



(12) Translation of
European patent specification

(11) NO/EP 4289948 B1

NORWAY

(19) NO

(51) Int Cl.

C12N 15/11 (2006.01) C12N 15/113 (2010.01)

A61K 38/46 (2006.01) C12N 15/63 (2006.01)

C12N 9/22 (2006.01) C12N 15/90 (2006.01)

C12N 15/10 (2006.01)

Norwegian Industrial Property Office

(45)	Translation Published	2025.06.02
(80)	Date of The European Patent Office Publication of the Granted Patent	2025.02.26
(86)	European Application Nr.	23187511.3
(86)	European Filing Date	2013.03.15
(87)	The European Application's Publication Date	2023.12.13
(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	EP3597749, 2013.03.15
(73)	Proprietor	The Regents of the University of California, 1111 Franklin Street, 12th Floor, Oakland, CA 94607, USA Universität Wien, Universitätsring 1, 1010 Vienna, Østerrike Charpentier, Emmanuelle, Max Planck Unit for the Science of Pathogens Virchowweg 12, 10117 Berlin, Tyskland
(72)	Inventor	CHARPENTIER, Emmanuelle, 10117 Berlin, Tyskland JINEK, Martin, Berkeley, 94709, USA DOUDNA CATE, James Harrison, Berkeley, 94705, USA LIM, Wendell, San Francisco, 94118, USA QI, Lei, Albany, 94706, USA CHYLINSKI, Krzysztof, 1110 Vienna, Østerrike DOUDNA, Jennifer, Berkeley, 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-A2-2008/108989
 WO-A2-2011/072246
 WO-A1-2010/021692

JEFFREY C MILLER ET AL: "A TALE nuclease architecture for efficient genome editing", NATURE BIOTECHNOLOGY, vol. 29, no. 2, 22 December 2010 (2010-12-22), New York, pages 143 - 148, XP055568321, ISSN: 1087-0156, DOI: 10.1038/nbt.1755

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

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, [retrieved on 20060117], DOI: 10.1016/J.GENE.2005.09.011

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), US, pages - 821, XP055067747, ISSN: 0036-8075, DOI: 10.1126/science.1225829

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

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

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

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. Enkeltmolekyl-DNA-målrettende RNA som binder seg til et stedsrettet
modifiserende polypeptid og målretter det stedsrettede modifiserende polypeptidet
til en spesifikk lokasjon i et mål-DNA, hvori det enkeltmolekyl-DNA-målrettende
5 RNA-et omfatter:

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

(b) et proteinbindende segment som interagerer med det stedsrettede
modifiserende polypeptidet som er en naturlig forekommende Cas9-
10 endonuklease, hvori det proteinbindende segmentet omfatter to komplementære
strekninger av nukleotider som hybridiserer for å danne en dobbelttrådet RNA
(dsRNA) dupleks, og

hvori det enkeltmolekyl-DNA-målrettende RNA-et, sammen med det
stedsrettede modifiserende polypeptidet som er en naturlig forekommende Cas9-
15 endonuklease, tilveiebringer stedsspesifikk spalting av mål-DNA-et for å generere
et dobbelttrådet brudd.

2. Det enkeltmolekyl-DNA-målrettende RNA-et ifølge krav 1, hvori
nukleotidsekvensen av det DNA-målrettende segmentet som er komplementær
med en sekvens i mål-DNA-et er større enn 15 nukleotider.

20 3. Enkeltmolekyl-DNA-målrettende RNA som binder seg til et stedsrettet
modifiserende polypeptid og målretter det stedsrettede modifiserende polypeptidet
til en spesifikk lokasjon i et mål-DNA, hvori det enkeltmolekyl-DNA-målrettende
RNA-et omfatter:

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

(b) et proteinbindende segment som interagerer med det stedsrettede
modifiserende polypeptidet som er en naturlig forekommende Cas9-
endonuklease, hvori det proteinbindende segmentet omfatter to komplementære

strekninger av nukleotider som hybridiserer for å danne en dobbelttrådet RNA (dsRNA) dupleks,

hvor i nukleotidsekvensen som er komplementær med en sekvens i mål-DNA-et er større enn 15 nukleotider.

5 4. Det enkeltmolekyl-DNA-målrettende RNA-et ifølge krav 3,

hvor i det enkeltmolekyl-DNA-målrettende RNA-et, sammen med et stedsrettet modifierende polypeptid som er en naturlig forekommende Cas9-endonuklease, tilveiebringer stedsspesifikk spalting av mål-DNA-et for å generere et dobbelttrådet brudd.

10 5. Det enkeltmolekyl-DNA-målrettende RNA-et ifølge et hvilket som helst av kravene 1 og 4, hvor i det er det enkeltmolekyl-DNA-målrettende RNA-et som tilveiebringer spesifisitet til et kompleks dannet av det DNA-målrettende RNA-et og den naturlig forekommende Cas9-endonukleasen, for mål-DNA-et ved sekvensen til det DNA-målrettende segmentet som er komplementært med sekvensen i mål-DNA-et, og hvor i det er den naturlig forekommende Cas9-endonukleasen av
15 komplekset som tilveiebringer nukleaseaktivitet til komplekset, nukleaseaktiviteten spalter mål-DNA-et ved en mål-DNA-sekvens definert av komplementaritetsregionen mellom det DNA-målrettende RNA-et og mål-DNA-et.

6. Det enkeltmolekyl-DNA-målrettende RNA-et ifølge et hvilket som helst av
20 kravene 1–5, hvor i de to komplementære strekningene av nukleotider er kovalent bundet av mellomliggende nukleotider.

7. Det enkeltmolekyl-DNA-målrettende RNA-et ifølge et hvilket som helst av kravene 1–6, hvor i den første av de to komplementære strekningene av det proteinbindende segmentet omfatter en crRNA-repetisjonsstrekning og hvor i den
25 andre av de to komplementære strekningene av det proteinbindende segmentet omfatter en tracrRNA-strekning.

8. Det enkeltmolekyl-DNA-målrettende RNA-et ifølge krav 7, hvor i crRNA-repetisjonsstrekningen og tracrRNA-strekningen er fra *S. pyogenes*.

9. Det enkeltmolekyl-DNA-målrettende RNA-et ifølge et hvilket som helst av kravene 1–8, hvori den naturlig forekommende Cas9-endonukleasen er fra *S. pyogenes*.
10. Det enkeltmolekyl-DNA-målrettende RNA-et ifølge et hvilket som helst av kravene 1–9, hvori det enkeltmolekyl-DNA-målrettende RNA-et omfatter nukleinsyremodifikasjoner valgt fra gruppen som består av modifiserte ryggrader og modifiserte internukleosidbindinger, nukleinsyremimetikk, modifiserte sukkerdeler, basemodifikasjoner og substitusjoner og konjugater.
11. DNA-polynukleotid omfattende en nukleotidsekvens som koder for det DNA-målrettende RNA-et ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 9.
12. Rekombinant uttrykkingsvektor omfattende DNA-polynukleotidet ifølge krav 11.
13. Den rekombinante uttrykkingsvektoren ifølge krav 12, hvori nukleotidsekvensen som koder for det DNA-målrettende RNA-et er operativt koblet til en promotor.
14. Den rekombinante uttrykkingsvektoren ifølge krav 13, hvori promotoren er en induserbar promotor.
15. DNA-målrettende RNA som binder seg til et stedsrettet modifiserende polypeptid og målretter det stedsrettede modifiserende polypeptidet til en spesifikk lokasjon i et mål-DNA, hvori det DNA-målrettende RNA-et omfatter:
- (a) et DNA-målrettende segment omfattende en nukleotidsekvens som er komplementær med en målsekvens i et mål-DNA, og
- (b) et proteinbindende segment som interagerer med det stedsrettede modifiserende polypeptidet som er en naturlig forekommende Cas9-endonuklease, hvori det proteinbindende segmentet omfatter to komplementære strekninger av nukleotider som hybridiserer for å danne en dobbeltrådet RNA (dsRNA) dupleks,

hvor det DNA-målrettende RNA-et omfatter nukleinsyremodifikasjoner valgt fra gruppen som består av modifiserte ryggrader og modifiserte internukleosidbindinger, nukleinsyremimetikk, modifiserte sukkerdeler, basemodifikasjoner og substitusjoner og konjugater.

5 16. Det DNA-målrettende RNA-et ifølge krav 15, hvor det DNA-målrettende RNA-et er et dobbeltmolekylært DNA-målrettende RNA.

17. Det DNA-målrettende RNA-et ifølge krav 15, hvor det DNA-målrettende RNA-et er et enkeltmolekyl-DNA-målrettende RNA.

10 18. Det enkeltmolekyl-DNA-målrettende RNA-et ifølge krav 17, hvor de to komplementære strekningene av nukleotider er kovalent koblet ved mellomliggende nukleotider.

19. Det DNA-målrettende RNA-et ifølge et hvilket som helst av kravene 15–18,

15 hvor det DNA-målrettende RNA-et, sammen med et stedsrettet modifiserende polypeptid som er en naturlig forekommende Cas9-endonuklease, tilveiebringer stedsspesifikk spalting av mål-DNA-et for å generere et dobbelttrådet brudd.

20. Det DNA-målrettende RNA-et ifølge krav 18,

20 hvor det er det DNA-målrettende RNA-et som tilveiebringer spesifisitet til et kompleks dannet av det DNA-målrettende RNA-et og den naturlig forekommende Cas9-endonukleasen, for mål-DNA-et ved sekvensen til det DNA-målrettende segmentet som er komplementært med sekvensen i mål-DNA-et, og

25 hvor det er den naturlig forekommende Cas9-endonukleasen av komplekset som tilveiebringer nukleaseaktivitet til komplekset, nukleaseaktiviteten spalter mål-DNA-et ved en mål-DNA-sekvens definert av komplementaritetsregionen mellom det DNA-målrettende RNA-et og mål-DNA-et.

21. Det DNA-målrettende RNA-et ifølge et hvilket som helst av kravene 15–20, hvor den første av de to komplementære strekningene av det proteinbindende

segmentet omfatter en crRNA-repetisjonsstrekning og hvori den andre av de to komplementære strekningene av det proteinbindende segmentet omfatter en tracrRNA-strekning.

22. Det DNA-målrettende RNA-et ifølge krav 21, hvori crRNA-
5 repetisjonsstrekningen og tracrRNA-strekningen er fra *S. pyogenes*.

23. Det DNA-målrettende RNA-et ifølge et hvilket som helst av kravene 15–22, hvori den naturlig forekommende Cas9-endonukleasen er fra *S. pyogenes*.

24. Kompleks som dannes av

(i) et enkeltmolekyl-DNA-målrettende RNA ifølge et hvilket som helst av
10 kravene 1–10 eller et DNA-målrettende RNA ifølge et hvilket som helst av kravene 15–23, og

(ii) et stedsrettet modifierende polypeptid som er en naturlig forekommende Cas9-endonuklease.

25. Sammensetning omfattende:

15 (i) et enkeltmolekyl-DNA-målrettende RNA ifølge et hvilket som helst av kravene 1–10 eller et DNA-målrettende RNA ifølge et hvilket som helst av kravene 15–23, og

(ii) et stedsrettet modifierende polypeptid som er en naturlig forekommende Cas9-endonuklease.