNA, og et
5 målretter-RNA danner den andre halvdelen av dsRNA-dupleksen til et proteinbindende segment av et DNA-målrettende RNA,

hvor i det DNA-målrettende RNA-et omfatter

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

10 (ii) et proteinbindende segment som interagerer med et Cas9-polypeptid, hvor i det proteinbindende segmentet omfatter to komplementære strekninger av nukleotider som hybridiserer for å danne et dobbeltrådet RNA (dsRNA) dupleks

og hvor i fremgangsmåten danner det DNA-målrettende RNA-et et kompleks med Cas9-polypeptidet.

15 9. Det DNA-målrettende RNA-et, polynukleotid som koder for det DNA-målrettende RNA-et, Cas9-polypeptidet, eller polynukleotidet som koder for Cas9-polypeptidet for anvendelse ifølge krav 6 eller 7, hvor i fremgangsmåten administreres

(a) det DNA-målrettende RNA-et, eller polynukleotidet som koder for det
20 DNA-målrettende RNA-et, og

(b) Cas9-polypeptidet, eller polynukleotidet som koder for Cas9-polypeptidet direkte til pasienten.

10. Fremgangsmåten, sammensetningen eller anvendelsen, eller det DNA-målrettende RNA-et, Cas9-polypeptidet, polynukleotidet som koder for Cas9-
25 polypeptidet, aktivator-RNA-et eller polynukleotidet som koder for aktivator-RNA-et for anvendelse ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 9,

hvor det DNA-målrettende RNA-et omfatter én eller flere av en modifisert nukleobase, en modifisert ryggrad eller ikke-naturlig internukleosidbinding, eller en modifisert sukkerdel.

11. Fremgangsmåten, sammensetningen eller anvendelsen, eller det DNA-
5 målrettende RNA-et, Cas9-polypeptidet, polynukleotidet som koder for Cas9-
polypeptidet, aktivator-RNA-et eller polynukleotidet som koder for aktivator-RNA-et
for anvendelse ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 10,

hvor det DNA-målrettende RNA-et omfatter én eller flere av en låst
nukleinsyre, en peptidnukleinsyre, en morfolinonukleinsyre eller en
10 sykloheksenylnukleinsyre (CeNA).

12. Fremgangsmåten, eller anvendelsen, eller det DNA-målrettende RNA-et,
polynukleotidet som koder for det DNA-målrettende RNA-et, Cas9-polypeptidet,
polynukleotidet som koder for Cas9-polypeptidet, aktivator-RNA-et eller
polynukleotidet som koder for aktivator-RNA-et for anvendelse, ifølge et hvilket
15 som helst av kravene 1 til 11,

hvor det DNA-målrettende RNA-et er et tomolekylært DNA-målrettende
RNA omfattende to separate RNA-molekyler, som hver omfatter én av de to
komplementære strekningene av nukleotider som hybridiserer for å danne dsRNA-
duplekset.

20 13. Fremgangsmåten, anvendelsen, det DNA-målrettende RNA-et,
polynukleotidet som koder for det DNA-målrettende RNA-et, Cas9-polypeptidet,
polynukleotidet som koder for Cas9-polypeptidet, aktivator-RNA-et eller
polynukleotidet som koder for aktivator-RNA-et for anvendelse, ifølge et hvilket
som helst av kravene 1 til 11

25 hvor det DNA-målrettende RNA-et er et enkeltmolekyl-DNA-målrettende
RNA hvor i det proteinbindende segmentet er de to komplementære strekningene
av nukleotider kovalent forbundet med mellomliggende nukleotider.

14. Fremgangsmåten, sammensetningen eller anvendelsen, eller det DNA-
målrettende RNA-et, polynukleotidet som koder for det DNA-målrettende RNA-et,
30 Cas9-polypeptidet, polynukleotidet som koder for Cas9-polypeptidet, aktivator-

RNA-et eller polynukleotidet som koder for aktivator-RNA-et for anvendelse, ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 13, hvori dsRNA-duplekset har:

- I. en lengde på fra 8 basepar (bp) til 15 bp;
- II. en lengde på fra 8 basepar (bp) til 30 bp; eller
- 5 II. en lengde på fra 15 basepar (bp) til 18 bp.

15. Fremgangsmåten eller anvendelsen ifølge et hvilket som helst av kravene 1, 4, 5 eller 10 til 14, hvori kontakten eller anvendelsen omfatter innføring i en celle (A) av Cas9-polypeptidet, eller et polynukleotid som koder for Cas9-polypeptidet, og (B) det DNA-målrettende RNA-et, eller ett eller flere DNA-polynukleotider som koder for det DNA-målrettende RNA-et; eventuelt hvori fremgangsmåten videre omfatter innføring i cellen av et donorpoly nukleotid;

eller

15 det DNA-målrettende RNA-et, polynukleotidet som koder for det DNA-målrettende RNA-et, Cas9-polypeptidet, polynukleotidet som koder for Cas9-polypeptidet, aktivator-RNA-et, eller polynukleotidet som koder for aktivator-RNA-et for anvendelse ifølge et hvilket som helst av kravene 6 til 14, hvori i fremgangsmåten ko-administreres det DNA-målrettende RNA-et, polynukleotidet som koder for det DNA-målrettende RNA-et, Cas9-polypeptidet, polynukleotidet som koder for Cas9-polypeptidet, aktivator-RNA-et, eller polynukleotidet som koder for aktivator-RNA-et med en donorpoly nukleotidsekvens omfattende homologi med mål-DNA-sekvensen.

16. Fremgangsmåten, sammensetningen eller anvendelsen, eller det DNA-målrettende RNA-et, polynukleotidet som koder for det DNA-målrettende RNA-et, Cas9-polypeptidet, polynukleotidet som koder for Cas9-polypeptidet, aktivator-RNA-et eller polynukleotidet som koder for aktivator-RNA-et for anvendelse ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 15,

25 hvori nukleotidsekvensen som er komplementær med en sekvens i mål-DNA-et er 18 til 20 nt lang, eller 20 til 25 nt lang.

17. Fremgangsmåten eller anvendelsen, eller det DNA-målrettende RNA-et, polynukleotidet som koder for det DNA-målrettende RNA-et, Cas9-polypeptidet, polynukleotidet som koder for Cas9-polypeptidet, aktivator-RNA-et eller polynukleotidet som koder for aktivator-RNA-et for anvendelse, ifølge et hvilket
5 som helst av kravene 1 eller 4 til 16,

hvor et proteintransduksjonsdomene er kovalent forbundet til (A) aminoenden til Cas9-polypeptidet eller (B) karboksylenden til Cas9-polypeptidet, hvor proteintransduksjonsdomenet letter traverseringen av Cas9-polypeptidet fra cytosolen til i en organell i en celle.