



(12) Translation of
European patent specification

(11) NO/EP 3604527 B1

NORWAY

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

Norwegian Industrial Property Office

(45)	Translation Published	2021.08.09
(80)	Date of The European Patent Office Publication of the Granted Patent	2021.05.12
(86)	European Application Nr.	19186629.2
(86)	European Filing Date	2017.02.20
(87)	The European Application's Publication Date	2020.02.05
(30)	Priority	2016.06.02, US, 201662344858 P 2016.07.05, US, 201662358415 P
(84)	Designated Contracting States:	AL ; AT ; BE ; BG ; CH ; CY ; CZ ; DE ; DK ; EE ; ES ; FI ; FR ; 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	EP3272867, 2017.02.20
(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
(74)	Agent or Attorney	BRYN AARFLOT AS, Stortingsgata 8, 0161 OSLO, Norge

(54)	Title	USING PROGRAMMABLE DNA BINDING PROTEINS TO ENHANCE TARGETED GENOME MODIFICATION
(56)	References Cited:	WO-A1-2016/007604, WO-A1-2014/089290, WO-A1-2017/096328, WO-A2-2016/073990, WO-A1-2017/070598, WO-A1-2014/191518, WO-A1-2016/036754 BERND ZETSCHE ET AL: "Cpf1 Is a Single RNA-Guided Endonuclease of a Class 2 CRISPR-Cas System", CELL, vol. 163, no. 3, 1 October 2015 (2015-10-01), pages 759-771, XP055267511, US ISSN: 0092-8674, DOI: 10.1016/j.cell.2015.09.038 F. ANN RAN ET AL: "Double Nicking by RNA-Guided CRISPR Cas9 for Enhanced Genome Editing Specificity", CELL, vol. 154, no. 6, 1 September 2013 (2013-09-01), pages 1380-1389, XP055299681, US ISSN: 0092-8674, DOI: 10.1016/j.cell.2013.08.021 CHRISTOPHER D RICHARDSON ET AL: "Enhancing homology-directed genome editing by catalytically active and inactive CRISPR-Cas9 using asymmetric donor DNA", NATURE BIOTECHNOLOGY (ADVANCE ONLINE PUBLICATION), vol. 34, no. 3, 20 January 2016 (2016-01-20), pages 339-344, XP055401340, ISSN: 1087-0156, DOI: 10.1038/nbt.3481 -& CHRISTOPHER D RICHARDSON ET AL: "Supplementary Information: Enhancing homology-directed genome editing by catalytically active and inactive CRISPR-Cas9 using asymmetric donor DNA", NATURE BIOTECHNOLOGY (ADVANCE ONLINE PUBLICATION), vol. 34, no. 3,

20 January 2016 (2016-01-20), pages 339-344, XP055401621, ISSN: 1087-0156, DOI: 10.1038/nbt.3481

CHEN FUQIANG ET AL: "Targeted activation of diverse CRISPR-Cas systems for mammalian genome editing via proximal CRISPR targeting.", NATURE COMMUNICATIONS APRIL 07 2017, vol. 8, 7 April 2017 (2017-04-07), pages 1-12, XP002776524, ISSN: 2041-1723, DOI: 10.1038/ncomms14958 -& CHEN FUQIANG ET AL: "Supplementary Information: Targeted activation of diverse CRISPR-Cas systems for mammalian genome editing via proximal CRISPR targeting", NATURE COMMUNICATIONS, vol. 8, no. 14958, 7 April 2017 (2017-04-07), pages 1-18, XP002776525, ISSN: 2041-1723, DOI: 10.1038/ncomms14958

Anonymous: "Using Cpf1 for CRISPR . Benchling", , 1 January 2015 (2015-01-01), pages 1-4, XP055396832, Retrieved from the Internet: URL:https://benchling.com/pub/cpf1 [retrieved on 2017-08-08]

INES FONFARA ET AL: "The CRISPR-associated DNA-cleaving enzyme Cpf1 also processes precursor CRISPR RNA", NATURE, vol. 532, 20 April 2016 (2016-04-20), pages 517-521, XP055349049, ISSN: 0028-0836, DOI: 10.1038/nature17945

ROBERT D. FAGERLUND ET AL: "The Cpf1 CRISPR-Cas protein expands genome-editing tools", GENOME BIOLOGY, vol. 523, no. 1, 17 December 2015 (2015-12-17), page 481, XP055271439, GB ISSN: 1465-6906, DOI: 10.1186/s13059-015-0824-9

FUQIANG CHEN ET AL: "Improving CRISPR Gene Editing Efficiency by Proximal dCas9 Targeting", BIO-PROTOCOL, vol. 7, no. 15, 5 August 2017 (2017-08-05) , XP055432655, ISSN: 2331-8325, DOI: 10.21769/BioProtoc.2432

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. In vitro-fremgangsmåte for å øke målrettet genommodifiseringseffektivitet og/eller spesifisitet i en eukaryot celle, fremgangsmåten omfattende innføring i den eukaryote cellen av en sammensetning omfattende:

a. et CRISPR-system som har bindingsaktivitet og dobbeltstrenget spaltingsaktivitet, eller en nukleinsyre som koder for CRISPR-systemet, CRISPR-systemet omfattende (i) et CRISPR/Cas9-protein av katalytisk aktiv type II eller et CRISPR/Cpf1-protein av katalytisk aktiv type V, og (ii) et guide-RNA; og

b. minst ett CRISPR-system som har bindingsaktivitet, men som mangler spaltingsaktivitet, eller en nukleinsyre som koder for CRISPR-systemet, CRISPR-systemet omfattende (i) CRISPR/Cas9-protein av en katalytisk inaktiv type II, og (ii) et guide-RNA; og

c. et donorpoly nukleotid omfattende en donorsekvens, hvori CRISPR-systemet (a) målrettes mot en kromosomal målsekvens, og hvert av det minst ene CRISPR-systemet (b) målrettes mot et sted nær den kromosomale målsekvensen, og

å binde det minst ene CRISPR-systemet (b) til stedet nær den kromosomale målsekvensen øker tilgjengeligheten av CRISPR-systemet (a) til den kromosomale målsekvensen, og derved øker effektiviteten og/eller spesifisiteten til integrering eller utveksling av donorsekvensen med den kromosomale målsekvensen og modifiserer derved genomet i den eukaryote cellen.

2. Fremgangsmåten ifølge krav 1, hvori stedet nærmest den kromosomale målsekvensen er lokalisert innenfor 250, 100, 75, 50 eller 25 basepar på hver side av den kromosomale målsekvensen.

3. Fremgangsmåten ifølge krav 1 eller krav 2, hvori den eukaryote cellen er en pattedyr-celle, hvori pattedyrcellen er en human celle eller en ikke-human celle.

4. Sammensetning, omfattende:

a. et CRISPR-system som har bindingsaktivitet og dobbeltstrenget spaltingsaktivitet, eller en nukleinsyre som koder for CRISPR-systemet, CRISPR-systemet omfattende (i) et CRISPR/Cas9-protein av katalytisk aktiv type II eller et CRISPR/Cpf1-protein av katalytisk aktiv type V, og (ii) et guide-RNA; og

b. minst ett CRISPR-system som har bindingsaktivitet, men som mangler

spaltingsaktivitet, eller en nukleinsyre som koder for CRISPR-systemet, CRISPR-systemet omfattende (i) CRISPR/Cas9-protein av en katalytisk inaktiv type II, og (ii) et guide-RNA; og

c. et donorpoly nukleotid omfattende en donorsekvens, og hvori

sammensetningen som definert ovenfor er ikke offentliggjort i WO2017/070598 eller

WO2017/096328.

5. Fremgangsmåten ifølge kravene 1–3, eller sammensetning ifølge krav 4, hvori donorpoly nukleotidet ikke er kovalent festet til guide-RNA-et i CRISPR-systemet (a) eller guide-RNA-et i det minst ene CRISPR-systemet (b).

6. Fremgangsmåten eller sammensetningen ifølge et hvilket som helst foregående krav, hvori

(i) CRISPR-systemet som har bindingsaktivitet og dobbeltstrenget spaltingsaktivitet omfatter et CRISPR/Cas9-protein av type II og det minst ene CRISPR-systemet som har bindingsaktivitet, men som mangler spaltingsaktivitet, omfatter et CRISPR/Cas9-protein av type II,

(ii) CRISPR-systemet som har bindingsaktivitet og dobbeltstrenget spaltingsaktivitet omfatter et CRISPR/Cpf1-protein av type V og det minst ene CRISPR-systemet som har bindingsaktivitet, men som mangler spaltingsaktivitet, omfatter et CRISPR/Cas9-protein av type II.

7. Fremgangsmåten eller sammensetningen ifølge et hvilket som helst foregående krav, hvori (i) CRISPR-proteinet av type II velges fra *Francisella novicida* CRISPR-Cas9 (FnCas9), *Campylobacter jejuni* CRISPR-Cas9 (CjCas9) og *Streptococcus pyogenes* CRISPR-Cas9 (SpCas9); og/eller (ii) CRISPR-proteinet av type V er *Francisella novicida* CRISPR-Cpf1 (FnCpf1).

8. Fremgangsmåten eller sammensetningen ifølge et hvilket som helst foregående krav, hvori det minst ene CRISPR-systemet som har bindingsaktivitet, men som mangler spaltingsaktivitet, omfatter et CRISPR-protein av Cas9 type II, hvori Cas9-proteinet har én eller flere mutasjoner i hvert av det RuvC-lignende domenet og det HNH-lignende domenet.

9. Fremgangsmåten eller sammensetningen ifølge krav 8, hvori (i) den ene eller flere mutasjonene i det RuvC-lignende domenet er D10A, D8A, E762A, og/eller D986A; og/eller

(ii) den ene eller flere mutasjonene i det HNH-lignende domenet er H840A, H559A, N854A, N856A og/eller N863A.

- 5 **10.** Fremgangsmåten eller sammensetningen ifølge et hvilket som helst foregående krav, hvori nukleinsyre som koder for hvert CRISPR-protein er mRNA eller DNA.
- 10 **11.** Fremgangsmåten eller sammensetningen ifølge et hvilket som helst foregående krav, hvori nukleinsyre som koder for hvert CRISPR-protein er en del av en plasmidvektor eller en virusvektor.
- 10 **12.** Fremgangsmåten eller sammensetningen ifølge et hvilket som helst foregående krav, hvori nukleinsyre som koder for hvert guide-RNA er en del av en plasmidvektor eller en virusvektor.
- 15 **13.** Fremgangsmåten eller sammensetningen ifølge et hvilket som helst foregående krav, hvori guide-RNA-et til hvert CRISPR-system er (a) enzymatisk syntetisert eller (b) minst delvis kjemisk syntetisert.
- 20 **14.** Fremgangsmåten eller sammensetningen ifølge et hvilket som helst foregående krav, hvori donorsekvensen er en eksogen sekvens.
- 25 **15.** Fremgangsmåten eller sammensetningen ifølge et hvilket som helst foregående krav, hvori donorpolynukleotidet er en vektor.
- 25 **16.** Fremgangsmåten eller sammensetningen ifølge et hvilket som helst av kravene 1–14, hvori donorpolynukleotidet er en lineær sekvens.
- 30 **17.** Sett omfattende sammensetningen ifølge et hvilket som helst av kravene 4 til 16.
- 30 **18.** Sammensetning ifølge et hvilket som helst av kravene 4–16, eller sett ifølge krav 17, for anvendelse i terapi.

19. Sammensetning ifølge et hvilket som helst av kravene 4–16, eller sett ifølge krav 17, for anvendelse i behandling av sigdcellesykdom, talassemi, alvorlig kombinert immunsvikt (SCID), Huntingtons sykdom eller retinitis pigmentosa.