

ALMA MATER STUDIORUM  
Università di Bologna

**Corso di studi in Farmacia**

CRISPR - SISTEMA DNA-EDITING -  
PANORAMICA DEI BREVETTI CONCESSI  
E DELLE DOMANDE DI BREVETTO DEPOSITATE  
IN EUROPA

**Tesi di laurea in Socio-economia e Brevettistica  
Farmaceutiche**

Presentata da

Luisa Leo

Relatore

Prof.ssa Patrizia Rampinelli

Correlatore

Dr. Claudio Germinario

ANNO ACCADEMICO 2018 -2019

# INDICE

<b>INTRODUZIONE</b> .....	6
METODI DI RICERCA E SELEZIONE APPLICATI NELL'ANALISI PRESENTATA.....	7
<b>CAPITOLO 1</b> .....	9
PREMESSA.....	9
<b>1.1. L'INVENZIONE</b> .....	9
<b>1.2. IL BREVETTO</b> .....	9
1.2.1. LA CONVENZIONE SUL BREVETTO EUROPEO.....	9
1.2.2. DOMANDA DI BREVETTO: STRUTTURA.....	10
1.2.3. LE RIVENDICAZIONI (CLAIMS): FORMA E CONTENUTO.....	11
1.2.4. DATE RILEVANTI: DI PRIORITA' E DI DOMANDA.....	11
1.2.5. BREVETTO E ATTUAZIONE DELL'INVENZIONE.....	12
1.2.6. ESTENSIONE DELLA PROTEZIONE SUI MEDICINALI.....	13
<b>1.3. REQUISITI DI BREVETTABILITA'</b> .....	13
1.3.1. NOVITA'.....	14
- 1.3.1.1. PRIOR ART e RICERCA DOCUMENTALE.....	14
1.3.2. ATTIVITA' INVENTIVA.....	15
1.3.3. APPLICABILITA' INDUSTRIALE.....	15
<b>1.4. CHIAREZZA E SUFFICIENZA DI DESCRIZIONE</b> .....	15
<b>1.5. DECADENZA DEL BREVETTO</b> .....	16
<b>1.6. DEFINIZIONE DELL'AMBITO DI PROTEZIONE</b> .....	16
<b>1.7. ESCLUSIONI DALLA BREVETTABILITÀ</b> .....	17
1.7.1. VARIETA' VEGETALI E RAZZE ANIMALI.....	17
1.7.2. RAPPORTO TRA PROCESSI ESSENZIALMENTE BIOLOGICI E LORO PRODOTTI.....	18
<b>1.8. BREVETTABILITA' NEL SETTORE BIOTECNOLOGICO</b> .....	20
1.8.1. GENERALITA' E DEFINIZIONI.....	20
1.8.2. INVENZIONI BIOTECNOLOGICHE BREVETTABILI.....	20
1.8.3. ECCEZIONI ALLA BREVETTABILITA' NEL SETTORE BIOTECNOLOGICO.....	21
1.8.4. SEQUENZE NUCLEOTIDICHE E AMMINOACIDICHE.....	22
1.8.5. DEPOSITO DI MATERIALE BIOLOGICO.....	22
1.8.6. DISPONIBILITA' DEL MATERIALE BIOLOGICO.....	23
<b>CAPITOLO 2</b> .....	24
<b>2.1. CRISPR: COS'È?</b> .....	24
<b>2.2. Come funziona CRISPR?</b> .....	24

<b>2.3. Cosa significa CRISPR?</b> .....	25
<b>2.4. Un po' di storia: COME È STATO SCOPERTO?</b> .....	25
<b>2.5. IN CHE MODO LE REGIONI CRISPR ACQUISISCONO L'IMMUNITA' ADATTIVA?</b> .....	26
(i) ADATTAMENTO .....	27
(ii) ESPRESSIONE: COME SI MANIFESTA L'IMMUNITA' ACQUISITA? .....	27
(iii) SILENZIAMENTO .....	28
<b>2.6. TIPI DI CRISPR</b> .....	29
<b>2.7. SISTEMA CRISPR/Cas9</b> .....	30
2.7.1. L'ENZIMA CAS9 .....	31
2.7.2. STRUTTURA DI CAS9 .....	31
2.7.3. RNA GUIDA E LEGAME CON CAS9 .....	32
2.7.4. RICONOSCIMENTO DEL TARGET.....	33
2.7.5. APPAIAMENTO .....	34
2.7.6. ETERODUPLEX .....	34
2.7.7. PAM – PROTOSPACER ADJACENT MOTIF .....	35
2.7.8. <i>CLEAVAGE</i> DEL TARGET: SIMULTANEO, AD OPERA DI HNH E RuvC .....	35
<b>2.8. DAL TAGLIO DEL DNA-TARGET OPERATO DAL CRISPR AL GENE EDITING</b> .....	36
2.8.1. RIPARAZIONE DEI DOUBLE STRAND BREAKS.....	37
2.8.2. PROGRAMMABILITA' DEL SISTEMA.....	39
<b>2.9. SVILUPPI DEL SISTEMA CRISPR/CAS</b> .....	39
2.9.1. ULTERIORI SVILUPPI e UTILIZZI.....	40
<b>2.10. APPLICAZIONI SUL LUNGO TERMINE</b> .....	41
<b>2.11. OSTACOLI</b> .....	41
<b>2.12. SOLUZIONI PROPOSTE</b> .....	41
<b>CAPITOLO 3 - LITIGATION USA</b> .....	43
<b>3.1. UNIVERSITA' DELLA CALIFORNIA – UC BERKELEY</b> .....	43
<b>3.2. BROAD INSTITUTE</b> .....	43
<b>3.3. LA PROCEDURA DI INTERFERENZA</b> .....	43
3.3.1. LE DECISIONI DI PRIMO GRADO E DI APPELLO NEGLI USA.....	44
3.3.2. <i>“LA MANCANZA DI RAGIONEVOLE ASPETTATIVA DI SUCCESSO” (“Reasonable Expectation of success)</i> come criterio di valutazione della non-ovvietà di una nuova invenzione .....	45
<b>3.4. CONCLUSIONI</b> .....	51
<b>CAPITOLO 4 - LO SCENARIO EUROPEO</b> .....	52
<b>4.1. L'ITER EUROPEO: INVALIDITA' DELLA PRIORITA'</b> .....	53
4.1.1. INCOMPLETA CESSIONE DEI DIRITTI di PRIORITÀ: LA DATA RILEVANTE CORRISPONDE AL DEPOSITO DELLA DOMANDA .....	54

<b>CAPITOLO 5 - PANORAMA BREVETTUALE EUROPEO</b> .....	56
<b>5.1. Primi Brevetti CRISPR in Europa antecedenti alle invenzioni della <i>California University</i> e del <i>Broad Institute</i>:</b> .....	56
5.1.1. Applicati a batteri e virus batteriofagi.....	56
5.1.2. MARKER.....	56
<b>5.2. 2013: NUOVE APPLICAZIONI DEL SISTEMA CRISPR</b> .....	57
5.2.1. MARZO: l’invenzione nata a BERKELEY (EP2800811).....	57
5.2.2. OTTOBRE 2013: TOOLGEN.....	59
5.2.3. DICEMBRE 2013: BROAD INSTITUTE RIVENDICA L’ APPLICAZIONE DEL SISTEMA AGLI EUCARIOTI.....	59
<b>5.3 - BREVETTI CONCESSI DALL’EPO</b> .....	60
5.3.1.    INVENZIONI RELATIVE ALL’INTRODUZIONE DEL SISTEMA CRISPR DI ORIGINE BATTERICA NELLA CELLULA OSPITE (DELIVERY).....	60
5.3.1.1. Sistemi nanoparticellari.....	60
5.3.1.2. Sistemi non virali – metodi fisici.....	61
5.3.1.3. Sistemi virali.....	61
5.3.1.4. Adeno Associated Virus AAV.....	62
5.3.2. INVENZIONI RELATIVE A NUOVI VETTORI DI ESPRESSIONE.....	63
5.3.3.    INVENZIONI RELATIVE A COMPONENTI CRISPR MODIFICATI.....	63
5.3.4.    INVENZIONI RELATIVE A NUOVE ATTIVITÀ DEL SISTEMA.....	65
5.3.5.    INVENZIONI DI APPLICAZIONE: GENE EDITING E/O SILENZIAMENTO GENOMICO.....	65
5.3.6.    BREVETTI EUROPEI CONCESSI SU INVENZIONI IN ALTRI AMBITI TECNICI REALIZZABILI PER MEZZO DI VARIE TECNOLOGIE DI GENE EDITING, TRA CUI IL CRISPR-Cas SYSTEM.....	65
5.3.6.1.    Vegetali.....	66
5.3.6.2.    Animali.....	66
<b>5.4.    POSSIBILI APPLICAZIONI TERAPEUTICHE DEL CRISPR-Cas SYSTEM</b> .....	67
5.4.1. APPLICAZIONI TERAPEUTICHE BREVETTATE (i.e. Brevetti già concessi).....	67
5.4.2. DOMANDE DI BREVETTO EUROPEO CHE APPLICANO IL SISTEMA CRISPR-Cas INGEGNERIZZATO A COMPOSIZIONI O A METODI DI TRATTAMENTO TERAPEUTICO.....	69
5.4.2.1. DMD (Distrofia muscolare di Duchenne).....	69
5.4.2.2. VIRUS HIV.....	70
5.4.2.3. IMMUNOTERAPIA.....	71
5.4.2.4. IMMUNODEFICIENZA GRAVE COMBINATA (Serious Combined Immuno Deficiency).....	71
5.4.2.5. EMOCROMATOSI EREDITARIA.....	72
5.4.2.6. GENE EDITING DELLE CELLULE EMATOPOIETICHE.....	72
5.4.2.7. ENDONUCLEASI LEGANTI IL GENE CODIFICANTE PER IL FATTORE VIII DELLA COAGULAZIONE E COMPOSIZIONI PER IL TRATTAMENTO DELL’EMOFILIA.....	73
5.4.2.8. RETINITE PIGMENTOSA E SINDROME DI USHER (un primo brevetto in fase di concessione ed un secondo brevetto già concesso).....	74
5.4.2.9. AMAUROSIS CONGENITA DI LEBER.....	74

5.4.2.10. MALATTIE AUTOSOMICHE DOMINANTI.....	74
5.4.2.11. MALATTIA DI HUNTINGTON.....	74
5.4.2.12. SINDROME DEL CROMOSOMA X FRAGILE.....	75
5.4.2.13. GLAUCOMA.....	75
5.4.2.14. MIOPATIE TITINA-DIPENDENTI.....	76
5.4.2.15. SCLEROSI LATERALE AMIOTROFICA e DEGENERAZIONE LOBARE FRONTOTEMPORALE.....	76
5.4.2.16. REGOLAZIONE DELLA TRASCRIZIONE E APPLICAZIONE AL TRATTAMENTO DEL MAL DI SCHIENA.....	76
5.4.2.17. ERADICAZIONE GUIDATA DA RNA DELL'HERPES SIMPLEX DI TIPO I E DI ALTRI HERPESVIRUS.....	77
5.4.2.18. DOLORE NEUROPATICO.....	77
<b>CAPITOLO 6 - APPLICAZIONI DEL CRISPR: IN AGRICOLTURA.....</b>	<b>79</b>
<b>6.1. PRODOTTO DEL GENE EDITING.....</b>	<b>79</b>
<b>6.2. GENOMA TRANSGENICO.....</b>	<b>79</b>
<b>6.3. OGM IN EUROPA.....</b>	<b>80</b>
6.3.1. OBBLIGO PER GLI STATI.....	81
6.3.2. ESCLUSIONI.....	81
6.3.3. CONSIDERAZIONI e CONSEGUENZE.....	81
<b>6.4. USA E GIAPPONE, CROPS by CRISPR.....</b>	<b>82</b>
<b>CONCLUSIONI.....</b>	<b>83</b>
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>85</b>
BREVETTI CONCESSI IN EUROPA.....	86
BREVETTI CONCESSI NEGLI STATI UNITI.....	89
DOMANDE DI BREVETTO EUROPEO.....	89
FONTI NORMATIVE.....	91
ALTRE FONTI UFFICIALI.....	92
BANCHE DATI.....	92
<b>RINGRAZIAMENTI.....</b>	<b>94</b>

## **INTRODUZIONE**

Il presente lavoro è un'analisi del panorama brevettuale europeo relativo alla tecnologia di gene editing ad oggi la più moderna e innovativa: il sistema CRISPR- Cas.

L'analisi è stata condotta durante il mio tirocinio presso la Società Italiana Brevetti (sede di Roma), sotto la guida del Dottor Claudio Germinario, esperto in materia di brevetti, in particolare applicati al settore biotecnologico e farmaceutico.

Il primo capitolo illustra in sintesi i requisiti di brevettabilità. Sono poi trattati i requisiti generali e successivamente sono approfonditi quelli cui è assoggettato il settore delle biotecnologie, riportando le decisioni di alcuni casi di giurisprudenza.

Nel secondo capitolo è trattato il sistema batterico CRISPR-Cas: dal locus genico che lo codifica all'adempimento della sua funzione di taglio e digestione dell'acido nucleico, passando per la sua maturazione e per il riconoscimento della sequenza nucleotidica target.

Il terzo capitolo presenta la litigation statunitense che ha coinvolto la University of California e il Broad Institute, titolari dei primi due brevetti i quali, a distanza di pochi mesi l'un dall'altro, hanno descritto l'ingegnerizzazione del sistema batterico CRISPR-Cas, che ne ha permesso l'utilizzo, in qualità di tecnologia di gene editing, applicata prima in termini generici a qualsiasi cellula e successivamente nello specifico alle cellule eucariotiche.

Il quarto capitolo presenta la situazione europea relativa agli stessi brevetti (in versione europea) ed esamina le ragioni della sentenza della Divisione d'Opposizione dell'Ufficio Europeo dei Brevetti (EPO), che ha disposto la revoca del brevetto in precedenza concesso al Broad Institute.

Il quinto capitolo è il cuore della tesi e dell'analisi che ho condotto, poiché si prefigge di inquadrare lo scenario brevettuale europeo inerente al sistema CRISPR-Cas.

In particolare abbiamo analizzato:

- Brevetti relativi alle prime applicazioni del sistema batterico agli stessi batteri o a virus.
- Brevetti depositati dopo il 2012, cioè dopo la pubblicazione delle domande di brevetto della California University e del Broad Institute, brevetti relativi all'applicazione del sistema, che è di origine batterica, a cellule eucariotiche.
- Infine, in previsione del futuro sviluppo del panorama brevettuale, sono state analizzate le più recenti domande di brevetto depositate e ovviamente non ancora concesse, che cercano la protezione brevettuale su applicazioni terapeutiche del sistema CRISPR-Cas.

Il sesto capitolo considera le applicazioni in agricoltura delle tecniche di gene editing attraverso il complesso CRISPR-Cas e la regolamentazione cui sono sottoposti i prodotti alimentari

vegetali ottenuti con tali tecniche di editing genomico, confrontando la normativa europea con quella di stati extraeuropei. (USA e Giappone).

#### METODI DI RICERCA E SELEZIONE APPLICATI NELL'ANALISI PRESENTATA

Le conoscenze scientifiche sul sistema CRISPR-Cas sono state acquisite grazie agli articoli di letteratura scientifica inerenti tale tecnologia.

Le banche dati utilizzate per ricercare i testi brevettuali o loro parti sono state Espacenet e Orbit.

Allo scopo di condurre un'accurata ricerca documentale, è stata necessaria la comprensione del sistema di classificazione brevettuale Cooperative Patent Classification (CPC).

La Cooperative Patent Classification segue le linee guida della classificazione brevettuale internazionale IPC (International Patent Classification), ma è molto più dettagliata e a differenza di quest'ultima, che è revisionata annualmente, è oggetto di aggiornamenti mensili da parte dei due organismi che hanno adottato la suddetta classificazione: European Patent Office e United States Patent and Trademark Office.

La classificazione CPC comprende 9 sezioni, ulteriormente suddivise in sottocategorie, che complessivamente includono le possibili tipologie di invenzioni brevettabili.

La ricerca è stata limitata in prima analisi ai brevetti concessi.

La selezione dei brevetti da analizzare è stata eseguita adoperando il portale brevettuale specialistico Orbit, che ha permesso di selezionare due gruppi di brevetti europei concessi.

Il primo gruppo è stato individuato incrociando la classificazione CPC C12N, che raccoglie tutti i brevetti relativi a “microorganismi ed enzimi e loro composizioni, mutazioni o ingegneria genetica” con le parole chiave “CRISPR” oppure “Cas9”.

Il secondo gruppo di brevetti è stato selezionato tra i brevetti europei concessi e collocati nella classificazione CPC “C12N 2310/20”, che raccoglie esclusivamente i brevetti che includono il CRISPR. I risultati dei due criteri di ricerca sono stati poi assommati e le sovrapposizioni eliminate. In questa maniera sono stati selezionati tutti i brevetti compresi o nella classe C12N2310/20 o nella classe generale C12N relativi al CRISPR o Cas9.

Lo studio delle rivendicazioni ha portato a selezionare i brevetti realmente inerenti alla tecnologia di gene editing in questione, che sono poi stati classificati nelle sottocategorie di appartenenza.

In merito alle domande di brevetto depositate in Europa e già pubblicate, concernenti applicazioni terapeutiche del complesso CRISPR-Cas, la selezione è stata operata servendosi di Espacenet, il motore di ricerca di EPO.

Anche in questo caso sono stati selezionati due gruppi di domande di brevetto: il primo gruppo soddisfa il doppio requisito di appartenenza alla classificazione CPC, specifica per il sistema CRISPR C12N2310/20 e al contempo di appartenenza alla classificazione IPC A61K48, in cui sono collocati i medicinali contenenti materiale genetico e per la gene therapy.

Il secondo gruppo di domande di brevetto è stato ricavato ricercando le domande di brevetto collocate nella classificazione IPC A61K48, che include i medicinali contenenti materiale genetico e selezionando, tra questi, quelli riportanti la parola chiave “CRISPR” nel titolo oppure nell’abstract della domanda. In questo modo si sono recuperate tutte le domande di brevetto relative alle applicazioni terapeutiche del CRISPR, per qualche motivo non classificati nella classe CRISPR della CPC.

Grazie alla lettura delle rivendicazioni di tutte le domande, è stato possibile selezionare ed esaminare le domande di brevetto dirette alle specifiche applicazioni terapeutiche del sistema CRISPR-Cas.



## **CAPITOLO 1**

### **PREMESSA**

Con il presente capitolo introduttivo si spiegano i principi base della brevettazione, in particolar modo nel settore biotecnologico, che rappresenta il settore di riferimento della presente tesi.

#### **1.1. L'INVENZIONE**

L'”invenzione” è l'oggetto reale della protezione brevettuale. È fondamentale comprendere questo concetto, ed in particolare è indispensabile cogliere la differenza tra scoperta ed invenzione. Ogni invenzione si basa su una scoperta, e ne rappresenta l'applicazione concreta, nuova ed inventiva, per risolvere un problema tecnico. La ricerca di base spesso porta a scoperte; i suoi risultati non sono brevettabili, perché ancora privi di applicabilità concreta. La ricerca applicata invece, supportata dalle conoscenze fornite dalle scoperte, porta ad invenzioni.

#### **1.2. IL BREVETTO**

Il brevetto è un documento scientifico/legale e può essere interpretato come un contratto tra tre parti:

- L'Inventore/titolare che, grazie al brevetto, per vent'anni a decorrere dal deposito della sua domanda gode di un monopolio sulla propria invenzione, garantendosene l'esclusività di realizzazione e commercializzazione nel territorio dove ha inteso estendere la protezione, per l'intera durata del brevetto.
- L'Autorità territoriale, la quale, dopo aver verificato la brevettabilità dell'invenzione, ha la facoltà di rilasciare all'inventore il monopolio ventennale sull'invenzione, nel territorio di propria competenza. Tale Autorità è rappresentata dalle Istituzioni nazionali deputate alla concessione di brevetti (Uffici Nazionali Brevetti e Marchi) o dall'Ufficio Europeo dei Brevetti.
- Il Pubblico, il quale, una volta scaduto il brevetto, avrà libero accesso all'invenzione che potrà realizzare liberamente. Per questo il brevetto deve rendere l'oggetto di protezione “*available to the public*”.
- Il brevetto conferisce al suo detentore i seguenti diritti esclusivi:
- Se l'oggetto del brevetto è un prodotto, si vieta a terzi, salvo consenso del titolare, di produrre, usare, commerciare, vendere o importare a tali fini il prodotto in questione.
- Se l'oggetto del brevetto è un procedimento, si vieta a terzi, salvo consenso del titolare, di applicare il procedimento, nonché di usare, mettere in commercio, vendere o importare a tali fini il prodotto direttamente ottenuto con il procedimento in questione.

##### **1.2.1. LA CONVENZIONE SUL BREVETTO EUROPEO**

L'autorità europea incaricata di operare l'esame di merito cui il brevetto è assoggettato, di rilasciare il brevetto ed eventualmente revocarlo, è l'EPO, cioè European Patent Office, che

assieme al Consiglio di Amministrazione dello stesso, forma la European Patent Organisation, la quale basa le proprie decisioni sull' EPC, European Patent Convention, nella sua ultima versione (2000), documento redatto a seguito di una conferenza diplomatica che ha definito la regolamentazione europea in materia di brevetti.

Questo regolamento è stato recepito dai vari stati europei.

In Italia, la Convenzione Europea è stata recepita con il Codice della Proprietà Industriale (D. Lgs 30/2005) e successive modifiche.

Ogni brevetto concesso dall'EPO viene successivamente trasformato in un fascio di brevetti nazionali convalidati nei singoli Stati europei.

Il settore delle biotecnologie, inoltre, deve sottostare alla Direttiva Europea 98/44/CE “sulla protezione giuridica delle invenzioni biotecnologiche”. La Direttiva è stata introdotta nei sistemi nazionali attraverso apposite leggi di implementazione.

L'ufficio italiano che si occupa a livello nazionale delle procedure relative ai brevetti, è l'UIBM, Ufficio Italiano Marchi e Brevetti.

#### 1.2.2. DOMANDA DI BREVETTO: STRUTTURA

Il corpo della domanda brevettuale, che viene depositata presso l'ente designato nel territorio dove si intende proteggere la propria invenzione, deve comprendere:

- Il titolo dell'invenzione, che ne specifichi l'oggetto.
- I dati anagrafici del richiedente.
- Il campo di applicazione dell'invenzione.
- Il background dell'invenzione, ovvero i documenti anteriori vicini all'invenzione in oggetto, per contenuto e problematiche tecniche risolte, citandoli. Questa sezione, nella domanda di brevetto redatta dal richiedente non sempre è comprensiva di tutta la *closest prior art*, poiché questa normalmente emerge a seguito della ricerca documentale (*search report*), eseguita da parte dell'ente preposto, che in Europa è l'EPO. Tale ricerca, è necessaria per la valutazione di novità ed attività inventiva.
- L'esposizione del problema tecnico che l'invenzione si prefigge risolvere per giustificare la soluzione tecnica proposta.
- La descrizione dell'invenzione, che nel campo biotecnologico deve contenere il “sequence listing”, ovvero, la forma normalizzata delle sequenze amminoacidiche e nucleotidiche, secondo gli standard WIPO (Organizzazione Mondiale della Proprietà Intellettuale). Inoltre, sono necessari a conferire maggiore chiarezza, esempi dettagliati che

precisino l'oggetto della protezione, indicando almeno un modo di realizzazione dell'invenzione e della sua applicazione industriale.

- Le rivendicazioni, cioè la sezione del brevetto che definisce esattamente in maniera chiara e concisa l'oggetto della protezione. Sono il cuore del brevetto, per cui è necessario porre particolare attenzione alla formulazione di queste, affinché delimitino inequivocabilmente l'ambito della protezione.
- Se necessari, per conferire maggiore chiarezza, si possono utilizzare eventuali disegni, grafici o tabelle, con le relative spiegazioni.

I brevetti europei concessi sono pubblicati sul OJ EPO, bollettino europeo dei brevetti.

### 1.2.3. LE RIVENDICAZIONI (CLAIMS): FORMA E CONTENUTO

I *claims*, ovvero le rivendicazioni, definiscono l'oggetto della protezione, e devono contenere le indicazioni che chiariscano esattamente e dettagliatamente le specifiche di tale oggetto e le sue caratteristiche tecniche.

Le rivendicazioni possono essere di varie categorie: di prodotto, di procedimento o di utilizzo. Ne deriva che l'oggetto della protezione rientra in una di queste categorie.

È possibile proteggere anche differenti usi di un prodotto o di un apparato.

Ogni *claim* che definisce le caratteristiche principali dell'invenzione, è detta "indipendente" e può essere seguito da altri *claim* riferite a caratteristiche o forme di realizzazione secondarie della stessa invenzione, che sono pertanto dipendenti dalla rivendicazione indipendente cui fanno riferimento.

Inoltre il contenuto delle rivendicazioni deve trovare supporto descrittivo nel testo della descrizione dell'invenzione e negli esempi ed eventualmente nei disegni. Diversamente, sarà imposto al richiedente di limitare l'ambito di protezione conferito dalle rivendicazioni, restringendolo esclusivamente a elementi riscontrabili nella descrizione dell'invenzione.

### 1.2.4. DATE RILEVANTI: DI PRIORITA' E DI DOMANDA

Se il richiedente/inventore ha depositato una priorità - ovvero un primo deposito di domanda di brevetto, per una nuova invenzione –il richiedente avrà a disposizione 12 mesi, entro i quali potrà depositare una nuova domanda di brevetto nello stesso paese o in altro paese relativa alla stessa invenzione descritta nel documento precedentemente depositato, mantenendo come data di validità la stessa data del primo deposito.

In presenza di priorità, nella domanda di brevetto se ne indicano:

- il numero,

- lo stato in cui la stessa è stata depositata,
- la data di deposito. Quest'ultima è particolarmente importante, perché rappresenta la prima data rilevante dell'invenzione

Al riguardo, la Convenzione di Parigi per la protezione della proprietà industriale ha stabilito che esiste il “diritto di priorità”; ovvero l'inventore può depositare la sua idea innovativa in un qualsiasi stato dei circa 170 aderenti alla suddetta convenzione e, a partire dalla data di tale deposito, ha a disposizione 12 mesi di tempo per ridepositare una seconda domanda (nazionale o regionale) in un altro paese, per esempio una domanda di brevetto internazionale PCT (*Patent Cooperation Treaty*) o una domanda europea, o una domanda nazionale.

La protezione brevettuale è territoriale, quindi il diritto concesso è limitato allo Stato o al gruppo di Stati nei quali o per i quali si è depositata la domanda. Questi stati o le corrispondenti aree geografiche saranno scelte dal Richiedente sulla base di considerazioni commerciali.

Ad ogni modo, il deposito della priorità non è un passaggio obbligato per ottenere la concessione di un brevetto; l'inventore può scegliere di depositare direttamente la domanda completa; in questo caso, la stessa data di deposito corrisponde alla data rilevante dell'invenzione.

La data rilevante, è il limite temporale determinante tutte le divulgazioni che, per la loro precedenza temporale, si collocano nell'arte anteriore, la quale risulta rilevante ai fini della valutazione della novità e dell'attività inventiva, proprie dell'invenzione oggetto di domanda. Di conseguenza, la data rilevante della domanda in questione determina anche tutto ciò che è posteriore, quindi le divulgazioni il cui contenuto, essendo successivo alla data rilevante, non può intaccare né la novità, né l'attività inventiva, della domanda in oggetto. Si veda l'argomento successivo per comprendere meglio il concetto di *closest prior art*.

#### 1.2.5. BREVETTO E ATTUAZIONE DELL'INVENZIONE

Si noti che, il rilascio del brevetto non autorizza il titolare dell'invenzione ad attuarla, ma si limita a conferirgli il diritto di vietarne a terzi la riproduzione e lo sfruttamento per fini commerciali.

Nel settore farmaceutico è l'ottenimento dell'AIC, Autorizzazione all'Immissione in Commercio, che ne permette la commercializzazione in Europa, se rilasciata dall'EMA (*European Medicines Agency*), o in Italia, se rilasciata dall'AIFA (Agenzia Italiana del Farmaco).

Per l'ottenimento di tale autorizzazione sono necessari molti anni, da un minimo di 5 fino a 12; mentre, la durata del brevetto è di 20 anni a partire dalla prima data rilevante. Quindi, gli anni

di effettiva commercializzazione esclusiva del medicinale spesso si riducono drasticamente, a circa dieci anni.

#### 1.2.6. ESTENSIONE DELLA PROTEZIONE SUI MEDICINALI

Se non ci fosse una legge che permettesse di recuperare gli investimenti spesi nella ricerca, grazie all'estensione del periodo di monopolio commerciale, probabilmente non esisterebbe più alcuna ricerca nel settore farmaceutico.

Fortunatamente, la legge sulla proprietà industriale permette, a chiunque abbia investito in ricerca e innovazione per l'invenzione e la brevettazione di un nuovo medicinale, di prolungare la lunghezza del monopolio che il brevetto conferisce, per consentire, una volta autorizzata la commercializzazione, di recuperare almeno in parte gli investimenti che sono stati destinati alla ricerca finalizzata a conseguire l'invenzione.

Viene così conferito un Certificato di Protezione Complementare, che prevede gli stessi obblighi e diritti esclusivi conferiti dal brevetto.

Lo stesso certificato è indicato come SPC (*Supplementary Protection Certificate*) a livello europeo.

Tale CPC, secondo il Regolamento 1768/92/CEE (ora sostituito dal Regolamento 469/2009/EC) del consiglio della Comunità Europea, non può estendersi oltre i 5 anni.

Il certificato può essere rilasciato solo se l'oggetto è protetto da un brevetto di base valido e solo nel momento in cui l'AIC in vigore sul prodotto sia la prima autorizzazione in commercio ottenuta dal prodotto in quanto medicinale. Inoltre, il titolare di più brevetti riferiti allo stesso prodotto, potrà ottenere su quel prodotto un solo certificato di estensione.

La durata del CCP, in termini di anni aggiuntivi, da sommare alla protezione ventennale, non può essere superiore a 5 anni in maniera tale che, la durata totale del monopolio, comprensivo di CCP, possa essere al massimo di 15 anni dal momento dell'immissione in commercio del prodotto medicinale.

Inoltre, per i richiedenti che dimostrano di aver portato a termine degli studi per la verifica dell'applicabilità pediatrica del medicinale (PIP, Piano di Indagine Pediatrica), anche nel caso in cui questi non diano esito positivo, sono concessi 6 ulteriori mesi di estensione della protezione, in conformità con il Regolamento 469/2009/CE.

### **1.3. REQUISITI DI BREVETTABILITA'**

L'inventore può ottenere il brevetto sulla propria invenzione solo nel caso in cui questa soddisfi i tre requisiti di brevettabilità: novità, attività inventiva e applicabilità industriale.

### 1.3.1. NOVITA'

Un'invenzione è nuova se non è compresa nello stato della tecnica, il quale include tutto ciò che è accessibile al pubblico ("*available to the public*"), incluso il contenuto di altre domande di brevetto depositate anteriormente.

Nel concetto di "*available to the public*" risiede quindi il concetto stesso di novità: è nuovo tutto ciò che, fino alla data di deposito della domanda, non era accessibile al pubblico. Anche in ambito biotecnologico, il concetto di "*available to the public*" è fondamentale, e sarà approfondito nel paragrafo trattante la brevettabilità in tale settore.

L'articolo 54 (4) dell'European Patent Convention dichiara che sono brevettabili anche le sostanze e i composti già presenti nello stato dell'arte, dei quali si scopre un nuovo utilizzo in trattamenti terapeutici. Afferma quindi la brevettabilità della prima applicazione terapeutica di sostanze già note per l'utilizzo a scopi diversi da quello farmaceutico e terapeutico.

Nel punto (5) dello stesso articolo è specificata la possibilità di brevettare, per un nuovo specifico trattamento terapeutico, una sostanza già presente nello stato dell'arte come medicamento. Questa è la base legale per la brevettabilità della seconda applicazione terapeutica.

In campo farmaceutico quindi, anche il concetto della seconda applicazione terapeutica origina dall' "*available*" dell'articolo 54 dell'EPC, perché un principio attivo di cui si scopre una seconda applicazione terapeutica è da considerare disponibile al pubblico, fino a quel momento, solo per la prima applicazione. La seconda applicazione è una novità, in quanto permette la disponibilità al pubblico della sostanza attiva per un diverso trattamento.

Il settore farmaceutico è l'unico settore in cui è possibile proteggere più volte la stessa sostanza con rivendicazioni di prodotto finalizzato ad applicazioni differenti; ovvero, proteggendo sempre la stessa sostanza, ma con differenti usi, per esempio con l'indicazione per un nuovo tipo di malattia, o di paziente, un nuovo regime di dosaggio (diverso dosaggio o diversi tempi di somministrazione) o una nuova via di somministrazione.

#### - 1.3.1.1. PRIOR ART e RICERCA DOCUMENTALE

Un oggetto può essere reso *available to the public*, quindi già noto, tanto attraverso un articolo scritto, quanto una presentazione orale o una pubblicazione sul web: sono tutte fonti di *prior art*.

Lo stato della tecnica, o *closest prior art*, indica l'insieme di fonti che divulgano l'arte anteriore rilevante, ovvero che, rispetto al contenuto della domanda o della priorità in oggetto:

- presentano data rilevante antecedente, e che

- per innovazione del contenuto, precedono il documento considerato.

L'EPO pubblica la domanda di brevetto dopo 18 mesi dal deposito da parte dell'*applicant*, allegandovi la ricerca documentale. Tale ricerca si compone di un elenco comprendente tutte le divulgazioni di *prior art* attinenti al contenuto della domanda stessa. Ogni documento citato è classificando secondo la sua importanza.

La classificazione delle divulgazioni include (tra le altre) due importanti tipologie:

- X: è un documento che, considerato singolarmente, risulta sufficiente ad intaccare la novità della domanda.
- Y: questo tipo di divulgazione, associata sempre ad una seconda, che può essere di categoria Y o di altra categoria, può intaccare l'attività inventiva della domanda.

In entrambi i casi, per superare l'obiezione di mancanza di novità e/o attività inventiva, è necessario (ma non è detto che sia sufficiente) riformulare alcuni passaggi della domanda, tenendo conto del contenuto della *closest prior art*.

Una volta a conoscenza della *closest prior art*, l'invenzione potrebbe anche rivelarsi meno vantaggiosa di quanto il richiedente ritenesse nel momento del deposito della priorità o della domanda e potrebbe addirittura essere ritirata.

### 1.3.2. ATTIVITA' INVENTIVA

La presenza di attività inventiva, implica che l'invenzione non sia considerata ovvia da una "*person skilled in the art*".

Questa è una figura fittizia, rappresentata da una singola persona o da un team di persone. Si considera che la *skilled person* sia un esperto che possiede la conoscenza di tutta la *prior art* in un preciso settore, ma non è un soggetto dotato di forte inventività ed intraprendenza. L'attività inventiva si valuta sulla base del "modello problema soluzione".

### 1.3.3. APPLICABILITA' INDUSTRIALE

L'invenzione è suscettibile di applicabilità industriale se può essere prodotta o utilizzata in un qualsiasi settore dell'industria, compresi l'agricoltura e l'allevamento.

## 1.4. CHIAREZZA E SUFFICIENZA DI DESCRIZIONE

Particolarmente rilevante è la necessità di chiarezza nel contenuto del brevetto e/o della domanda e soprattutto delle rivendicazioni.

In particolare, la descrizione dell'invenzione necessita di essere chiara e completa, affinché l'esperto (*person skilled in the art*) possa realizzarla. Questo perché, una volta esaurito il brevetto, il pubblico dovrà essere in grado di riprodurla e utilizzarla.

Inoltre, la chiarezza delle rivendicazioni è fondamentale anche al fine di proteggere l'invenzione dalla contraffazione. Non solo per individuare potenziali contraffattori, ma anche per permettere, a coloro che non vogliono ricadere nella contraffazione, di poter operare al di fuori dell'ambito di protezione conferita dal brevetto.

Anche le rivendicazioni devono essere "chiare e concise, ma anche supportate dalla descrizione dell'invenzione".

### **1.5. DECADENZA DEL BREVETTO**

La validità di un brevetto concesso, si estingue in tre casi

- Dopo vent'anni dal deposito della domanda, per naturale scadenza.
- Nel caso in cui vi sia opposizione, da parte di terzi, alla validità del brevetto e, sulla base di tale opposizione, il brevetto sia revocato dall'autorità.
- Mancato pagamento dei diritti brevettuali da parte del titolare.

### **1.6. DEFINIZIONE DELL'AMBITO DI PROTEZIONE**

Nella Convenzione sul Brevetto Europeo, l'articolo 69 definisce l'ambito di protezione, affermando che la protezione conferita è determinata dalle rivendicazioni. Lo stesso articolo indica gli strumenti di interpretazione della protezione, cui i tribunali nazionali sono tenuti ad attenersi: descrizione e disegni. È l'unico passaggio della convenzione in cui l'EPO si interseca con i tribunali nazionali:

*Article 69 EPC - Extent of protection*

(1)

*"The extent of the protection conferred by a European patent or a European patent application shall be determined by the claims. Nevertheless, the description and drawings shall be used to interpret the claims.*

(2)

*For the period up to grant of the European patent, the extent of the protection conferred by the European patent application shall be determined by the claims contained in the application as published. However, the European patent as granted or as amended in opposition, limitation or revocation proceedings shall determine retroactively the protection conferred by the application, in so far as such protection is not thereby extended."*

Il secondo punto, precisa che, fino al rilascio del brevetto, il campo della protezione è definito dalle rivendicazioni presenti nel testo della domanda pubblicata.



Tuttavia, nel caso in cui tali rivendicazioni subissero delle limitazioni dopo il rilascio del brevetto, come spesso accade, oppure siano oggetto di revoche in corso di opposizione, la sfera di protezione risulta dunque ristretta.

Questa riduzione del campo di protezione, si applica retroattivamente.

L'EPO fornisce questi strumenti al fine d'armonizzare la valutazione del brevetto da parte dei Tribunali nazionali. Infatti, una volta che il brevetto europeo concesso sia convalidato a livello nazionale, rientra nelle competenze nazionali e dipende dal tribunale interno allo stato.

### **1.7. ESCLUSIONI DALLA BREVETTABILITÀ**

Non sono considerati invenzioni: le scoperte, le teorie scientifiche e i metodi matematici, nonché le creazioni estetiche, gli schemi, le regole e i metodi per le performance mentali, i programmi per computer e le presentazioni di informazioni.

Inoltre non sono rilasciati brevetti per invenzioni il cui sfruttamento commerciale sia in contrasto con l'ordine pubblico, quindi sono escluse per motivi etici.

Rappresentano esclusioni alla brevettabilità anche i metodi per il trattamento umano o dell'animale con chirurgia e terapia, oppure i metodi diagnostici praticati sul corpo umano o animale.

Ovvero, non è ritenuta brevettabile, la visita medica sul corpo umano o animale. Si ricorda però che sono brevettabili i metodi diagnostici tecnici quali radiografia, ecografia NMR etc. e analisi su tessuti prelevati dal paziente (analisi sangue), tranne nel caso in cui implicino un intervento invasivo sul paziente che richieda un'esperienza professionale da parte del medico, e/o che implicino un rischio per il paziente.

Infine sono escluse dalla brevettabilità le razze animali e le varietà vegetali, oppure i processi essenzialmente biologici per la produzione di piante o animali.

Prima di proseguire, risulta necessario comprendere le definizioni di razze animali e varietà vegetali.

#### **1.7.1. VARIETA' VEGETALI E RAZZE ANIMALI**

Tali diciture, intendono riferirsi a una specifica identità vegetale o animale, concretamente individuabile, con un proprio assetto genomico completo e definito. Questo tipo di oggetto non è suscettibile di brevettabilità.

Se però, l'applicazione dell'invenzione può essere estesa ad un livello tassonomico superiore rispetto alla varietà o razza, con applicabilità più ampia, estendibile ad un insieme astratto di animali o vegetali, in tal caso l'invenzione è brevettabile.

L'EPO ha optato per questa formulazione, per evitare un'interferenza con la normativa UPOV sulla protezione delle nuove varietà vegetali, ed ha quindi previsto che il brevetto, per essere concesso, deve necessariamente trovar sua realizzazione su gruppi di piante o animali più ampi della semplice varietà o razza.

#### 1.7.2. RAPPORTO TRA PROCESSI ESSENZIALMENTE BIOLOGICI E LORO PRODOTTI

Nell'articolo 53 (2) è sancita l'esclusione di metodi "essenzialmente biologici" per la produzione di piante e animali, per evitare ogni interferenza tra i diritti brevettuali ed i metodi classicamente propri dell'agricoltura e dell'allevamento. La funzione dell'avverbio essenzialmente davanti a "biologici" è quella di non limitare eccessivamente il campo di applicazione di questa esclusione, confinandola ai metodi puramente biologici, ovvero incrocio e selezione.

L'intenzione era infatti quella di escludere tutti quei metodi che, seppur non puramente biologici, in quanto includono dei semplici passaggi tecnici a supporto delle operazioni di incrocio e selezione (e.g. utilizzo di serre o di fertilizzanti o di innesti etc.), sono in ogni modo propri dei settori classici di agricoltura e allevamento.

Tuttavia, la disposizione sull'esclusione dei processi essenzialmente biologici non si applica ai processi microbiologici e ai loro prodotti.

In riferimento all'articolo 53 (b) dell'EPC, sono state prese recentemente quattro importanti decisioni dall'*Enlarged Board of Appeal* Dell'EPO.

Le prime decisioni, G2/07 e G1/08, hanno chiarito il significato di processo essenzialmente biologico per la preparazione di piante, stabilendo che non sia sufficiente assistere i passaggi classici di incrocio e/o selezione di piante o animali (quindi puramente biologici), con un passaggio, di natura tecnica, meramente necessario per l'attuazione degli stessi processi, per evadere l'esclusione alla brevettabilità attribuita ai processi essenzialmente biologici.

Le altre due decisioni, G02/12 e G02/13, hanno stabilito che è brevettabile un prodotto vegetale, purché non una varietà, ottenuto attraverso un procedimento essenzialmente biologico, solo nel caso cui l'oggetto su cui si estende la protezione sia protetto tramite rivendicazioni di prodotto (*product by process*).

*“Subject-matter claimed as a product or a product-by-process is not the same as one claimed for a process, which, in the case of essentially biological processes for the production of plants, is excluded from patentability, regardless of the methods by which the claimed product is generated or – as in the case of a product-by-process claim – defined.*

*Even if the product, i.e. the plant or plant material such as a fruit or plant parts, can only be obtained by essentially biological processes with no other methods either disclosed in the patent application or otherwise known, the process exclusion in Article 53(b) EPC does not extend to product claims and product-by-process claims.”*

[“L’oggetto rivendicato come un prodotto o un *product-by-process* non è uguale ad un oggetto rivendicato per un processo, il quale, in caso di processi essenzialmente biologici per la produzione di piante, è escluso dalla brevettabilità, indipendentemente dal metodo con il quale il prodotto rivendicato è generato o – come nel caso di una rivendicazione di un *product-by-process* – definito.

Anche se il prodotto, cioè la pianta o il materiale vegetale come un frutto o parti della pianta, può essere ottenuto solo per mezzo di un processo essenzialmente biologico senza altri metodi, né divulgati nella domanda di brevetto né differentemente noti, l’esclusione di processo nell’ Articolo 53(b) EPC non si estende alle rivendicazioni di prodotto e alle rivendicazioni di *product-by-process*.”]

Vale la pena ricordare che, a seguito di queste due decisioni la Commissione Europea emetteva una Nota con la quale censurava la decisione del Board of Appeal di ammettere la brevettabilità di piante ottenute attraverso procedimenti essenzialmente biologici. A seguito di detta Nota, il Consiglio di Amministrazione dell’EPO ha emendato la Regola 28 EPC, regola di implementazione dell’Art. 53(b), integrandola con il divieto di protezione brevettuale di piante ottenute attraverso procedimenti essenzialmente biologici. Nella sostanza, questo emendamento di una Regola equivaleva all’emendamento dell’Art. 53(b) EPC. Ma una simile modifica, sulla base di quanto stabilito dalla Convenzione, esula dalle competenze del Consiglio di amministrazione dell’EPO, che non ha la facoltà per emendare un articolo relativo alla brevettabilità della Convenzione. Infatti, apportare una tale modifica, richiederebbe una Conferenza Diplomatica.

La modifica introdotta alla Regola 28 risultava in evidente contraddizione con l’articolo 53 (b) dell’EPC, che non esclude i prodotti derivanti da processi essenzialmente biologici, bensì delimita l’esclusione solo a tali processi.

Una decisione del Board of Appeal (a 5 membri), posteriore alla modifica della Rule 28, cioè la decisione T 1063/18, ha recentemente confermato che un articolo della Convenzione è predominante rispetto ad una Regola e pertanto, in caso di contraddizione tra articolo e regola, è la regola che dovrà essere considerata priva di effetto legale. In questo caso quindi

l'integrazione della Regola 28 è stata considerata vuota di ogni significato, e la brevettabilità di piante (non varietà) ottenute anche attraverso procedimento essenzialmente biologico confermata.

Dunque, allo stato attuale, in Europa i procedimenti essenzialmente biologici restano esclusi dalla protezione brevettuale, ma i prodotti vegetali ottenuti da tali procedimenti e caratterizzati come "*product by process*", ovvero attraverso il loro procedimento di produzione, seppur essenzialmente biologico, restano suscettibili di protezione brevettuale. Quindi, una pianta (a esclusione delle varietà vegetali) è brevettabile, a prescindere dal processo usato per produrla. Ovviamente dovrà poi soddisfare tutti gli altri requisiti di brevettabilità.

## **1.8. BREVETTABILITA' NEL SETTORE BIOTECNOLOGICO**

### **1.8.1. GENERALITA' E DEFINIZIONI**

Nella "Parte II" dell'EPC, il Capitolo V è dedicato alla brevettabilità delle invenzioni nel settore biotecnologico. Le regole riportate nel suddetto capitolo (vedi Regole dalla 26 alla 34 di EPC), sono state integrate nell'EPC 2000, in ottemperanza alla Direttiva Europea 98/44/CE.

L'invenzione biotecnologica comprende ogni prodotto consistente o contenente del materiale biologico, oppure un processo per mezzo del quale del materiale biologico è prodotto, processato o utilizzato. Per materiale biologico si intende qualsiasi materiale contenente un'informazione genetica e in grado di riprodursi autonomamente o di essere riprodotto in un adatto sistema biologico.

L'espressione varietà vegetale è definita come una sola unità o al più alcuni vegetali di un solo tasso botanico del più basso ramo noto, caratterizzata da una propria identità genetica.

Per processo microbiologico si intende ogni processo che include, si esegue su o produce del materiale biologico".

### **1.8.2. INVENZIONI BIOTECNOLOGICHE BREVETTABILI**

Le invenzioni brevettabili nel settore biotecnologico sono: il materiale biologico se isolato o prodotto con un processo tecnico, anche se preesisteva in natura.

Il fatto che il materiale biologico fosse "preesistente in natura" non rappresenta impedimento alla brevettabilità, né tantomeno al riconoscimento della Novità di detto materiale. Infatti, ricordiamo che l'articolo 54 (2) dell'European Patent Convention, di cui si è già discusso, definisce il concetto di stato dell'arte (o stato della tecnica anteriore) come tutto ciò che è "*available to the public*", nel territorio dello stato quanto in quello estero, in qualsiasi forma di divulgazione. Questa definizione è fondamentale per la protezione del materiale

biotecnologico, che seppur già presente in natura, non è disponibile al pubblico, e diventa tale solo nel momento in cui è scoperto, è isolato dal suo ambiente naturale e messo a disposizione, assolvendo quindi ai requisiti di brevettabilità.

È ugualmente brevettabile, ogni elemento del corpo umano isolato, anche se la sua struttura è uguale all'elemento naturale; per esempio un gene isolato, di cui si sia delucidata la sequenza parziale o totale, e che dopo sua riproduzione attraverso un processo tecnico, possa essere utilizzato allo scopo di risolvere un problema tecnico. È necessario tuttavia divulgare esattamente la sua applicabilità industriale. Infatti un criterio fondamentale della brevettazione è che si conferiscono brevetti solo alle invenzioni, cioè a soluzioni tecniche che abbiano una concreta applicazione per risolvere ad un problema tecnico. I risultati della ricerca di base che non abbiano ancora un'applicazione concreta non sono considerati invenzioni. Pertanto una sequenza di materiale genetico (DNA o RNA) della quale non si conosca alcuna funzione non è considerata un'invenzione, pertanto non è brevettabile.

Una particolarità della legge Italiana (e di altri Stati Europei quali Germania, Francia e Lussemburgo), è che l'applicazione industriale della sequenza o sequenza parziale di un gene, oltre ad essere descritta nel testo brevettuale, dovrà essere indicata nelle rivendicazioni.

Si possono inoltre brevettare cellule animali, vegetali o umane e piante e animali superiori, se la realizzazione dell'invenzione non è limitata ad una singola varietà vegetale o razza animale, ma abbraccia livelli di classificazione più elevati (specie, genere, regno etc.). È inoltre possibile proteggere un processo tecnico o un procedimento microbiologico così come un prodotto ottenuto tramite tali processi, a condizione che non sia una razza animale o una varietà vegetale. Il CPI, inoltre, prevede un articolo assente nella legge europea, disponendo che:

“La domanda di brevetto relativa ad una invenzione che ha per oggetto o utilizza materiale biologico di origine umana deve essere corredata dell'espresso consenso, libero e informato, a tale prelievo e utilizzazione, della persona da cui è stato prelevato tale materiale, in base alla normativa vigente.”

### 1.8.3. ECCEZIONI ALLA BREVETTABILITA' NEL SETTORE BIOTECNOLOGICO

Rappresentano eccezioni alla brevettabilità nel settore biotecnologico:

- Processi per clonare esseri umani
- Processi per modificare l'identità genetica germinale di esseri umani
- Usi degli embrioni umani per fini industriali e commerciali

- Processi per modificare l'identità genetica di un animale, causandogli sofferenza senza un ragionevole beneficio medico all'uomo o all'animale, e anche gli animali risultanti da tali processi.
- Come anticipato, non è brevettabile un processo essenzialmente biologico, neanche se il processo è effettuato con l'ausilio di un passaggio tecnico, nel caso in cui tale passaggio tecnico non implichi l'introduzione di un nuovo tratto genetico, ma sia semplicemente di supporto alla realizzazione dello stesso processo essenzialmente biologico
- Inoltre sono esclusi dalla brevettabilità il corpo umano nei vari stadi della sua formazione e sviluppo, così come la mera scoperta di uno dei suoi elementi. Se i risultati della ricerca sono limitati alla mera scoperta di un elemento del corpo umano, per esempio un frammento di DNA o addirittura il sequenziamento totale del genoma, però senza che se ne conosca ancora un'applicazione industriale, tale risultato non è considerato un'invenzione né implica attività inventiva. Per questo, non risulta suscettibile di protezione brevettuale.

#### 1.8.4. SEQUENZE NUCLEOTIDICHE E AMMINOACIDICHE

Possono essere brevettati polinucleotidi e polipeptidi nel caso in cui siano dotati di attività e abbiano applicabilità industriale.

La Convenzione sancisce i requisiti necessari al deposito della domanda di brevetto europeo, relativa a sequenze nucleotidiche e amminoacidiche.

La descrizione nella domanda deve infatti contenere il sequence listing, in conformità con le regole depositate dall'EPO per la standardizzazione delle sequenze secondo le linee guida WIPO.

La finalità del sequence listing standardizzato è quella di permetterne la ricerca.

PCT, EPO, USTPO e Japan Patent Office, hanno sottoscritto un accordo, definendo degli standard comuni secondo i quali, qualsiasi sequenza divulgata o inserita in un brevetto, è inserita in una banca dati consultabile e reperibile da ogni ricercatore, che può anche confrontare la percentuale di omologia con altre sequenze in suo possesso.

#### 1.8.5. DEPOSITO DI MATERIALE BIOLOGICO

Se l'invenzione necessita l'utilizzo o implica la realizzazione di materiale biologico che non sia accessibile al pubblico o che non si riesca a descrivere nella domanda in modo sufficiente affinché la *skilled person* possa attuarla, l'invenzione è comunque considerata ripetibile e quindi conforme all'articolo 83 (sulla sufficienza e chiarezza di descrizione), se un campione del materiale biologico è depositato presso un'Istituzione di Deposito riconosciuta dall'EPO,

entro i termini stipulati dal Trattato di Budapest (1977), cioè entro la data di deposito della domanda, nella quale il richiedente è tenuto a indicare tutte le informazioni in suo possesso riguardanti il materiale biologico oggetto del deposito e quindi del brevetto. Nella domanda (e nel successivo brevetto rilasciato) sono riportate inoltre il nome dell'Istituzione di deposito e il numero di deposito, *accession number*, fondamentale ogni qualvolta sia richiesto un campione di tale materiale allo scopo di ricerca.

#### 1.8.6. DISPONIBILITA' DEL MATERIALE BIOLOGICO

A partire dalla data di pubblicazione della domanda, chiunque può richiedere un campione del materiale biologico per ispezionarlo, in conformità con l'Art.128 EPC. Questo articolo dispone il diritto per chiunque di ispezionare il file, ovvero il documento depositato e tutti i documenti e allegati depositati durante la procedura d'esame del brevetto, e nel caso in cui il deposito faccia riferimento a materiale biologico, la possibilità di ispezionare detto materiale, essendo parte della domanda di brevetto, stando ovviamente alle disposizioni della Rule 32, EPC.

Il rilascio del campione avviene previa dichiarazione del richiedente di farne uso esclusivamente per scopi sperimentali, dichiarando di non disporre a terzi la materia biologica o qualunque materiale da essa derivato, nel caso in cui il brevetto non sia stato ancora rilasciato e finché non sia scaduto negli stati designati, salvo che il richiedente o titolare del brevetto non lo permetta espressamente.

## CAPITOLO 2

### 2.1. CRISPR: COS'È?

Il CRISPR è un *locus* genomico identificato nel genoma di alcune specie di archei e batteri, tra cui *Streptococcus thermophilus* ed *E. coli*.

Questo *locus* determina l'immunità adattiva acquisita dal batterio contro i virus batterici (o fagi). Il batterio compone all'interno del suo genoma una sorta di database genetico dei virus ai quali è stato esposto, e può trasmetterlo alla progenie, conferendole la resistenza acquisita.

I *loci* CRISPR sono distinti tra le diverse specie batteriche, ma in tutte le specie sono caratterizzati da corte sequenze simili ripetute dette *repeats*.

Il *locus* CRISPR corrisponde a un filamento di DNA costituito da una serie di *repeats*, di origine batterica, alternate a frammenti spaziatori distinti tra loro, denominati *spacers*, di origine virale o plasmidica.

Gli *spacers* identificano frammenti di sequenze di acido nucleico appartenenti al genoma di un virus (batteriofago) che ha tentato di infettare il batterio o un suo progenitore o un altro batterio che per trasmissione orizzontale gli ha trasferito tale informazione genetica.

### 2.2. Come funziona CRISPR?

Nel corso del primo attacco da parte di un virus, alcuni batteri sono in grado di incorporare nel proprio *locus* CRISPR un frammento di acido nucleico fagico adiacente ad una corta sequenza marker detta PAM (*protospacer adjacent motif*), collocandolo come spaziatore tra le sequenze ripetute batteriche. Se il batterio sopravvive al primo attacco da parte di tale ceppo fagico, acquisisce resistenza alle successive esposizioni a virus caratterizzati dalla sequenza di DNA internalizzata nel proprio genoma nel corso della prima infezione.

Durante le successive invasioni del virus, il frammento *spacer* di DNA virale integrato dal batterio è trascritto in un filamento di RNA, il quale si ibrida solo con i frammenti di acido nucleico ad esso complementari appartenenti ad un filamento del DNA dello stesso virus invasore.

Il legame tra i due acidi nucleici, permette il preciso posizionamento sul frammento di DNA fagico (*target*) di proteine batteriche con attività enzimatica nucleasica.



Queste proteine, denominate Cas, sono in grado di operare il taglio<sup>1</sup> e la digestione del DNA virale legato, causando la morte del fago.

Il batterio, in questo modo, riesce ad evadere l'attacco fagico.

### 2.3. Cosa significa CRISPR?

L'acronimo CRISPR significa *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*.

È una struttura formata da brevi sequenze ripetitive e palindromiche,<sup>2</sup> raggruppate e separate a intervalli regolari.

Quando il sistema fu scoperto, ci si soffermò sull'osservazione di queste originali sequenze di *repeats*.

Non fu subito evidente che il vero elemento funzionale di questo *locus* fossero gli *spacers*.

Inoltre, il *locus* CRISPR comprende, posizionata ad una delle sue estremità, una regione non codificante, chiamata sequenza *leader*, lunga alcune centinaia di basi.

Sono poi localizzati, a monte delle sequenze CRISPR, i geni codificanti per le proteine Cas; queste, una volta avvenuto il riconoscimento del DNA target complementare alla sequenza di RNA trascritta dal DNA *spacer*, operano il *cleavage* della sequenza *target*.

### 2.4. Un po' di storia: COME È STATO SCOPERTO?

- Nel 1993, in Spagna, F. Mojica identificò per la prima volta la presenza di raggruppamenti di DNA ripetuto in alcune specie di archei. Ipotizzò che i frammenti del CRISPR, acronimo da egli stesso proposto, permettessero una corretta segregazione del materiale genetico alle cellule figlie. Questa ipotesi si rivelò inesatta.
- Successivamente, i ricercatori dell'Università di Utrecht, in Olanda, rilevarono come le strutture CRISPR, fossero sempre affiancate da un insieme di geni omologhi, che furono denominati *Cas*, *CRISPR associated system*. Si evidenziò che i trascritti di questi geni, fossero delle proteine con attività nucleasica, quindi in grado di scindere i legami fosfodiesterici tra nucleotidi, ed elicasica, ovvero responsabile della rottura di legami idrogeno. Ancora però non era stata fatta luce sulla funzione del CRISPR.

---

<sup>1</sup> Denominato *cleavage* nella letteratura scientifica. Questa sarà una definizione ricorrente nel presente capitolo. Il termine indica l'azione di taglio, in un preciso punto del genoma del virus, operata dalle proteine ad attività nucleasica, per esempio Cas, su uno o entrambi i filamenti del DNA target.

<sup>2</sup> Le sequenze palindromiche, ovvero che si ibridizzano su sé stesse tramite degli appaiamenti intracatena, sono in grado di dare una struttura a forcina.

- Nel 2005, da ricerche condotte in diversi laboratori, emerse che gli spaziatori interposti tra le sequenze ripetute, corrispondevano a sequenze di DNA batteriofago o plasmidico, acquisiti nel corso di attacchi virali a cui il batterio era sopravvissuto, ed integrati nel genoma batterico.
- Fu Mojica successivamente a formulare l'esatta ipotesi di come il locus CRISPR fosse deputato al riconoscimento degli attacchi virali e al conferimento di una immunità acquisita attraverso i seguenti passaggi: la sequenza spaziatrice, *spacer*, era acquisita in una precedente invasione del virus. Il batterio è in grado di internalizzare tale *spacer* nel proprio genoma, per l'esattezza nel locus CRISPR, dove appunto sono presenti una serie di sequenze ripetutamente intervallate da *spacers* differenti. Il DNA *spacer* è trascritto in RNA. L'RNA derivante dallo *spacer* è utilizzato per riconoscere una nuova invasione da parte dello stesso virus e per veicolare i Cas sul DNA target virale.
- Successivamente vi fu la conferma, grazie a numerose ricerche, dell'esattezza dell'ipotesi di Mojica.
- In particolare, nel 2007, Charpentier pubblicò una ricerca in cui confermava, grazie ad esperimenti condotti su *Streptococcus thermophilus*, che CRISPR rappresentava l'immunità adattativa del batterio. La scienziata, dimostrò che, inserendo nel locus CRISPR batterico alcuni *spacer* simili al DNA del batteriofago, *S. thermophilus* acquisiva resistenza nei confronti del virus.
- Nel 2008, furono identificate in *E.Coli*, le componenti del complesso Cas, nonché delle proteine in grado di tagliare il trascritto di RNA proveniente dal locus CRISPR, ottenendo alcuni frammenti di RNA contenenti soltanto le sequenze ripetute, ed altri frammenti contenenti le sequenze *spacer*; a questi ultimi, il Cas restava saldamente ancorato.
- Ancora nel 2008, Maraffini e un suo collega provarono come *S. epidermidis*, attaccato da un batteriofago, ne contrastava il DNA.
- Nel 2010, è stato dimostrato che *Streptococcus thermophilus*, per mezzo del suo sistema CRISPR e del sistema ad esso associato, Cas, proteina con attività endonucleasica, era in grado di tagliare entrambi i filamenti del DNA fagico o di un plasmide.

## **2.5. IN CHE MODO LE REGIONI CRISPR ACQUISISCONO L'IMMUNITA' ADATTIVA?**

Il fago, ogni qualvolta attacca un batterio, commissiona a quest'ultimo la replicazione di copie del proprio materiale genetico, non essendo i virus autonomamente in grado di replicarsi.

Nel batterio quindi, sono prodotti nuovi fagi. Il ciclo di riproduzione del fago normalmente si conclude con la morte del batterio, ultima tappa del ciclo della replicazione fagica.

Un numero limitato di batteri, durante la replicazione del genoma fagico, riesce invece a svolgere le 3 fasi descritte di seguito.

(i) ADATTAMENTO

La prima fase è denominata fase di adattamento: il batterio acquisisce gli *spacers*, cioè dei frammenti del genoma eterologo che sta replicando, incorporandoli nel locus CRISPR.

Nel sistema CRISPR di tipo II, questo meccanismo di acquisizione è condotto da Cas1, Cas2 e Csn2, enzimi ad attività nucleasica appartenenti all'operone Cas, il quale comprende anche Cas9.

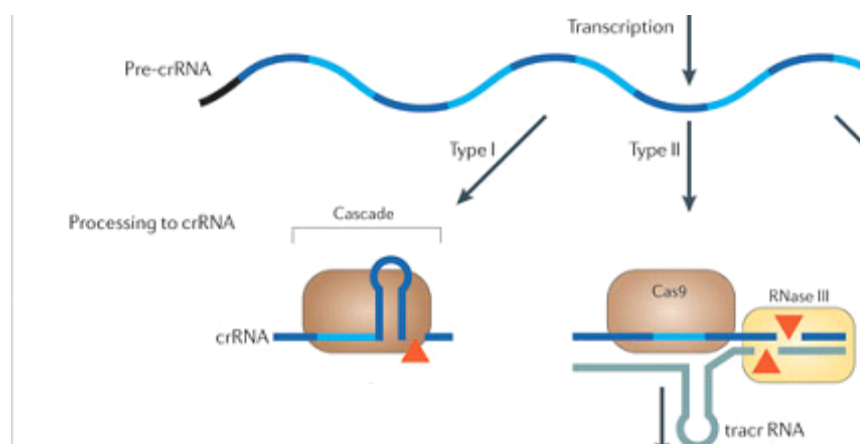
In questa fase, è acquisito in tale *locus*, in posizione adiacente alla sequenza *leader*, un ulteriore piccolo frammento di DNA eterologo virale definito *protospacer adjacent motif* (PAM), che il batterio riconosce, taglia e inserisce nel proprio *locus* CRISPR. La sequenza PAM svolgerà un ruolo importante nell'appaiamento dell'RNA derivato dallo *spacer* con il DNA *target*.

(ii) ESPRESSIONE: COME SI MANIFESTA L'IMMUNITA' ACQUISITA?

In seguito all'adattamento, si ha la fase di espressione, in cui un *locus* contenente uno *spacer* è trascritto nel filamento unico detto pre-crRNA, poi processato nei singoli frammenti di crRNA (crisprRNA), ognuno dei quali è in grado di riconoscere una specifica sequenza dell'invasore e funge da guida per la proteina Cas.

Vedi figura 1.

Figura 1 Fase di espressione; nel CRISPR di tipo I e di tipo II.



K. S. Makarova, D. H. Haft, R. Barrangou, S. J. Brouns, E. Charpentier, P. Horvath, S. Moineau, Mojica, Y. Wolf, A. Yakunin, J. Van der Oost and E. Koonin, Evolution and classification of the CRISPR–Cas systems, Nature

- Nei CRISPR di tipo I, un complesso di proteine associate (definito *Cascade*) si lega a questo trascritto primario di *pre-crRNA*, il quale è tagliato da alcune subunità della proteina Cas, originando un crRNA con una sequenza caratterizzante lunga 8 nt all'estremità 5', e una struttura palindromica al 3'.
- Nel CRISPR di tipo II, invece, è sempre presente, come nel tipo I, la sequenza *repeat* (blu) adiacente al *pre-crRNA*; in questo caso la struttura del *pre-crRNA* è lineare, ed interviene un *tracrRNA* (*trans activating RNA*), ad esso complementare e comprendente una struttura a forcilla. Si forma un *duplex*. Questo legame tra 2 RNA è riconosciuto e tagliato dall'enzima RNAsi III in associazione a Cas9.

La struttura finale, in entrambi i casi, presenta una sequenza di 20 nucleotidi caratterizzante il *crRNA* e complementare alla sequenza target. Questa sequenza conferisce specificità nei confronti del target.

### (iii) SILENZIAMENTO

Nel secondo tentativo virale di infettare il batterio, il locus CRISPR attiva la fase di interferenza o silenziamento. Il crRNA guida la proteina Cas associata e, appaiandosi con la sequenza virale target, permette il *cleavage* e conseguente silenziamento del DNA complementare da parte dell'enzima Cas.

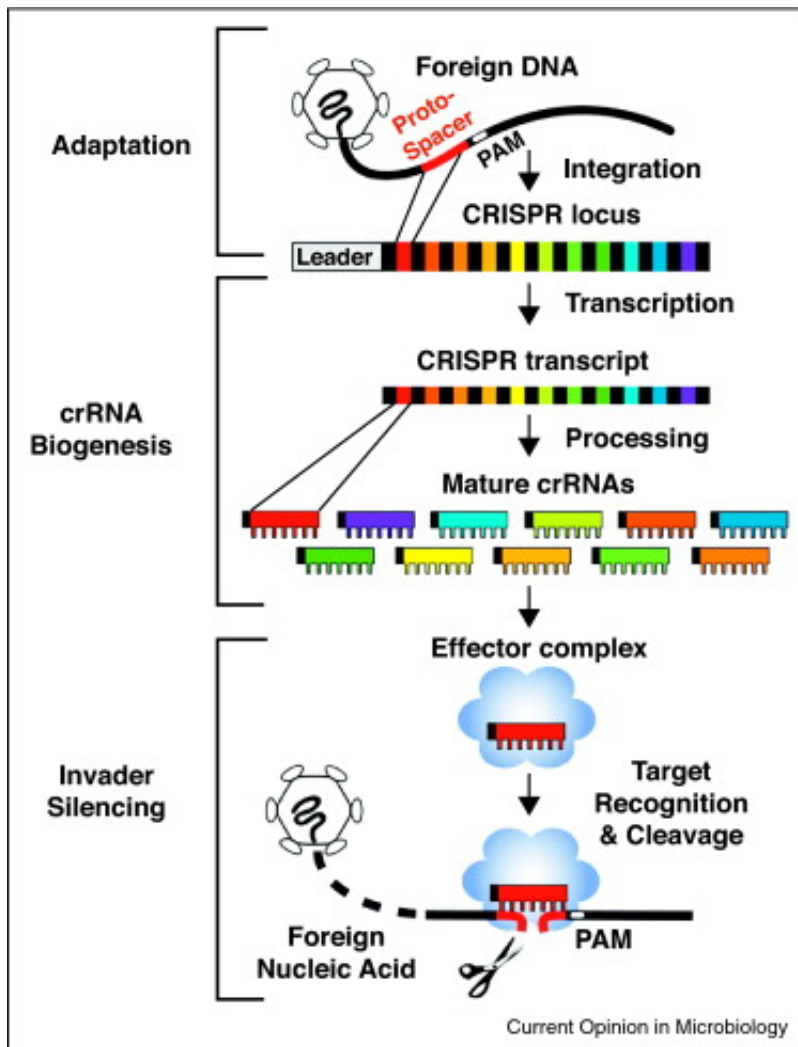


Figura 2 Le fasi dell'immunità CRISPR- mediata.

Adattamento: inserzione dei frammenti di DNA dell'invasore nel locus CRISPR, il quale è composto da una serie di sequenze ripetute, intervallate da spacer diversi e provenienti in parte da virus che hanno tentato di invadere la cellula batterica, in parte da spacers acquisiti per trasmissione diretta dal genoma parentale, ed altri ancora acquisiti da altri batteri per trasmissione orizzontale, quindi per mezzo di plasmidi.

Genesi del crRNA, derivato dalla trascrizione del DNA degli spacer nel locus CRISPR.

Silenziamento dell'invasore: il crRNA riconosce il DNA target complementare e appartenente al genoma del virus. In questo modo, guida la proteina Cas, con attività endonucleasica, ad operare il cleavage in un preciso punto. \*

\*[https://elearning2.uniroma1.it/pluginfile.php/566428/mod\\_folder/content/0/10.%20CRISPR%2017-18%202-11.ppt?forcedownload=1](https://elearning2.uniroma1.it/pluginfile.php/566428/mod_folder/content/0/10.%20CRISPR%2017-18%202-11.ppt?forcedownload=1)

## 2.6. TIPI DI CRISPR

Vari sistemi di CRISPR esistenti, differiscono tra loro per alcune caratteristiche, e sono distinti in due classi

- I sistemi di tipo I e III, appartenenti alla classe I. In questi sistemi, sia la fase di espressione che l'interferenza, sono eseguiti da un complesso multiproteico, Cascade (*CRISPR-Associated Complex for Antiviral Defence*).
- Mentre, nei sistemi appartenenti alla seconda classe, nonché il tipo II, V, VI, i suddetti processi sono guidati da un polipeptide (enzima endonucleasi); nel caso del *type II* si tratta del polipeptide Cas9, nel *type*

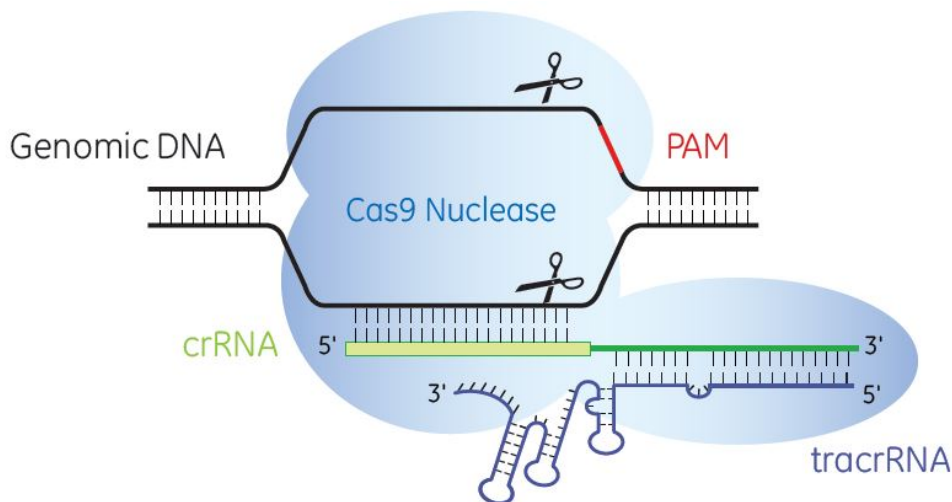
Figura 3 Le fasi dell'immunità CRISPR- mediata.

V il taglio è operato da Cpf1.

Il polipeptide Cas, per espletare la propria funzione, richiede l'associazione con un frammento di RNA non codificante, conosciuto come *transactivating CRISPR RNA*, indicato come *tracrRNA*.

## 2.7. SISTEMA CRISPR/Cas9

Figura 5 - CRISPR/Cas9 System. Si notino il crRNA complementare alla sequenza di DNA target, la sequenza PAM sul filamento di DNA nontarget ed i loop formati dal tracrRNA. Al double strand di RNA è strettamente associata la proteina Cas che, dopo il legame del crRNA con la sequenza target, opera il clivaggio enzimatico.



<https://dharmacon.horizondiscovery.com/a 1>

Il primo sistema su cui sono stati condotti gli studi *in vitro*, appartenente alla categoria dei sistemi CRISPR, inclusa la proteina Cas ad esso associata, è stato quello di *Streptococcus pyogenes*: il *Type II CRISPR/Cas9 system*.

In tale sistema, Cas9 è l'enzima ad attività endonucleasica responsabile del *cleavage* del DNA virale. La proteina Cas, forma un complesso con due frammenti di RNA:

- Il crRNA: l'RNA trascritto a partire dallo *spacer* localizzato nel *locus* CRISPR. Il crRNA è complementare al DNA target, con il quale si ibrida, permettendo il posizionamento della proteina Cas, strettamente associata allo stesso crRNA.
- Il tracrRNA: *trans-activating* CRISPR RNA; è un frammento di RNA non codificante, complementare al crRNA, con il quale si appaia, formando una struttura a doppio filamento (dsRNA, *double stranded RNA*). Ha la funzione fondamentale di

reclutamento del Cas9. Il tracrRNA, che è un palindromo, si ibridizza su sé stesso, formando delle forcelle.

Questa struttura a doppio filamento crRNA/tracrRNA, guida<sup>3</sup> il polipeptide Cas9 a tagliare qualsiasi sequenza target di DNA contenente una sequenza di 20 nucleotidi complementari al crRNA, e contemporaneamente, adiacente a una sequenza PAM.

PAM indica un *Protospacer Adjacent Motif*, ovvero una sequenza trinucleotidica adiacente alla sequenza *protospacer*<sup>4</sup>.

### 2.7.1. L'ENZIMA CAS9

La proteina enzimatica del sistema CRISPR opera un taglio del doppio filamento di DNA esattamente 3 coppie di basi a monte della sequenza PAM, grazie ai 2 domini nucleasici distinti che la caratterizzano:

- HNH, taglia il filamento di DNA complementare alla sequenza di RNA guida, cioè il *target*.
- RuvC, sito nucleasico responsabile del *cleavage* del filamento opposto (*nontarget strand*).

Inoltre Cas9, nel sistema CRISPR di tipo II, partecipa anche alla maturazione del crRNA e, insieme ad altre proteine codificate dall'operone Cas, concorre all'acquisizione degli *spacers* nel locus CRISPR.

### 2.7.2. STRUTTURA DI CAS9

Analizzando Cas9, isolandolo dall'RNA guida, si osserva che l'enzima è formato da 2 lobi in stretta connessione

- REC, *recognition*, il lobo che riconosce l'alfa elica
- NUC, lobo contenente i due domini *nucleasici* e la regione CTD, ovvero il dominio C-terminale, che è molto variabile.

Il CTD contiene il sito che interagisce con la regione PAM. Il fatto che, nell'enzima isolato dal filamento di RNA guida, questa struttura deputata al riconoscimento della PAM, sia una struttura disorganizzata, indica che l'enzima Cas9 sia reclutato dal tracrRNA in conformazione

---

<sup>3</sup> Ed è per questo indicato spesso come *guideRNA*.

<sup>4</sup> Il termine indica la sequenza target.

inattiva, incapace di riconoscere il DNA *target* prima del legame con il *guideRNA*; è quest'ultimo a permettere l'attivazione dei siti nucleasici.

### 2.7.3. RNA GUIDA E LEGAME CON CAS9

Il legame della nucleasi con il *guideRNA* permette il riarrangiamento della proteina Cas; ne deriva che l'enzima Cas9 subisce un'attivazione strutturale, adottando una conformazione tale da permettergli il riconoscimento del DNA *target* e i successivi taglio e digestione. Questo meccanismo spiega la definizione di Cas9: *RNA-guided endonuclease*.

Come anticipato, il tracrRNA è responsabile del reclutamento della proteina Cas9.

Se l'RNA guida è a singolo filamento<sup>5</sup>, solo il primo dei suoi *loop*<sup>6</sup> è indispensabile per la formazione del complesso tra *sgRNA* e Cas9.

I *loop* successivi non sono richiesti per la funzionalità del complesso, ma contribuiscono a stabilizzare il legame dell'RNA guida, promuovendo l'attivazione del *CRISPR-Cas complex*, quindi incrementando l'efficienza catalitica.

È stata individuata una sequenza di nucleotidi all'interno della regione *spacer* del crRNA, chiamata *seed sequence*. È questa regione a conferire la specificità nei confronti del target. Errori nella *seed sequence* possono diminuire o annullare la capacità di legame del target da parte del sistema, allo stesso modo in cui, omologie con tale sequenza, spesso introducono legami *off-target*.

Nel CRISPR di tipo II, la *seed region* è rappresentata, all'interno dei 20 nt della sequenza *spacer*, dai 10-12 nucleotidi che si trovano a ridosso del terminale 3' dello *spacer*, in prossimità della PAM.

Il Cas9 è in stretto contatto con lo scheletro di ribosio fosfato dell'RNA guida. Ciò permette di predisporre i 10 nucleotidi della *seed sequence*, richiesti per il reclutamento iniziale del DNA, in conformazione tale da favorire il legame del target.

---

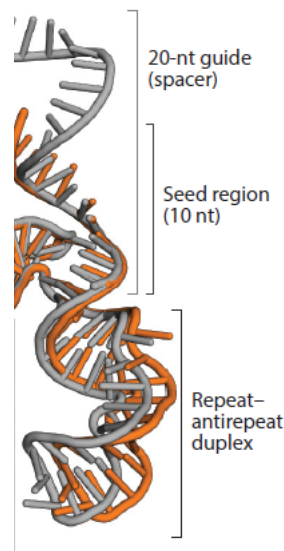
<sup>5</sup> Il *single guide RNA* è una struttura che non si presenta in natura, ma deriva dall'ingegnerizzazione del sistema, che ha permesso di unire i due filamenti di RNA (cr e tracr) che formano il complesso con la proteina Cas, in un'unica molecola, formando un filamento che si ripiega ibridandosi su sé stesso.

<sup>6</sup> Il sistema ingegnerizzato, mantiene i *loop*, cioè le strutture a forcina, presenti nella composizione naturale sul filamento di tracrRNA



Inoltre, i siti di interazione con la PAM, che sono responsabili del riconoscimento della sequenza trinucleotidica PAM “-NGG-” (dal 5’ al 3’, dove N indica una qualunque base), sono disfunzionali nel Cas9 isolato dall’RNA guida. Questi siti di interazione vengono predisposti solo prima di prendere contatto con il DNA target; rimarcando ancora che l’associazione con RNA guida permette al Cas9 di assumere una struttura in grado di riconoscere il DNA target.

Figura 6 – Il guideRNA, e le regioni che lo compongono.



Jiang, F., Doudna, J., CRISPR-cas9 Structures and Mechanisms, “Annu. Rev. Biophys”, 2017, 46, pp. 505-529.

#### 2.7.4. RICONOSCIMENTO DEL TARGET

Formatosi il complesso Cas9-RNA guida, questo ricerca un sito di DNA target complementare al proprio *gRNA*.

Per il riconoscimento del segmento target, sono necessari, contemporaneamente:

- Appaiamento di basi complementari tra lo *spacer* (20 nt) e un *protospacer* nel target DNA.
- Presenza di una sequenza PAM adiacente al sito target.

La sequenza PAM è fondamentale per il riconoscimento specifico delle sequenze target. Singole mutazioni nella PAM inducono l’inattivazione dell’attività di *cleavage* del Cas9, permettendo ai batteriofagi di evadere la risposta immunitaria dell’ospite.

La PAM, nel sistema CRISPR-Cas del batterio *Streptococcus pyogenes*, è rappresentata da una sequenza -NGG- (in cui N è un qualsiasi nucleotide e GG sono due guanine) presente sul filamento di DNA opposto al filamento di DNA target.

Cas9 intraprende la ricerca del DNA target a partire dalla sequenza PAM corretta, prima di reclutare il DNA adiacente per una possibile complementarità con l'RNA guida.

#### 2.7.5. APPAIAMENTO

Una volta individuata la PAM corretta e verificata la presenza di un target-DNA ad essa adiacente, Cas9 induce lo svolgimento del *target*DNA in prossimità del legame intracatena nel sito adiacente alla PAM. Segue l'introduzione del filamento di RNA guida, che si ibridizza con il DNA target.

In effetti, l'interazione specifica tra PAM e Cas9, innesca una modifica conformazionale delle strutture adiacenti alla PAM, destabilizzando il duplex di DNA e permettendo alla prima base della sequenza target di DNA di ruotare verso il filamento di RNA guida, facilitando il loro appaiamento.

Dunque, il riconoscimento della PAM si verifica contemporaneamente alla destabilizzazione della sequenza ad essa adiacente, contribuendo simultaneamente alla stabilizzazione dell'ibrido in formazione.

Durante l'appaiamento del DNA target con l'RNA guida, Cas9 interagisce inoltre con le basi spaiate del filamento *nontarget*, per agevolare lo svolgimento del duplex di DNA.

L'appaiamento delle basi procede a partire dal terminale 5' primo del filamento guida di RNA. Per l'efficienza del sistema è necessaria la complementarità assoluta tra la *seed region* del *guide*RNA e il frammento di DNA *target*; mentre appaiamenti scorretti nella regione *nonseed* sono meno critici se in misura tollerabile.

#### 2.7.6. ETERODUPLEX

Al termine del processo di appaiamento, si ha la formazione di un ibrido a DNA-RNA (*eteroduplex*) e un filamento di DNA spaiato.

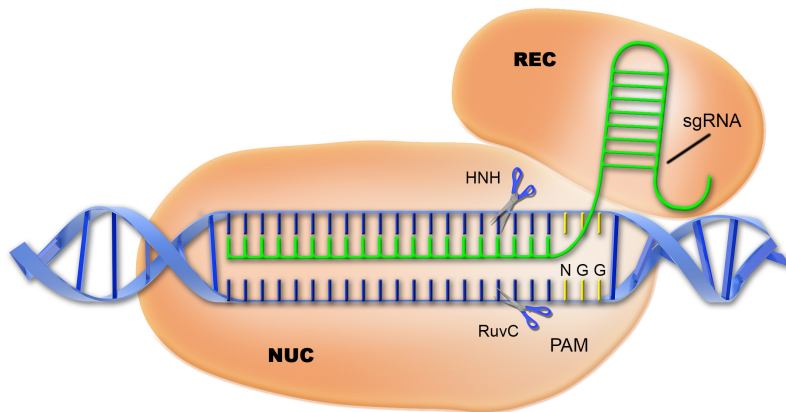
Nell'eteroduplex il DNA target è ibridato con i 20 nucleotidi della sequenza *spacer* dell'RNA guida. Questa struttura è posizionata nel canale centrale tra i due lobi del Cas9: tra REC e NUC<sup>7</sup>.

---

<sup>7</sup>Si ricorda che il primo, REC, è deputato al riconoscimento dell'alfa elica; il secondo, NUC, include i domini delle due nucleasi, che in questa fase si presentano in conformazione attiva.



Figura 6 – Posizionamento dell'eteroduplex tra i due lobi dell'enzima e cleavage da parte dei due domini nucleasici.



Harvard University, First Human Trial of Gene Editing Technique CRISPR Approved, Luglio 2016,  
<http://sitn.hms.harvard.edu/flash/2016/first-human-trial-gene-editing-technique-crispr-approved/>

## 2.8. DAL TAGLIO DEL DNA-TARGET OPERATO DAL CRISPR AL GENE EDITING

Nel batterio, il sistema CRISPR esaurisce la propria funzione di mediatore dell'immunità batterica acquisita quando, tagliando selettivamente il DNA virale, digerendolo ed inattivando il virus, permette al batterio di sopravvivere all'infezione di un batteriofago.

Tuttavia, per trasformare il sistema CRISPR/CAS in una tecnologia di gene-editing occorrono due passaggi aggiuntivi: il primo è la veicolazione del sistema all'interno della cellula. In particolare, solo le cellule procariotiche dispongono del sistema CRISPR/Cas, pertanto se si vuole utilizzare il sistema per modificare il DNA di cellule eucariotiche (lieviti, piante, animali o uomo), l'intera "machinery" del CRISPR/CAS va trasferita nella cellula target della quale si vuole modificare o correggere un gene.

Nel paragrafo 5.1 sono descritte le tecniche utilizzate per veicolare l'intero complesso nelle cellule eucariotiche.

Secondo, il taglio selettivo di un DNA target, mediato dal CRISPR/CAS rappresenta solo la fase preliminare della tecnologia di DNA-editing. In seguito all'effetto dell'attività endonucleasica esercitata dal sistema (taglio e digestione), il filamento di DNA target dovrà essere riparato.

Ed è appunto questa fase di "riparazione" che permette di introdurre nel DNA target ogni modifica che si desidera apportarvi: delezione, mutazione, integrazione.

L'ingegnerizzazione ed ottimizzazione di tutti gli elementi che compongono il sistema CRISPR/Cas ha fatto del sistema CRISPR-cas la più moderna tecnologia di *gene editing*, seppur provenendo da un organismo primordiale quale un batterio, del quale conserva la semplicità.

### 2.8.1. RIPARAZIONE DEI DOUBLE STRAND BREAKS

Le cellule sono provviste di meccanismi cellulari autonomi che permettono la correzione di eventuali errori nel DNA, introdotti durante la replicazione. Inoltre, lo stesso DNA, è continuamente esposto ad agenti potenzialmente in grado di apportarvi delle mutazioni; se queste si evidenziano raramente rispetto alla frequenza di esposizione a tali agenti mutanti, è grazie al sistema di riparazione cellulare, presente in tutte le cellule.

La risposta cellulare al danno è un meccanismo che opera sia nei procarioti che negli eucarioti, e può avvenire sia per mezzo di un evento di ricombinazione non omologa,<sup>8</sup> che attraverso la ricombinazione omologa, la quale è naturalmente predisposta per riparare le rotture del doppio filamento localizzate a livello delle forcelle di replicazione.

Come si è detto, l'enzima Cas9 introduce un *double-strand break* del DNA target. Il taglio avviene in due diversi siti, ad opera di due domini nucleasici distinti.

La riparazione dei filamenti può successivamente avvenire con due modalità differenti:

- In assenza di un *template*<sup>9</sup>, il meccanismo principale di riparazione è *NHEJ*, *non-homologous end joining*, ovvero si ha una riparazione casuale del filamento. Il meccanismo è altresì definito *error-prone* in quanto induce nella maggior parte dei casi inserzioni, delezioni o sostituzioni nel sito di taglio, le quali producono il più delle volte mutazioni che comportano la disattivazione (*knockout*) del gene (*Figura 7 - freccia a sinistra*).
- In presenza di un *donor template*, che si possa ibridare per omologia alle estremità della sequenza interrotta, cioè ai bordi del taglio, è possibile ottenere una riparazione o una modifica mirata del filamento prive di errori, *HDR* (*Homology Directed Repair*), grazie all'azione delle polimerasi, a partire dal frammento-stampo fornito. Dall'inserzione, nel sito di taglio del doppio filamento, della breve sequenza polinucleotidica selezionata,

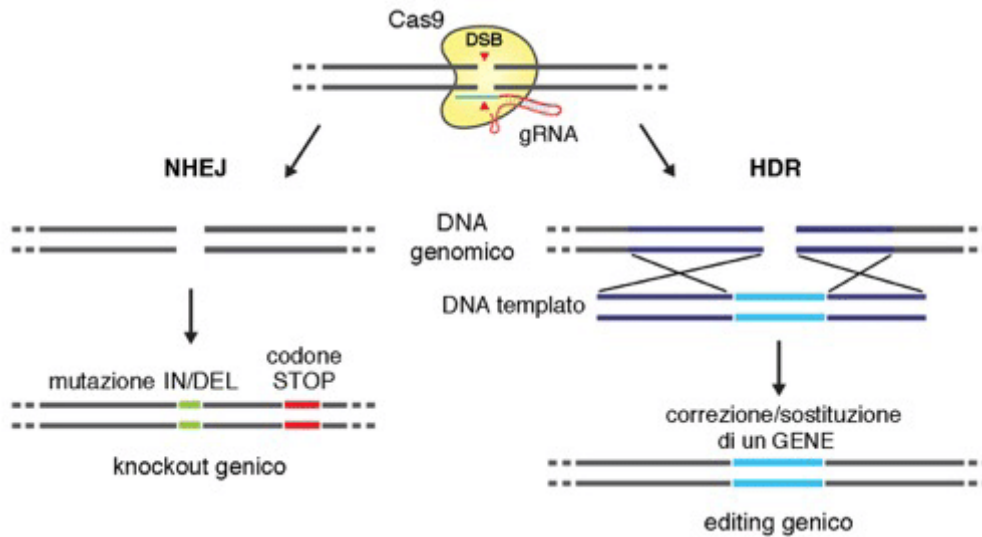
---

<sup>8</sup> Questo tipo di attività è costante nella cellula.

<sup>9</sup> Il *template* è una breve sequenza polinucleotidica, utilizzata come modello o stampo, sul quale le polimerasi operano gli appaiamenti di base per la sintesi del filamento complementare.

ne risulta una precisa modifica genomica. Questa seconda tecnica *HDR* pone le basi per un preciso sistema di *gene editing* (Figura 7 – freccia destra).

Figura 7- - Meccanismo di ingegneria genomica mediata da CRISPR-Cas9. In questa immagine, è rappresentato un RNA guida a singolo filamento. Sono mostrate due diverse modalità di riparazione del DSB. Nella tabella sono riportate le applicazioni dei diversi metodi.



Braccaria, G., Lucchin, M., *The new ways for the genetic improvement of agrifood plants: from cisgenic breeding to genomic editing technologies*, "ResearchGate", 2016, 2, p 39

Tabella 1

Error-prone NHEJ	Other applications	High-fidelity HDR
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Indel mutations</li> <li>• Frameshift mutations</li> <li>• Large deletions or inversions using two adjacent DSBs</li> <li>• Loss-of-function screens</li> <li>• Genomic rearrangements</li> <li>• NHEJ-mediated homology-independent knock-in</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Gene targeting (dCas9–effector): <ul style="list-style-type: none"> <li>– transcriptional regulation</li> <li>– epigenetic modification</li> <li>– live-cell imaging</li> <li>– nucleotide editing</li> </ul> </li> <li>• Genetic screens/drug screens</li> <li>• Ligation-mediated gene editing by double Cas9 nickases (D10A)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Gene insertion/correction/replacement</li> <li>• Precise point mutations</li> <li>• Precise gene knockout</li> <li>• Conditional alleles (Cre-loxP, etc.)</li> <li>• Introduction of tags, reporters, etc.</li> <li>• Gain-of-function mutations</li> </ul>

Jiang, F., Doudna, J., *CRISPR-cas9 Structures and Mechanisms*, "Annu. Rev. Biophys", 2017, 46, pp. 505-529.

Oltre al taglio e riparazione, è importante citare un'ulteriore applicazione del sistema CRISPR/CAS. Privando i siti catalitici di Cas9 della loro attività, attraverso mutazione dei domini nucleasici, permane la capacità del sistema di legare un DNA-target complementare all'RNA guida. In questo modo, coniugando la Cas a domini effettori con attività specifiche, il complesso CRISPR-Cas può essere utilizzato come vettore per operare su uno specifico DNA-

target senza modificarlo (per esempio modulandone la trascrizione o più semplicemente per operarvi uno screening).

### 2.8.2. PROGRAMMABILITA' DEL SISTEMA

Il complesso CRISPR/Cas è programmabile, quindi può essere ingegnerizzato per riconoscere, tagliare e digerire dei precisi e voluti target.

Infatti, il riconoscimento della sequenza *target*, in questo sistema, avviene per mezzo della sequenza di 20 nucleotidi del crRNA. In altre parole scegliendo opportunamente la sequenza del crRNA (o meglio del DNA che sarà trascritto nel crRNA), sarà possibile dirigere il sistema CRISPR/Cas su qualsiasi DNA target voluto, esattamente nella posizione che si intende mutare o correggere. Ciò elimina la necessità di ingegnerizzare le proteine dell'intero dominio per il riconoscimento di ogni differente target, come richiesto invece nelle complesse tecnologie precedenti; in questo sistema, è sufficiente inserire nella cellula la sequenza nucleotidica complementare (crRNA) alla sequenza DNA *target*.

Ciò è un vantaggio in termini di semplicità del procedimento, ma, per contro, fa emergere la necessità di selezionare delle sequenze di nucleotidi che siano estremamente specifiche e caratterizzanti uno determinato target.

## 2.9. SVILUPPI DEL SISTEMA CRISPR/CAS

Il sistema CRISPR- Cas è stato programmato, modificando i 20 nucleotidi della sequenza del crRNA, per indirizzare il taglio ad uno specifico polinucleotide target complementare.

Successivamente, le ricercatrici Doudna e Charpentier, dell'Università della California, a Berkeley, sono state le prime a divulgare la modifica del sistema che comporta la fusione dei due RNA, ovvero il crRNA e il tracrRNA, in un unico filamento chimero, chiamato sgRNA, *single guide* RNA. Ne deriva un sistema semplificato, che può essere ingegnerizzato, programmandolo per individuare uno specifico e voluto DNA target nella cellula in cui viene veicolato.<sup>10</sup>

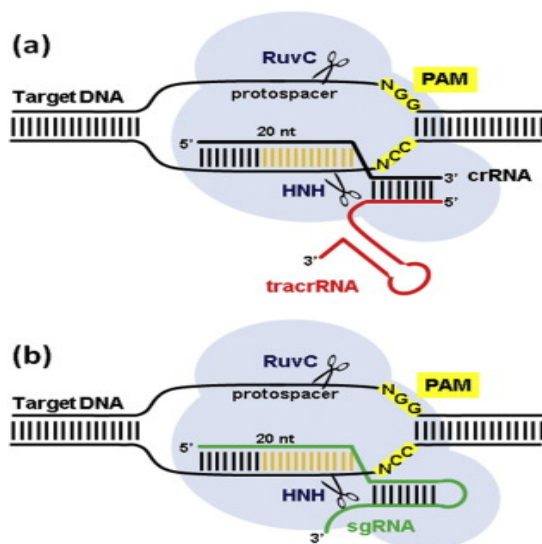
Tale evoluzione ha aperto le porte allo studio di questo sistema nei laboratori di ricerca di tutto il mondo, e dal 2012, anno di questa invenzione, ad oggi, sono state depositate migliaia di domande per l'ottenimento di brevetti sul sistema CRISPR.

I pannelli (a) e (b) della figura 9 (sotto) illustrano il sistema CRISPR/Cas nativo, con crRNA e tracrRNA separati (pannello a) e con il monofilamento *guideRNA* (pannello b).

---

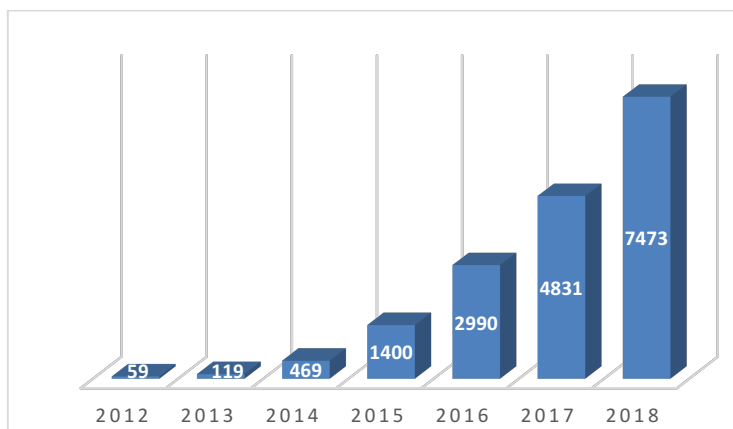
<sup>10</sup> Per i sistemi di delivery si veda il capitolo 5.2.

Figura 8 – Sistema CRISPR/Cas9 nativo (a) confrontato con il sistema ingegnerizzato a Berkeley (b). Nel primo, il guideRNA è un dsRNA, formato da crRNA e tracrRNA che si ibridizzano. Nel secondo caso è presente un single guide RNA, chimerico, derivante dalla fusione dei due filamenti di RNA che prima erano individuali.



Bortesi, L., Fischer, R., *The CRISPR/Cas9 system for plant genome editing and beyond*, "Biotechnology Advances", 33 (2015), pp 41–52

Grafico 1- Numero di domande brevettuali sul CRISPR depositate dal 2012 ad oggi



<https://www.iam-media.com/recent-patent-trends-crispr>

### 2.9.1. ULTERIORI SVILUPPI e UTILIZZI

Il sistema CRISPR-Cas può essere utilizzato per chiarire la funzione dei geni coinvolti nello sviluppo e nella progressione di malattie, permettendone anche la correzione delle mutazioni che le causano. Il complesso si può ingegnerizzare inoltre per operare l'inattivazione di oncogeni attivi, così come per promuovere l'attivazione di geni oncosoppressori disattivati.



Tutto ciò è a seguito della fusione di una proteina Cas9 priva di attività nucleasica, ad un dominio effettore specifico.

Inoltre, in un singolo esperimento si possono targettizzare più *loci* distinti; ciò permette una più facile analisi genomica, facilitando la comprensione di processi che implicano il contributo di più geni, come lo sviluppo di un tumore.

## **2.10. APPLICAZIONI SUL LUNGO TERMINE**

Il futuro del CRISPR è volto alla cura di forme di cancro, malattie neurodegenerative, infezioni virali, malattie geniche ereditarie e disordini immunologici.

## **2.11. OSTACOLI**

Nonostante ciò, ci sono molti ostacoli ancora da superare per lo sviluppo di un sistema CRISPR dal pieno potenziale terapeutico. Emerge la necessità di limitare le mutazioni *off-target*, indesiderate. Queste ultime sono le mutazioni che si verificano, per motivi ancora sconosciuti, in modo apparentemente casuale, quando il sistema svolge la propria azione su una sequenza diversa da quella target.

## **2.12. SOLUZIONI PROPOSTE**

Affinare l'azione sul sito target per omologia di sequenza permetterebbe l'applicazione del sistema all'ingegneria clinica. A tal fine occorre selezionare delle sequenze nucleotidiche target più specifiche possibili, per escludere l'eventuale omologia con altre sequenze di basi in punti distinti del genoma.

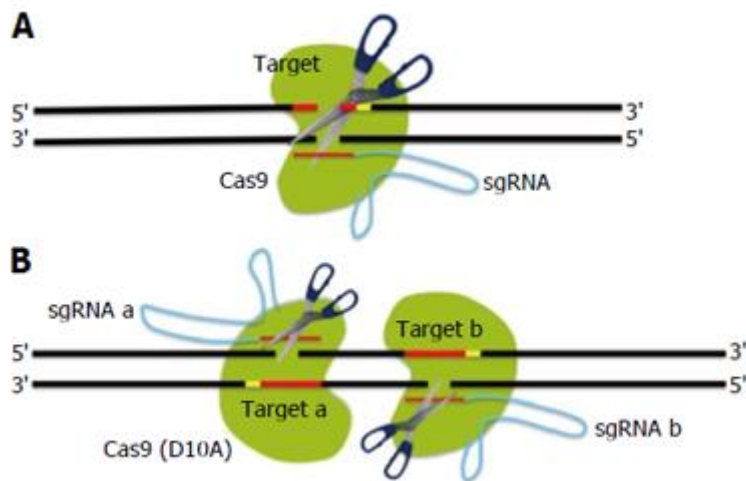
Un'altra soluzione proposta per diminuire gli effetti *off-target* è quella di transfettare le cellule con delle proteine Cas9 purificate, piuttosto che con il gene Cas9; le proteine infatti sono degradate rapidamente. In questo modo si esclude un effetto permanente sul genoma.

Allo stesso proposito, potrebbe essere utile utilizzare un gene Cas9 inducibile, che sia espresso solo in determinate condizioni.

Un ulteriore approccio, alternativo all'utilizzo di un enzima Cas9 che presenta due siti nucleasici (*Figura 10, immagine A*) e che produce un taglio su tutti e due i filamenti (*double strand break*), è rappresentato da un sistema che permetta di utilizzare per lo stesso frammento target due complessi di RNA guida che guidino due distinti Cas9, ognuno dei quali è privato di un dominio nucleasico (*Figura 10, immagine B*).

In questo caso, ciascun enzima opererebbe il taglio su uno solo dei filamenti della doppia elica, e ciò diminuirebbe il numero di errori, in quanto una singola rottura *off-target* può essere efficientemente riparata in modo preciso.

Figura 9 - Cas9 taglia il DNA target. A - una proteina Cas9 con due siti nucleasici (HNH e RuvC), è in grado di tagliare entrambi i filamenti della doppia elica. B - per ridurre il numero di mutazioni *off-target*, potrebbe essere utile utilizzare un sistema come quello in figura B, impiegando due proteine Cas9, ognuna delle quali viene privata di uno dei due domini nucleasici; ne risulta che ogni Cas9 può tagliare un singolo filamento; in questo modo, è molto più semplice riparare gli effetti *off target*, per omologia con il filamento opposto.



Horii, T., Hatada, I., Genome engineering using the CRISPR/Cas system, "World Journal of Medical Genetics", 2014; 4(3), pp 69-76

## **CAPITOLO 3 - LITIGATION USA**

### **3.1. UNIVERSITA' DELLA CALIFORNIA – UC BERKELEY**

L'Università della California, con sede a Berkeley, è stata la prima a depositare, nel maggio 2012 negli Stati Uniti, una domanda di brevetto prioritaria sull'ingegnerizzazione del sistema CRISPR e la sua applicazione ad una cellula. La relativa domanda di brevetto ha rivendicato i due filamenti di RNA caratterizzanti il sistema CRISPR di tipo II, ovvero il crRNA e tracrRNA, fusi in un unico filamento chimerico: il *single guide RNA*.

Nonostante nella domanda il sistema fosse rivendicato per l'applicazione ad una cellula generica, quindi tanto procariotica che eucariotica, né nella descrizione, né negli esempi, era descritta la realizzazione dell'invenzione su cellule eucariotiche; tale applicazione, cioè l'uso del sistema CRISPR/Cas in cellule superiori, rappresentava infatti un risultato ancora irraggiungibile per le stesse ricercatrici autrici dell'invenzione (Jennifer Doudna ed Emmanuelle Charpentier). La stessa Doudna, nel 2014, affermava che il suo team non fosse ancora certo che il sistema potesse funzionare negli eucarioti, ammettendo che ci fossero “*many frustrations*” nell'applicarlo a cellule umane, e confermando che, quando ciò fosse avvenuto, sarebbe stata una “*profound discovery*”.

### **3.2. BROAD INSTITUTE**

In realtà, nel dicembre dello stesso 2012, anno della priorità di Berkeley, un'altra domanda di brevetto prioritaria era stata depositata da Feng Zhang, ricercatore del Broad Institute. Tale domanda, descriveva gli strumenti ed i metodi necessari per l'applicazione del sistema CRISPR alle cellule eucariotiche; applicazione confermata nella domanda di brevetto da risultati sperimentali. La relativa domanda EP di brevetto è stata depositata nel dicembre 2013.

Il BROAD INSTITUTE richiedeva all'USPTO la procedura d'esame accelerata, possibilità prevista dal sistema brevettuale statunitense, che portava alla concessione del corrispondente brevetto nell'aprile 2014. Dunque, in USA, il primo brevetto sul CRISPR, che ne divulgava l'applicazione sulle cellule eucariotiche, veniva concesso nello stesso anno in cui Doudna aveva pubblicamente dichiarato le proprie incertezze su tale applicazione. Intanto, la domanda dell'Università della California, nonostante si riferisse ad una priorità con data precedente a quella del Broad Institute era ancora in fase d'esame.

### **3.3. LA PROCEDURA DI INTERFERENZA**

Nell'aprile del 2015, l'UNIVERSITÀ DELLA CALIFORNIA promuoveva di fronte alla Corte statunitense una procedura giudiziaria di interferenza contro il brevetto BROAD, rivendicando

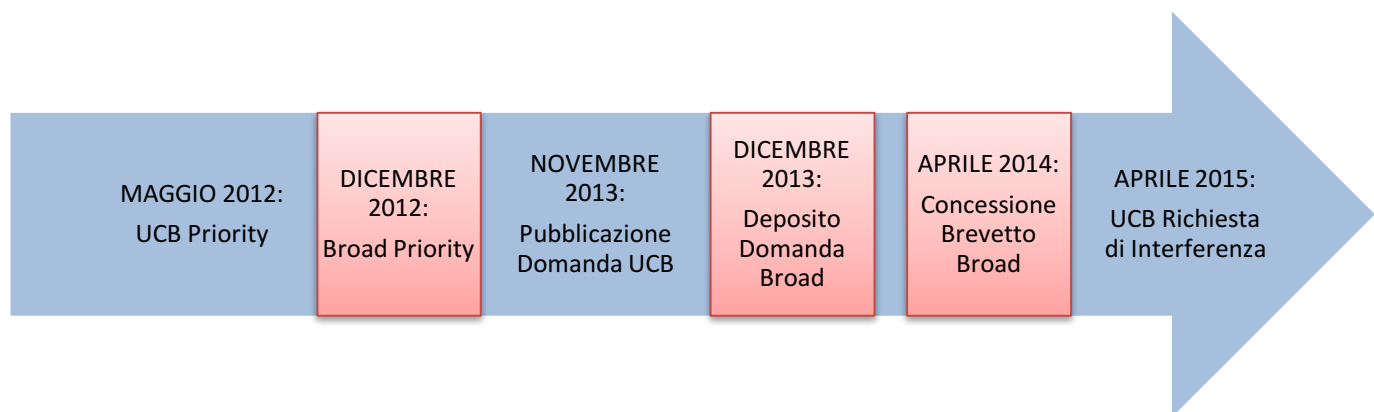
la titolarità dell'invenzione CRISPR nella sua più ampia forma di realizzazione, cioè sia applicata sulle cellule procariotiche che su quelle eucariotiche. Il procedimento si è concluso solo nel settembre 2018.

In particolare, l'Università della California (UC), facendo valere la propria data di priorità sull'ingegnerizzazione del CRISPR e sulla sua applicazione a qualsiasi cellula, data anteriore a quella del brevetto del Broad Institute, contestava la concessione del brevetto al Broad Institute, sostenendo che questo fosse privo del requisito di novità. Figura 1.

Inoltre, l'UC sosteneva che un *ordinary skilled in the art* sarebbe stato in grado di realizzare l'applicazione del sistema alle cellule eucariotiche, grazie alla descrizione dell'invenzione divulgata dalla propria domanda di brevetto, che ormai costituiva la *prior art*.

Oltretutto, UC obiettava che, a seguito della concessione del proprio brevetto (che, in riferimento alla data di priorità, risultava indubbiamente nuovo ed inventivo), sarebbe sorta l'ulteriore questione riguardo a chi dei due titolari dei brevetti sul CRISPR (UC e Broad) avrebbe dovuto ottenere una licenza dall'altro per realizzare la propria invenzione.

*Figura 10- Tappe delle prime domande brevettuali sul CRISPR in USA. Si noti come, in soli 16 mesi dal deposito della propria priorità, il Broad Institute abbia ottenuto la concessione del brevetto (dicembre 2012- aprile 2014). Mentre, l'UC Berkeley, depositaria della prima priorità US sul CRISPR (maggio 2012), rimaneva in attesa della decisione dell'esame USTPO.*



### 3.3.1. LE DECISIONI DI PRIMO GRADO E DI APPELLO NEGLI USA

Nel febbraio 2017 la commissione di ricorso del PTAB (Patent Trial and Appeal Board) ha emesso il giudizio di non interferenza del brevetto concesso al Broad Institute.

Ad aprile dello stesso anno, UC Berkeley ha presentato ricorso alla decisione del PTAB, consegnando il caso alla Corte d'appello degli Stati Uniti, che nel settembre 2018 ha confermato l'esito della causa di prima istanza.

Nella sentenza d'appello statunitense in riferimento all'interferenza tra *University of California e Broad Institute*, la Corte d'Appello degli Stati Uniti ha deciso che non esisteva interferenza tra i due brevetti poiché, sulla base delle evidenze scientifiche l'invenzione rivendicata dal Broad Institute, non sarebbero stata anticipata o resa ovvia dal contenuto e dalle rivendicazioni dell'UC.

La Corte rilevava infatti che:

- La domanda di brevetto dell'UC non era riferita a un particolare tipo di cellula.
- Inoltre, nell'agosto del 2012, cioè poco dopo il deposito della prima domanda di brevetto dell'UC, i ricercatori dell'UC- Berkeley pubblicarono un articolo sulla loro invenzione, ma ancora una volta non erano riportati esempi o risultati dell'applicazione dell'invenzione su cellule eucariotiche.
- Nell'articolo pubblicato dall'University of California – Berkeley si discuteva come gli elementi del sistema CRISPR-Cas potessero essere sperimentalmente applicati *in vitro* ad un sistema non cellulare. Si sottolineava che, dall'utilizzo dello stesso sistema in cellule eucariotiche, poteva insorgere tossicità, causata dall'azione delle esonucleasi endogene eucariotiche sul sistema *CRISPR-Cas*.
- In particolare J. Doudna, autrice dell'invenzione di UC-Berkeley, poco dopo la pubblicazione del brevetto di Broad, aveva espresso molteplici dubbi sull'applicabilità del sistema CRISPR-Cas alle cellule eucariotiche, sottolineando che tale applicazione, se conseguita, sarebbe stata un significativo avanzamento, o utilizzando le parole della stessa Doudna “*a profound discovery*”: affermazioni considerate molto rilevanti dalla Corte di Appello ai fini della decisione finale.

### 3.3.2. “LA MANCANZA DI RAGIONEVOLE ASPETTATIVA DI SUCCESSO” (“Reasonable Expectation of success”) come criterio di valutazione della non-ovvietà di una nuova invenzione

Alla luce delle opinioni espresse dagli stessi inventori della UC-Berkeley, la Corte di Appello ha concluso che, sulla base delle divulgazioni tecniche contenute nella domanda di brevetto dell'UC-Berkeley, una persona *ordinary skilled in the art* non avrebbe avuto una ragionevole aspettativa di successo nel tentativo d'applicare il sistema CRISPR-Cas in cellule eucariotiche. Di conseguenza, il brevetto concesso al Broad Institute rappresentava invenzione autonoma, non era obiettabile di mancanza di attività inventiva<sup>11</sup>.

---

<sup>11</sup> Al contrario, le fonti di prior art che avrebbero potuto dissuadere l'inventore dal proseguire le proprie ricerche utilizzando un determinato metodo, risultano a sostegno dell'attività inventiva del passaggio.

Queste conclusioni erano oltretutto confermate dalle dichiarazioni dell'esperto del Broad Institute, secondo le quali le differenze tra le condizioni cellulari (quali enzimi cellulari, temperatura intracellulare, concentrazione di vari ioni, pH, presenza o meno di altre molecole a seconda del tipo cellulare) in procarioti ed eucarioti sono talmente rilevanti che l'applicazione del sistema CRISPR-Cas in eucarioti sarebbe stata del tutto "*unpredictable*", ovvero "non prevedibile" alla luce dell'insegnamento tecnico nella domanda della UC-Berkeley. A supporto di tale considerazione, soprattutto giocava la conoscenza da parte dello *skilled in the art* della presenza nelle cellule eucariotiche di ribonucleasi e di altri sistemi che degradano le molecole di RNA.

La Corte d'Appello degli Stati Uniti ha dunque giudicato le due invenzioni quali invenzioni distinte l'una dall'altra, rilevando quindi l'assenza di interferenza tra i due brevetti.

Il Brevetto dell'Università della California è stato infine concesso negli Stati Uniti nel giugno 2018 (US 10.000.772).

Si riportano i riferimenti e le rivendicazioni dei due brevetti in oggetto come rilasciati negli Stati Uniti:



US008697359B1

(12) **United States Patent**  
**Zhang**

(10) **Patent No.:** **US 8,697,359 B1**  
(45) **Date of Patent:** **\*Apr. 15, 2014**

(54) **CRISPR-CAS SYSTEMS AND METHODS FOR ALTERING EXPRESSION OF GENE PRODUCTS**

(71) Applicants: **The Broad Institute Inc.**, Cambridge, MA (US); **Massachusetts Institute of Technology**, Cambridge, MA (US)

(72) Inventor: **Feng Zhang**, Cambridge, MA (US)

(73) Assignees: **The Broad Institute, Inc.**, Cambridge, MA (US); **Massachusetts Institute of Technology**, Cambridge, MA (US)

(\* ) Notice: Subject to any disclaimer, the term of this patent is extended or adjusted under 35 U.S.C. 154(b) by 0 days.

This patent is subject to a terminal disclaimer.

(21) Appl. No.: **14/054,414**

(22) Filed: **Oct. 15, 2013**

**Related U.S. Application Data**

(60) Provisional application No. 61/842,322, filed on Jul. 2, 2013, provisional application No. 61/736,527, filed on Dec. 12, 2012, provisional application No. 61/748,427, filed on Jan. 2, 2013, provisional application No. 61/791,409, filed on Mar. 15, 2013, provisional application No. 61/835,931, filed on Jun. 17, 2013.

(51) **Int. Cl.**  
**C12Q 1/68** (2006.01)  
**C12N 9/14** (2006.01)  
**C12N 9/22** (2006.01)  
**C12N 9/52** (2006.01)  
**C12N 15/00** (2006.01)  
**C07H 21/02** (2006.01)  
**C07H 21/04** (2006.01)  
**A61K 38/43** (2006.01)  
**A61K 38/46** (2006.01)  
**A61K 38/47** (2006.01)

(52) **U.S. Cl.**  
USPC ..... **435/6.1**; 435/6.13; 435/195; 435/199; 435/220; 435/320.1; 424/94.1; 424/94.6; 424/94.61; 536/22.1; 536/23.1; 536/23.2; 536/23.7; 536/24.1

(58) **Field of Classification Search**  
None  
See application file for complete search history.

(56) **References Cited**

U.S. PATENT DOCUMENTS

2010/0076057 A1 3/2010 Sontheimer et al.  
2011/0189776 A1 8/2011 Terns et al.  
2011/0223638 A1 9/2011 Wiedenheft et al.  
2013/0130248 A1 5/2013 Haurwitz et al.

FOREIGN PATENT DOCUMENTS

WO WO/2008/108989 9/2008  
WO WO/2010/054108 5/2010  
WO WO/2012/164565 12/2012  
WO WO/2013/098244 7/2013  
WO WO/2013/176772 11/2013

OTHER PUBLICATIONS

Makarova et al., "Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems" 9(6) *Nature Reviews Microbiology* 467-477 (1-23) (Jun. 2011).  
Wiedenheft et al., "RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea" 482 *Nature* 331-338 (Feb. 16, 2012).  
Gasunas et al., "Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria" 109(39) *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* E2579-E2586 (Sep. 4, 2012).  
Jinek et al., "A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity" 337 *Science* 816-821 (Aug. 17, 2012).  
Carroll, "A CRISPR Approach to Gene Targeting" 20(9) *Molecular Therapy* 1658-1660 (Sep. 2012).  
U.S. Appl. No. 61/652,086, filed May 25, 2012 69 pages.  
Al-Attar et al., Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPRs): The Hallmark of an Ingenious Antiviral Defense Mechanism in Prokaryotes, *Biol Chem.* (2011) vol. 392, Issue 4, pp. 277-289.  
Hale et al., Essential Features and Rational Design of CRISPR RNAs That Function With the Cas RAMP Module Complex to Cleave RNAs, *Molecular Cell*, (2012) vol. 45, Issue 3, 292-302.  
Erik Sontheimer, Project 7: Establishing RNA-Directed DNA Targeting in Eukaryotic Cells; Project dates: Nov. 16, 2011 to Dec. 31, 2012 (Feb. 4, 2012).

\* cited by examiner

*Primary Examiner* — Anne Gussow  
*Assistant Examiner* — Nancy J Leith

(74) *Attorney, Agent, or Firm* — Vedder Price P.C.; Thomas J. Kowalski; Smitha B. Uthaman

(57) **ABSTRACT**

The invention provides for systems, methods, and compositions for altering expression of target gene sequences and related gene products. Provided are vectors and vector systems, some of which encode one or more components of a CRISPR complex, as well as methods for the design and use of such vectors. Also provided are methods of directing CRISPR complex formation in eukaryotic cells and methods for utilizing the CRISPR-Cas system.

**20 Claims, 46 Drawing Sheets**

What is claimed is:

1. A method of altering expression of at least one gene product comprising introducing into a eukaryotic cell containing and expressing a DNA molecule having a target sequence and encoding the gene product an engineered, non-naturally occurring Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR)—CRISPR associated (Cas) (CRISPR-Cas) system comprising one or more vectors comprising:

a) a first regulatory element operable in a eukaryotic cell operably linked to at least one nucleotide sequence encoding a CRISPR-Cas system guide RNA that hybridizes with the target sequence, and

b) a second regulatory element operable in a eukaryotic cell operably linked to a nucleotide sequence encoding a Type-II Cas9 protein,

wherein components (a) and (b) are located on same or different vectors of the system, whereby the guide RNA targets the target sequence and the Cas9 protein cleaves the DNA molecule, whereby expression of the at least one gene product is altered; and, wherein the Cas9 protein and the guide RNA do not naturally occur together.

2. The method of claim 1, wherein the expression of two or more gene products is altered.

3. The method of claim 1, wherein the vectors of the system further comprise one or more nuclear localization signal(s) (NLS(s)).

4. The method of claim 1, wherein the guide RNAs comprise a guide sequence fused to a trans-activating cr (tracr) sequence.

5. The method of claim 1, wherein the Cas9 protein is codon optimized for expression in the eukaryotic cell.

6. The method of claim 1, wherein the eukaryotic cell is a mammalian or human cell.

7. The method of claim 1, wherein the expression of one or more gene products is decreased.

8. An engineered, non-naturally occurring CRISPR-Cas system comprising one or more vectors comprising:

a) a first regulatory element operable in a eukaryotic cell operably linked to at least one nucleotide sequence encoding a CRISPR-Cas system guide RNA that hybridizes with a target sequence of a DNA molecule in a eukaryotic cell that contains the DNA molecule, wherein the DNA molecule encodes and the eukaryotic cell expresses at least one gene product, and

b) a second regulatory element operable in a eukaryotic cell operably linked to a nucleotide sequence encoding a Type-II Cas9 protein, wherein components (a) and (b) are located on same or different vectors of the system, whereby the guide RNA targets and hybridizes with the target sequence and the Cas9 protein cleaves the DNA molecule,

whereby expression of the at least one gene product is altered; and, wherein the Cas9 protein and the guide RNA do not naturally occur together.

9. The system of claim 8, wherein the expression of two or more gene products is altered.

10. The system of claim 8, wherein the CRISPR-Cas system further comprises one or more NLS(s).

11. The system of claim 8, wherein the guide RNAs comprise a guide sequence fused to a tracr sequence.

12. The system of claim 8, wherein the Cas9 protein is codon optimized for expression in the eukaryotic cell.

13. The system of claim 8, wherein the eukaryotic cell is a mammalian or human cell.

14. The system of claim 8, wherein the expression of one or more gene products is decreased.

15. An engineered, programmable, non-naturally occurring Type II CRISPR-Cas system comprising a Cas9 protein and at least one guide RNA that targets and hybridizes to a target sequence of a DNA molecule in a eukaryotic cell, wherein the DNA molecule encodes and the eukaryotic cell expresses at least one gene product and the Cas9 protein cleaves the DNA molecules, whereby expression of the at least one gene product is altered; and, wherein the Cas9 protein and the guide RNA do not naturally occur together.

16. The CRISPR-Cas system of claim 15, wherein the expression of two or more gene products is altered.

17. The CRISPR-Cas system of claim 15, wherein the CRISPR-Cas system further comprises one or more NLS(s).

18. The CRISPR-Cas system of claim 15, wherein the guide RNAs comprise a guide sequence fused to a tracr sequence.

19. The CRISPR-Cas system of claim 15, wherein the Cas9 protein is codon optimized for expression in the eukaryotic cell.

20. The CRISPR-Cas system of claim 15, wherein the eukaryotic cell is a mammalian or human cell.

\* \* \* \* \*





US010000772B2

(12) **United States Patent**  
**Doudna et al.**

(10) **Patent No.:** **US 10,000,772 B2**  
(45) **Date of Patent:** **\*Jun. 19, 2018**

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

(2013.01); *C12N 2310/20* (2017.05); *C12N 2310/3519* (2013.01); *C12N 2310/531* (2013.01); *C12N 2800/80* (2013.01); *C12Y 301/04* (2013.01)

(71) Applicants: **The Regents of the University of California**, Oakland, CA (US); **University of Vienna**, Vienna (AT); **Emmanuelle Charpentier**, Braunschweig (DE)

(58) **Field of Classification Search**  
None  
See application file for complete search history.

(72) Inventors: **Jennifer A. Doudna**, Berkeley, CA (US); **Martin Jinek**, Berkeley, CA (US); **Emmanuelle Charpentier**, Braunschweig (DE); **Krzysztof Chylinski**, Vienna (AT)

(56) **References Cited**

U.S. PATENT DOCUMENTS

5,766,900	A	6/1998	Shillito et al.
5,767,367	A	6/1998	Dudits et al.
7,534,819	B2	5/2009	Albarran et al.
7,691,995	B2	4/2010	Zamore et al.
7,745,609	B2 *	6/2010	Bennett ..... C07K 14/003 536/23.1
8,546,553	B2	10/2013	Terms et al.
8,697,359	B1	4/2014	Zhang
8,771,945	B1	7/2014	Zhang
8,795,965	B2	8/2014	Zhang

(Continued)

(73) Assignees: **The Regents of the University of California**, Oakland, CA (US); **University of Vienna**, Vienna (AT); **Emmanuelle Charpentier**, Braunschweig (DE)

FOREIGN PATENT DOCUMENTS

CN	103224947	A	7/2013
CN	103233028	A	8/2013

(Continued)

(\* ) Notice: Subject to any disclaimer, the term of this patent is extended or adjusted under 35 U.S.C. 154(b) by 0 days. days.  
This patent is subject to a terminal disclaimer.

OTHER PUBLICATIONS

Briner et al. (2014) Guide RNA Functional Modules Direct Cas9 Activity and Orthogonality. *Molecular Cell*, 56:333-339.\*  
(Continued)

(21) Appl. No.: **14/685,502**

(22) Filed: **Apr. 13, 2015**

(65) **Prior Publication Data**

US 2016/0130608 A1 May 12, 2016

**Related U.S. Application Data**

(63) Continuation of application No. 13/842,859, filed on Mar. 15, 2013.

(60) Provisional application No. 61/765,576, filed on Feb. 15, 2013, provisional application No. 61/757,640, filed on Jan. 28, 2013, provisional application No. 61/716,256, filed on Oct. 19, 2012, provisional application No. 61/652,086, filed on May 25, 2012.

(51) **Int. Cl.**  
*C12N 9/22* (2006.01)  
*C12N 15/10* (2006.01)  
*C12N 15/11* (2006.01)  
*C12N 15/113* (2010.01)  
*C12N 15/90* (2006.01)  
*C12N 15/70* (2006.01)  
*C12N 15/74* (2006.01)  
*C12N 15/63* (2006.01)

(52) **U.S. Cl.**  
CPC ..... *C12N 15/907* (2013.01); *C12N 9/22* (2013.01); *C12N 15/102* (2013.01); *C12N 15/111* (2013.01); *C12N 15/113* (2013.01); *C12N 15/63* (2013.01); *C12N 15/70* (2013.01); *C12N 15/746* (2013.01); *C12N 15/90* (2013.01); *C12N 15/902* (2013.01); *C12N 2310/11* (2013.01); *C12N 2310/13*

*Primary Examiner* — Neil P Hammell  
(74) *Attorney, Agent, or Firm* — Bozicevic, Field & Francis LLP

(57) **ABSTRACT**

The present disclosure provides a DNA-targeting RNA that comprises a targeting sequence and, together with a modifying polypeptide, provides for site-specific modification of a target DNA and/or a polypeptide associated with the target DNA. The present disclosure further provides site-specific modifying polypeptides. The present disclosure further provides methods of site-specific modification of a target DNA and/or a polypeptide associated with the target DNA. The present disclosure provides methods of modulating transcription of a target nucleic acid in a target cell, generally involving contacting the target nucleic acid with an enzymatically inactive Cas9 polypeptide and a DNA-targeting RNA. Kits and compositions for carrying out the methods are also provided. The present disclosure provides genetically modified cells that produce Cas9; and Cas9 transgenic non-human multicellular organisms.

**11 Claims, 128 Drawing Sheets**

transgene into the pronucleus of a fertilized mouse oocyte followed by ovum implantation into a pseudopregnant female; etc.). The Cas9 protein is under the control of a promoter that expresses at least in embryonic stem cells, and may be additionally under temporal or tissue-specific control (e.g., drug inducible, controlled by a Cre/Lox based promoter system, etc.). Once a line of transgenic Cas9 expressing mice is generated, embryonic stem cells are isolated and cultured and in some cases ES cells are frozen for future use. Because the isolated ES cells express Cas9 (and in some cases the expression is under temporal control (e.g., drug inducible), new knock-out or knock-in cells (and therefore mice) are rapidly generated at any desired locus in the genome by introducing an appropriately designed DNA-targeting RNA that targets the Cas9 to a particular locus of choice. Such a system, and many variations thereof, is used to generate new genetically modified organisms at any locus of choice. When modified Cas9 is used to modulate tran-

scription and/or modify DNA and/or modify polypeptides associated with DNA, the ES cells themselves (or any differentiated cells derived from the ES cells (e.g., an entire mouse, a differentiated cell line, etc.) are used to study to properties of any gene of choice (or any expression product of choice, or any genomic locus of choice) simply by introducing an appropriate DNA-targeting RNA into a desired Cas9 expressing cell.

While the present invention has been described with reference to the specific embodiments thereof, it should be understood by those skilled in the art that various changes may be made and equivalents may be substituted without departing from the true spirit and scope of the invention. In addition, many modifications may be made to adapt a particular situation, material, composition of matter, process, process step or steps, to the objective, spirit and scope of the present invention. All such modifications are intended to be within the scope of the claims appended hereto.

## SEQUENCE LISTING

The patent contains a lengthy "Sequence Listing" section. A copy of the "Sequence Listing" is available in electronic form from the USPTO web site (<http://seqdata.uspto.gov/?pageRequest=docDetail&DocID=US10000772B2>). An electronic copy of the "Sequence Listing" will also be available from the USPTO upon request and payment of the fee set forth in 37 CFR 1.19(b)(3).

What is claimed is:

1. A method of modifying a target DNA molecule, the method comprising:

contacting a target DNA molecule having a target sequence with a complex comprising:

- (a) a Cas9 protein; and  
(b) a DNA-targeting RNA comprising:

(i) a targeter-RNA that hybridizes with the target sequence, and

(ii) an activator-RNA that hybridizes with the targeter-RNA to form a double-stranded RNA (dsRNA) duplex of a protein-binding segment, wherein the activator-RNA hybridizes with the targeter-RNA to form a total of 10 to 15 base pairs, wherein said contacting takes place outside of a bacterial cell and outside of an archaeal cell, thereby resulting in modification of the target DNA molecule.

2. The method of claim 1, wherein said modification of the target DNA molecule is cleavage of the target DNA molecule.

3. The method of claim 1, wherein the target sequence is 15 nucleotides (nt) to 18 nt long.

4. The method of claim 1, wherein the target sequence is 18 nucleotides (nt) to 25 nt long.

5. The method of claim 1, wherein the target DNA molecule is chromosomal DNA.

6. The method of claim 1, wherein the activator-RNA comprises the 26 nucleotide tracrRNA sequence set forth in SEQ ID NO: 441.

7. The method of claim 1, wherein the targeter-RNA and/or the activator-RNA comprises one or more of: a non-natural internucleoside linkage, a nucleic acid mimetic, a modified sugar moiety, and a modified nucleobase.

8. The method of claim 1, wherein the targeter-RNA and/or the activator-RNA comprises one or more of: (i) a non-natural internucleoside linkage selected from a phosphorothioate, an inverted polarity linkage, and an abasic nucleoside linkage; (ii) a locked nucleic acid (LNA); and (iii) a modified sugar moiety selected from 2'-O-methoxyethyl, 2'-O-methyl, and 2'-fluoro.

9. The method of claim 1, wherein the targeter-RNA and/or the activator-RNA comprises one or more of: a peptide nucleic acid (PNA), a morpholino nucleic acid, a cyclohexenyl nucleic acid (CeNA), and/or a locked nucleic acid (LNA).

10. The method of claim 1, wherein the targeter-RNA and/or the activator-RNA comprises one or more modified sugar moieties selected from: 2'-O-(2-methoxyethyl), 2'-dimethylaminoethoxy, 2'-dimethylaminoethoxyethoxy, 2'-O-methyl, and 2'-fluoro.

11. The method of claim 1, wherein the targeter-RNA and/or the activator-RNA is conjugated to a moiety selected from: a polyamine; a polyamide; a polyethylene glycol; a polyether; a cholesterol moiety; a cholic acid; a thioether; a thiocholesterol; an aliphatic chain; a phospholipid; an adamantane acetic acid; a palmityl moiety; an octadecylamine or hexylamino-carbonyl-oxysterol moiety; a biotin; a phenazine; a folate; a phenanthridine; an anthraquinone; an acridine; a fluorescein; a rhodamine; a fluor; and a coumarin.

\* \* \* \* \*

### **3.4. CONCLUSIONI**

UC Berkeley ha rivendicato il sistema CRISPR in modo generale, quindi applicato anche alle cellule eucariotiche, ma ha descritto in maniera completa e sufficiente solo l'applicazione su cellule procariotiche.

Il Broad Institute ha descritto e rivendicato nel suo brevetto all'applicazione del sistema CRISPR-Cas limitatamente alle cellule eucariotiche, dimostrando il conseguimento di questo risultato con risultati sperimentali.

Per questo i risultati descritti dal brevetto di Broad hanno identificato una nuova invenzione. Una situazione del genere non risulta inusuale: spesso accade che l'invenzione generica e una sua applicazione specifica siano indipendenti.

Per quanto riguarda le licenze, al momento, chiunque intenda applicare il sistema agli eucarioti, dovrebbe richiederle entrambe.



## CAPITOLO 4 - LO SCENARIO EUROPEO

Lo stesso brevetto assegnato al Broad Institute, protagonista della *litigation in USA*, in Europa è stato rilasciato e successivamente revocato al termine di una procedura di opposizione, ma per ragioni diverse dall'interferenza di diritti.

Nel dicembre 2013, *The Broad Institute* ha depositato una domanda Europea e varie domande divisionali rivendicando l'applicazione del sistema CRISPR/Cas agli eucarioti e l'ottimizzazione dello stesso per modularne l'attività. Le domande depositate rivendicavano il diritto di prima priorità basato sulla domanda di brevetto prioritaria depositata il 12-12-2012 negli Stati Uniti.

Il primo brevetto europeo concesso al *The Broad Institute*, si intitola:

“*Engineering of systems, methods and optimized guide compositions for sequence manipulation*”<sup>12</sup>, al quale fanno riferimento numerose domande divisionali. Il suddetto brevetto descrive una composizione CRISPR ingegnerizzata, comprendente, in luogo dell'RNA nativo, un unico filamento di RNA chimerico, comprendente a sua volta le sequenze polinucleotidiche seguenti:

- *GuideRNA*, complementare al DNA target di una cellula eucariotica, con il quale si ibridizza,
- *TracrRNA*, filamento lungo almeno 50 nucleotidi, che si ibrida con *crRNA*,
- *Tracr mate RNA*, che si ibrida con *tracrRNA*

e una proteina Cas9 complessata con la sequenza di *guideRNA* e con il *tracr mate RNA*.

Il sistema descritto permette di apportare più facilmente delle modifiche di *gene editing* al DNA target di una cellula eucariotica, alla quale la composizione è applicabile al fine di modificarne l'espressione.

A tale scopo, il DNA target tagliato dal complesso CRISPR/Cas è riparato e modificato attraverso tecnica di ricombinazione omologa, utilizzando come stampo un frammento polinucleotidico esogeno, definito *template*, che si posiziona nel sito di interruzione del filamento, tra le estremità risultanti a seguito del taglio operato da Cas9.

Il complesso protetto prevede la possibile presenza di un primo elemento regolatore legato alla sequenza di RNA chimerico e di un secondo elemento regolatore al quale è legata la proteina Cas9, in grado di operare il *cleavage* su entrambi i filamenti del DNA target, oppure ingegnerizzata per tagliare un solo filamento.

---

<sup>12</sup> Vedi brevetto EP2771468

L'elemento regolatore può essere tessuto- o cellula-specifico, permettendo di incrementarne la localizzazione del sistema CRISPR-Cas in determinati siti.

Dunque, ogni elemento regolatore è in grado di modulare l'espressione di Cas9 in specifiche cellule o tessuti.

Un altro brevetto di *The Broad Institute* intitolato "*Crispr-Cas systems and methods for altering expression of gene products*"<sup>13</sup>, descrive un sistema vettore CRISPR-Cas (il vettore può essere virale), comprendente un primo elemento regolatore legato ad un polinucleotide codificante per i tre segmenti di RNA descritti nell'invenzione precedente, e un secondo elemento regolatore legato ad un polinucleotide codificante per una proteina Cas9 dotata di NLS<sup>14</sup>. Nel brevetto sono esattamente definite le mutazioni apportate ai domini catalitici della proteina Cas, al fine di modularne l'attività di taglio. Il sistema è utilizzato per il *gene editing* di una cellula eucariotica, anche di mammifero, inclusa una cellula umana. L'invenzione può causare, nei confronti del DNA target, un silenziamento genico sito-specifico, una modifica genomica sito-specifica oppure permettere multiple ingegnerizzazioni del genoma. La riparazione del polinucleotide tagliato da Cas9 prevede anche in questo caso la ricombinazione omologa con un *template*<sup>15</sup> esogeno.

*The Broad Institute* ha richiesto anche in Europa, all'EPO, la procedura d'esame accelerata. Entrambi i brevetti sono stati rilasciati in Europa nel 2014.

#### **4.1. L'ITER EUROPEO: INVALIDITA' DELLA PRIORITA'**

In Europa, attualmente, sia il brevetto EP2771468 che il brevetto divisionale EP2764103 sono stati revocati in opposizione.

La revoca di EP'468 è stata disposta dalla Divisione di Opposizione poiché questa rilevava l'invalidità del diritto di priorità rivendicato in EP'468 relativamente a quattro domande di priorità (tra cui la prima e la seconda) tra le dodici rivendicate nel brevetto EP2771468<sup>16</sup>, tre delle quali sono rivendicate anche nell'EP2764103.

---

<sup>13</sup> Vedi EP2764103

<sup>14</sup> *Nuclear Localization Signals*; promuovono l'espressione a livello nucleare del prodotto codificato dal polinucleotide.

<sup>15</sup> Sequenza polinucleotidica veicolata insieme al complesso descritto, la quale si inserisce a livello dell'interruzione di un filamento provocata dalla nucleasi, fungendo da stampo per le polimerasi, le quali appaiano i nucleotidi complementari sul filamento opposto.

<sup>16</sup> Le domande di priorità giudicate non valide nella domanda di brevetto dell'EP2771468 sono:

- P1: US61/736527P depositata in data 12-12-2012
- P2: US61/748427P del 02-01-2013
- P5: US61/791,409P depositata il 15-03-2013
- P11: US61/836,127P del 17-06-201

Il motivo dell'invalidità risiede nel fatto che il Broad Institute, titolare della domanda PCT che generava la domanda EP'468, non risulta beneficiario della cessione dei diritti di priorità sulle quattro domande di priorità in oggetto da parte di tutti i titolari delle stesse domande di priorità come previsto da legge.

Infatti la convenzione di Parigi dispone che il soggetto che può usufruire del diritto di priorità in una domanda di brevetto successiva sia lo stesso titolare che ha depositato la domanda di priorità. Il “*diritto di priorità*” può certamente essere ceduto a terzi, ma se i titolari della domanda di priorità (e quindi del diritto di priorità) sono due o più, la cessione dovrà essere realizzata e sottoscritta da tutti i detentori di tale diritto. Cosa che non accadeva nel caso di Broad.

In particolare, se una domanda di priorità è depositata da più richiedenti, ognuno di questi acquisisce su di essa un diritto totale, vale a dire che il diritto appartenente ad ogni depositario si estende all'intero contenuto del deposito (*communio pro indiviso*).

Quindi, affinché un diritto di priorità sia validamente ceduto a un terzo, deve essere accordato da tutti i titolari della stessa domanda di priorità.

#### 4.1.1. INCOMPLETA CESSIONE DEI DIRITTI di PRIORITÀ: LA DATA RILEVANTE CORRISPONDE AL DEPOSITO DELLA DOMANDA

Nella vicenda brevettuale PCT/EP relativa al brevetto del *Broad Institute*, emergeva, durante la procedura d'opposizione EPO che, tra i titolari delle priorità elencate nella domanda, alcuni di questi non avevano ceduto il proprio diritto al Broad Institute richiedente della domanda PCT<sup>17</sup>. In assenza di una regolare cessione dei diritti di priorità, l'EPO non ha riconosciuto la validità della prima e della seconda priorità rivendicate in EP'468. Di conseguenza, la data rilevante del brevetto è risultata essere la data della terza domanda prioritaria. (30.01.2013).

Di conseguenza, ai fini della valutazione della novità, sono state considerate come arte anteriore anche degli articoli di letteratura, relativi all'invenzione stessa, pubblicati dagli stessi titolari della domanda di priorità nel periodo intercorso tra la data della prima e la data della terza priorità.

Tali pubblicazioni non sarebbero state rilevanti (perché non appartenenti all'arte anteriore) se il brevetto avesse goduto di un valido e completo diritto di priorità; cadendo però la prima e

---

<sup>17</sup> In riferimento alle domande di priorità P1 e P2, non risultava alcuna cessione da parte di Luciano Maraffini, il cui nome era assente nel rideposito della domanda in qualità di PCT. Inoltre, le domande di priorità P5 e P11 erano state depositate da Maraffini, Bikard e Jian, nessuno dei quali figurava nella domanda PCT; anche in questo caso, alcun documento ne dimostrava la cessione.

seconda priorità, le divulgazioni scientifiche pubblicate dagli stessi inventori sono state considerate dalla Divisione d'Opposizione pregiudizievoli per la brevettabilità dell'invenzione. Il brevetto è stato revocato in Europa il 26 marzo 2018 ai sensi dell'articolo 138.1 (a) EPC per mancanza del requisito di novità e di attività inventiva.

Per gli stessi motivi la Divisione d'Opposizione ha revocato anche il successivo brevetto EP2764103.

Da notare che con una recentissima decisione annunciata durante gli O.P. del 16.01.2020 il Board of Appeal dell'EPO ha ugualmente considerato invalide la prima e la seconda priorità del brevetto EP 2771468, confermando così la decisione della Divisione d'Opposizione. Il brevetto è quindi definitivamente revocato per mancanza di novità e di attività inventiva come diretta conseguenza dell'invalido diritto di priorità.

## CAPITOLO 5 - PANORAMA BREVETTUALE EUROPEO

### 5.1. Primi Brevetti CRISPR in Europa antecedenti alle invenzioni della *California University* e del *Broad Institute*:

#### 5.1.1. Applicati a batteri e virus batteriofagi

In Europa, le prime applicazioni del sistema CRISPR-Cas ne prevedevano l'utilizzo per caratterizzare ceppi batterici e virus batteriofagi.

Le proteine Cas sono state utilizzate al fine di aumentare la resistenza batterica ai virus, per mezzo dell'introduzione di uno *spacer* eterologo, derivato dal DNA virale, nel locus CRISPR batterico.<sup>18</sup>

Lo studio dell'immunità batterica acquisita ha inoltre permesso di generare dei mutanti fagici in grado di eludere l'immunità conferita al batterio dal locus CRISPR, quindi resistenti al taglio da parte delle nucleasi batteriche.<sup>19</sup>

Tali mutanti virali, conservando la capacità di infettare ed uccidere selettivamente certi batteri, sono in grado di operare il controllo della popolazione batterica, inibendone lo sviluppo. L'attività di questi fagi può essere sfruttata per preservare alimenti, cosmetici, prodotti veterinari ed integratori dalla contaminazione batterica.

Per ottenere un fago resistente al complesso CRISPR-Cas batterico si espone un fago parentale ad un ceppo batterico resistente, in condizioni che permettano la produzione di almeno una variante fagica, lei stessa resistente. Segue la selezione della variante fagica mutata, resistente all'immunità conferita al batterio dal locus CRISPR e in grado di infettare il ceppo batterico. La resistenza del virus all'immunità batterica CRISPR-mediata è conferita da una mutazione nel genoma fagico a carico di una sequenza PAM e/o di una sequenza di cui il batterio ne conteneva una copia come *spacer* nel locus CRISPR.

#### 5.1.2. MARKER

Il locus CRISPR è stato utilizzato anche come marker di identificazione di alcuni ceppi batterici.

Per esempio, un ceppo di *Streptococcus thermophilus* insensibile ai fagi, impiegato nella produzione di prodotti caseari fermentati, è caratterizzato da specifiche sequenze presenti nel locus CRISPR. Il metodo di fermentazione che utilizza tale *Streptococcus* permette di conferire una spiccata viscosità al latte così trattato.<sup>20</sup>

---

<sup>18</sup> Vedi brevetto concesso in Europa nel 2010 a DuPont Nutrition Biosciences: EP1916903

<sup>19</sup> Vedi brevetto EP2489275

<sup>20</sup> Vedi brevetto EP2367938



Inoltre, in Europa è stato brevettato un ceppo di *Lactobacillus paracasei subsp. Paracasei*, avente proprietà antimicrobiche ed immunologiche e utilizzato in prodotti alimentari, farmaceutici e cosmetici. Anche il ceppo di *Lactobacillus* in questione è caratterizzato dalla presenza nel locus CRISPR di una sequenza specifica (virale) identificata nel testo del brevetto.<sup>21</sup>

## 5.2. 2013: NUOVE APPLICAZIONI DEL SISTEMA CRISPR

### 5.2.1. MARZO: l'invenzione nata a BERKELEY (EP2800811)

Il 15 marzo 2013, sono state depositate da *University of California* e *University of Vienna* due domande di brevetto Europee che hanno descritto l'ingegnerizzazione del sistema di origine batterica CRISPR-Cas e la sua applicazione a cellule, *in vitro* o *ex vivo*, sia su cellule procariotiche (batteri ed archeobatteri) che eucariotiche (protisti, funghi, piante, animali).

La prima di brevetto europeo rivendica le priorità depositate negli Stati Uniti e descrive un metodo per modificare un DNA target con una tecnica di *gene editing*, trattando il DNA con un complesso CRISPR/Cas di tipo II, costituito:

- Dal polipeptide Cas9,
- Da un segmento crRNA complementare al DNA target, ibridato con il
- tracrRNA, il quale a sua volta interagisce con Cas9. TracrRNA è formato da due

frammenti complementari di RNA, legati covalentemente per mezzo di alcuni nucleotidi interposti. Il filamento di tracrRNA si ripiega su sé stesso a formare una forcilla.

I segmenti di crRNA e tracrRNA formano una singola molecola di RNA chimerico, cioè un filamento continuo che si ripiega e ibridizza con sé stesso. (Vedi Figura 1)

Il complesso è in grado di tagliare il DNA target, complementare al segmento crRNA.

Inoltre, il dominio N-terminale della proteina Cas9 è stato legato ad un dominio proteico che ne agevola il passaggio dal citosol agli organelli cellulari. La domanda di brevetto rivendica l'applicazione del metodo a qualsiasi tipo di cellula (sia procariotica che eucariotica) *in vitro* o *ex vivo*, ed il DNA target è un DNA cromosomale. Il sistema CRISPR-Cas riconosce lo specifico target e opera il taglio della sequenza di basi voluta.

Lo stesso sistema CRISPR-Cas può fungere allo stesso tempo da trasportatore, per dirigere sul target un *donor polinucleotide*, ovvero un frammento polinucleotidico esogeno,

---

<sup>21</sup> Vedi brevetto EP2271744

[https://worldwide.espacenet.com/publicationDetails/originalDocument?FT=D&date=20130320&DB=&locale=en\\_EP&CC=EP&NR=2271744B1&KC=B1&ND=4](https://worldwide.espacenet.com/publicationDetails/originalDocument?FT=D&date=20130320&DB=&locale=en_EP&CC=EP&NR=2271744B1&KC=B1&ND=4)

opportunamente ingegnerizzato per inserirsi nell'interruzione operata sul filamento, che in questo modo è riparato. Il brevetto è stato rilasciato nel 2017.

Gli stessi titolari del primo brevetto hanno poi depositato una domanda divisionale<sup>22</sup> derivante da questo brevetto.

L'invenzione oggetto della domanda divisionale, partendo dal complesso divulgato nel primo brevetto (*parent*), vi apporta alcune modifiche importanti. In particolare, le modifiche sono a carico della proteina enzimatica Cas9, e sono state operate allo scopo di ridurre l'attività nucleasica, ovvero l'attività enzimatica di taglio e digestione.

Altre modifiche prevedono invece l'associazione della proteina enzimatica ad un polipeptide eterologo, ovvero un dominio effettore in grado di diminuire o accelerare la trascrizione del DNA target, quindi in grado di inibire o di promuovere la sintesi proteica.

Inoltre è stata ingegnerizzata l'attività enzimatica in modo tale da modificare i polipeptidi associati al DNA, ovvero grazie al sistema CRISPR-Cas ingegnerizzato si è resa possibile la produzione di una proteina differente da quella originariamente codificata dal DNA target.

---

<sup>22</sup> L'articolo 87 dell'European Patent Convention impone, per ogni domanda brevettuale, l'unità d'invenzione. Una domanda divisionale deriva dalla domanda definita *parent application*, e appartiene allo stesso ambito della prima, ma rivendica un'invenzione distinta.

Figura 81 - Disegno tratto dall' EP2800811. Composizione in cui i due RNA (crRNA e tracrRNA) sono fusi in un filamento di RNA chimerico.

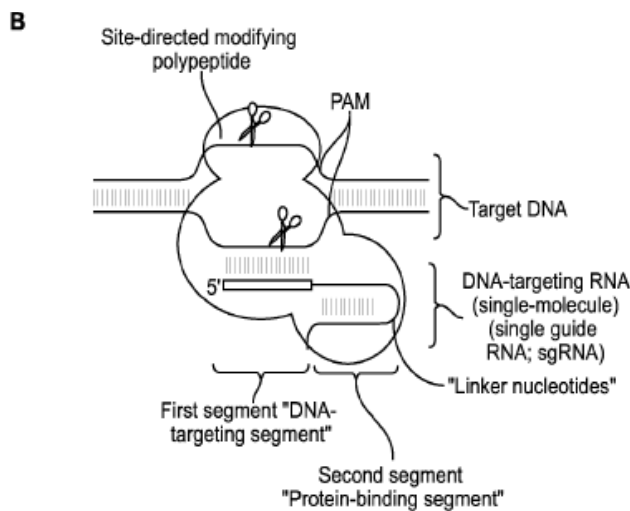


FIG. 1

113

EP2800811,  
[https://worldwide.espacenet.com/publicationDetails/originalDocument?FT=D&date=20170510&DB=&locale=en\\_EP&CC=EP&NR=2800811B1&KC=B1&ND=4](https://worldwide.espacenet.com/publicationDetails/originalDocument?FT=D&date=20170510&DB=&locale=en_EP&CC=EP&NR=2800811B1&KC=B1&ND=4)

### 5.2.2. OTTOBRE 2013: TOOLGEN<sup>23</sup>

Nello stesso anno, il sistema CRISPR-Cas di tipo II ha subito un'ulteriore ingegnerizzazione, grazie all'inserimento nel sistema di un *NLS* (*nuclear localization signal*) all'estremità C-terminale della proteina Cas9. Gli *NLS* hanno la funzione di promuovere la localizzazione del sistema a livello nucleare.

Dato che il complesso CRISPR-Cas può essere manipolato per dirigerlo a qualsiasi sequenza target, si evince il suo ruolo di supporto all'analisi genetica (con RFLP<sup>24</sup>), permettendo di analizzare quasi ogni singolo polimorfismo (mutazione anche di un singolo nucleotide), così come piccole inserzioni o delezioni.

### 5.2.3. DICEMBRE 2013: BROAD INSTITUTE RIVENDICA L' APPLICAZIONE DEL SISTEMA AGLI EUKARIOTI <sup>25</sup>

Come già spiegato nel capitolo precedente, nel 2014 è stato concesso al Broad Institute il brevetto sull'applicazione del sistema CRISPR-Cas alle cellule di eucarioti. Tuttavia il

<sup>23</sup> Vedi brevetto EP2912175

<sup>24</sup> Tecnica per mezzo della quale è possibile confrontare in laboratorio le differenze tra due o più acidi nucleici. La tecnica, prima dell'analisi, prevede che degli enzimi di restrizione, ovvero le nucleasi, taglino l'acido nucleico in frammenti; questa fase può essere mediata dalle nucleasi Cas9.

<sup>25</sup> Vedi brevetto EP2771468

brevetto è stato revocato nel 2018 per mancanza di novità, come conseguenza di invalido diritto di priorità.

### **5.3 - BREVETTI CONCESSI DALL'EPO**

In seguito alle divulgazioni dell'University of Vienna e del Broad Institute, numerose invenzioni basate sul sistema CRISPR-Cas sono state brevettate in Europa o sono in corso di brevettazione.

Le invenzioni protette ricadono in diverse categorie tecnologiche e includono:

- L'introduzione del complesso CRISPR/Cas (che è di origine batterica) nelle cellule eucariotiche (*delivery*).
- Nuovi vettori in grado di veicolare e al contempo modulare l'espressione del complesso CRISPR-Cas.
- Componenti modificati del sistema.
- Attività nuove del complesso.
- Nuove applicazioni del sistema tecnologico di *gene editing*.

#### **5.3.1. INVENZIONI RELATIVE ALL'INTRODUZIONE DEL SISTEMA CRISPR DI ORIGINE BATTERICA NELLA CELLULA OSPITE (DELIVERY)**

Il complesso CRISPR-Cas, di origine batterica, per poter svolgere la sua funzione in una cellula per la quale rappresenta una struttura esogena, quale la cellula eucariote, deve essere veicolato nel citoplasma per mezzo di opportuni mezzi o procedimenti.

Il filamento di RNA guida e la proteina enzimatica del sistema CRISPR-Cas, oppure i polinucleotidi per essi codificanti, sono internalizzati nella cellula eucariotica utilizzando sistemi *delivery*, all'occorrenza modulabili per promuovere il rilascio del complesso nelle cellule del tessuto di interesse. I sistemi di *delivery* utilizzati per veicolare il materiale genetico appartengono a due categorie principali: virali e non virali; i sistemi non virali sono suddivisi in sistemi nanoparticellari e sistemi fisici.

##### **5.3.1.1. Sistemi nanoparticellari**

Per introdurre nella cellula il complesso CRISPR-Cas, senza ricorrere all'utilizzo di vettori virali, si possono utilizzare sistemi formati da nanoparticelle (EP3079726 ed EP2931897), vale a dire particelle di dimensioni nanometriche (e.g. da 10 a 200 nm) in grado di attraversare liberamente la membrana cellulare. Tra questi ricordiamo i liposomi, nanosistemi di rilascio del

farmaco che si presentano come vescicole sferiche delimitate da una parete costituita da un doppio strato fosfolipidico che imita le membrane biologiche, immunoliposomi<sup>26</sup>, nanoparticelle lipidiche<sup>27</sup>, ed altri nanosistemi.

Il vantaggio dell'utilizzo di questi vettori è il ridotto rischio di comparsa di una risposta immunitaria.

Con il rilascio del brevetto EP3079726-B è stata protetta una composizione per il *delivery* di una sequenza polinucleotidica codificante il sistema CRISPR-Cas. La composizione rivendicata è composta da nanoparticelle formulate con il polimero brevettato.

#### 5.3.1.2. Sistemi non virali – metodi fisici

I sistemi fisici conservano il vantaggio di una maggiore sicurezza rispetto ai sistemi virali.

Tra questi sistemi abbiamo l'elettroporazione e le microiniezioni.

L'elettroporazione, alterando temporaneamente la permeabilità della membrana cellulare, permette l'ingresso del materiale genetico nella cellula. Questo sistema ha dimostrato una maggiore efficienza nel veicolare il sistema CRISPR-Cas ribonucleoproteico, rispetto al corrispondente plasmide che ne codifica i componenti.

Le microiniezioni implicano l'utilizzo di un capillare di vetro per inoculare del materiale genetico nella cellula.

#### 5.3.1.3. Sistemi virali

I virus sono organismi endocellulari obbligati e per loro natura penetrano nella cellula per sfruttarne il sistema replicativo. Vettori virali possono essere somministrati al paziente *in vivo*, oppure possono essere utilizzati per trattarne le cellule *ex vivo*<sup>28</sup>.

I virus utilizzati come vettori sono virus disattivati e devono presentare bassa immunogenicità e non produrre composti tossici per la cellula ospite. Prima dell'inoculazione, tali virus devono essere resi innocui, silenziando o rimuovendo i frammenti genici virali che codificano per la replicazione del genoma virale e per l'assemblaggio dei virioni.

---

<sup>26</sup> Gli immunoliposomi sono particolari liposomi dotati di antigeni sulla propria superficie, che permettono la formazione di un legame covalente con specifici anticorpi, promuovendo la localizzazione dei sistemi in determinati tessuti presentanti la struttura legante.

<sup>27</sup> Le nanoparticelle lipidiche sono nanosistemi di rilascio costituiti da una matrice di lipidi a basso peso molecolare, come mono-, di- e trigliceridi

<sup>28</sup> I metodi *ex vivo* sono condotti estraendo del materiale biologico da un organismo. Le cellule prelevate, dopo essere state oggetto dei trattamenti previsti, sono nuovamente inoculate nello stesso organismo donatore. Il limite di questa tecnica è la sua applicabilità solo a cellule in divisione e coltivabili in vitro, per esempio cellule epiteliali, del midollo osseo o di tumori.

L'acido nucleico veicolato a livello nucleare per mezzo di un vettore virale, può rimanere sotto forma di episoma, come elemento genetico autonomo, oppure integrarsi nel genoma cellulare ed essere trasmesso alle cellule figlie; il suo destino dipende dal tipo di virus utilizzato come vettore.

I vettori virali utilizzati possono essere retrovirus e lentivirus, per ottenere l'integrazione del polinucleotide esogeno nel genoma della cellula ospite; oppure adenovirus, virus adenoassociati<sup>29</sup> e herpesvirus che rimangono invece nel nucleo della cellula ospite in forma episomiale.

#### 5.3.1.4. Adeno Associated Virus AAV

Il brevetto EP2931897-B, definisce vantaggioso l'utilizzo di *Adeno Associated Virus*, *AAV*, sono i virus più utilizzati in terapia genica, in quanto, oltre a non essere patogeni per l'uomo, possono infettare sia cellule in divisione che cellule quiescenti. Gli AAV di origine ricombinante non si integrano nel genoma dell'ospite, quindi hanno una bassa probabilità di causare mutazioni. L'unico loro limite è legato alla loro bassa capacità veicolante: sono in grado di trasportare polinucleotidi lunghi al massimo 4,5 -4,75 chilobasi<sup>30</sup>. La proteina nucleasica Cas9 di *Streptococcus pyogenes* è codificata da un polinucleotide lungo 4,1 chilobasi, quindi vicino al limite massimo di capacità del vettore, ciò ne rende difficile l'impacchettamento all'interno di un *AAV*.

Per semplificare l'inserimento del polinucleotide codificante per la proteina Cas9 all'interno del virus adenoassociato sono state utilizzate delle sequenze polinucleotidiche codificanti per proteine Cas9 espresse da altre specie batteriche; per esempio il polinucleotide codificante per la proteina Cas9 di *Staphylococcus aureus*, lungo 3,2 chilobasi. L'elenco dei possibili Cas9 appartenenti a specie batteriche differenti e codificati da un polinucleotide presentante un numero minore di chilobasi è riportato nello stesso brevetto EP2931897-B.

Possono essere selezionati diversi vettori AAV corrispondenti a differenti sierotipi di virus adenoassociati, ognuno dei quali è tessuto-specifico.

Per esempio, il sierotipo AAV4 ha come target il tessuto cardiaco. AAV8 è specifico per guidare l'espressione del polinucleotide nel tessuto epatico.

Inoltre, il polinucleotide codificante per il sistema CRISPR/Cas può essere inserito in un unico vettore virale, contenente la cassetta d'espressione codificante per l'intero complesso; oppure

---

<sup>29</sup> Il virus adeno associato, AAV (*adeno associated virus*) si integra naturalmente in un preciso punto del cromosoma 19. Gli adenovirus ricombinati hanno però una bassa frequenza di integrazione nel genoma della cellula ospite.

<sup>30</sup> Una chilobase è una sequenza di acido nucleico lunga mille paia di basi.

possono essere utilizzati due vettori virali che veicolino disgiuntamente il polinucleotide codificante per la proteina Cas9 e il filamento di RNA guida.

*Tabella 2- Riassunto dei principali metodi di delivery dei componenti del sistema CRISPR-Cas e delle loro caratteristiche*

Delivery Vector/Mode		Delivery into Non-Dividing Cells	Duration of Expression	Genome Integration	Type of Molecule Delivered
Physical (eg, electroporation, particle gun, Calcium Phosphate transfection)		YES	Transient	NO	Nucleic Acids and Proteins
Viral	Retrovirus	NO	Stable	YES	RNA
	Lentivirus	YES	Stable	YES/NO with modifications	RNA
	Adenovirus	YES	Transient	NO	DNA
	Adeno-Associated Virus (AAV)	YES	Stable	NO	DNA
	Vaccinia Virus	YES	Very Transient	NO	DNA
	Herpes Simplex Virus	YES	Stable	NO	DNA
Non-Viral	Cationic Liposomes	YES	Transient	Depends on what is delivered	Nucleic Acids and Proteins
	Polymeric Nanoparticles	YES	Transient	Depends on what is delivered	Nucleic Acids and Proteins

*EP3066201, European Patent Office*

### 5.3.2. INVENZIONI RELATIVE A NUOVI VETTORI DI ESPRESSIONE

L'acido nucleico codificante per il sistema CRISPR-Cas viene introdotto nella cellula ospite per mezzo di vettori di espressione ricombinanti, i quali contengono il costrutto di tutti gli elementi funzionali e strutturali necessari all'espressione della funzione CRISP.

Per esempio, il brevetto EP2877571-B prevede una sequenza di DNA codificante per il sistema CRISPR-Cas, affiancata da siti di ricombinazione e, può essere veicolata da vettori tessuto-specifici. L'inserimento della sequenza nel genoma della cellula ospite, precisamente nel sito genico target, attraverso ricombinazione omologa endogena, dà luogo alla modifica di un gene su un singolo allele.

Il brevetto EP2825654-B rivendica, per promuovere la ricombinazione omologa, l'associazione del vettore ad elementi di regolazione, rappresentati per esempio da promotori delle polimerasi, gli enzimi implicati nell'appaiamento delle basi complementari sul filamento in riparazione.

### 5.3.3. INVENZIONI RELATIVE A COMPONENTI CRISPR MODIFICATI

Il sistema CRISPR-Cas è stato ingegnerizzato per ottimizzarne l'applicazione e sono state brevettate nuove configurazioni dei componenti del complesso, che sono:

- l'RNA guida o crRNA, complementare al DNA target;
- il tracrRNA ibridato con il crRNA;
- la proteina ad attività enzimatica endonucleasica Cas.

Quando il crRNA e il tracrRNA sono fusi a costituire un unico filamento, come rivendica il brevetto EP2800811-B, il filamento di RNA prende il nome di single guide RNA.

Tra i componenti del sistema CRISPR-Cas, sono stati brevettati nuovi RNA guida indirizzati a specifiche sequenze target.

Per esempio, l'EP3066201-B prevede una cellula infettata da due sistemi CRISPR-Cas, presentanti due differenti crRNA: uno diretto al DNA cellulare target, da modificare; l'altro diretto al DNA codificante per la proteina Cas, da disattivare dopo che Cas ha operato la modifica programmata. Nell'EP3066201, il componente brevettato è l'RNA guida complementare al polinucleotide codificante per la proteina Cas9 con cui la cellula è co-infettata. Il complesso è utilizzato per regolare o disattivare l'espressione della proteina Cas9 ed evitare effetti indesiderati dovuti al mancato controllo dell'attività dell'endonucleasi.

In un secondo esempio, nell' EP3241902-B la proteina stessa ad attività enzimatica Cas è stata ingegnerizzata e brevettata. Tra le modifiche apportate all'enzima, vi è la riduzione della sua attività endonucleasica, associata ad elementi che conferiscono allo stesso enzima la possibilità di promuovere o inibire la trascrizione del DNA target, vale a dire la sintesi proteica. Tali attività sono applicabili per la regolazione dell'espressione genica derivata dalla trascrizione e traduzione del DNA target in peptidi, con conseguenze modifica del polipeptide codificato dal DNA target.

Inoltre, con EP3009511-B, è stato brevettato un metodo di *gene editing* che utilizza il complesso CRISPR/Cpf1, nel quale la proteina ad attività nucleasica Cpf1, naturalmente presente nei microorganismi *Prevotella* e *Francisella*, sostituisce la nucleasi Cas.

Anche il complesso CRISPR presentante l'enzima endonucleasico Fok1, ritrovato nel *Flavobacterium okeanokoites*, è stato brevettato in Europa, con l'EP2971041-B.

Il DNA del nuovo enzima può essere: o fuso al dominio catalitico inattivato di una proteina Cas9 (EP2971041-B), oppure associato ad una subunità del complesso proteico *Cascade* (*CRISPR-associated complex for antiviral defense*, costituente del sistema CRISPR di tipo I), a formare una proteina artificiale di fusione, come rivendica l'EP3091072-B.



#### 5.3.4. INVENZIONI RELATIVE A NUOVE ATTIVITÀ DEL SISTEMA

Il complesso CRISPR-Cas è veicolato alla cellula, dove svolge la sua azione di *gene editing* sul filamento di DNA complementare al proprio RNA guida.

L'attività del complesso CRISPR-Cas è stata potenziata, favorendone l'accumulo nel nucleo cellulare (sito dove è presente il DNA target) per mezzo dell'associazione al sistema di domini *NLS*, *Nuclear Localisation Signals*, che promuovono il direzionamento del complesso a livello nucleare. Questa novità è stata introdotta con l'EP2912175-B, assegnato a Toolgen.

Inoltre, al sistema CRISPR/Cas sono state conferite delle ulteriori attività, associandovi dei polipeptidi eterologhi con funzioni differenti, per esempio, come in EP3241902-B, in grado di modulare la trascrizione del DNA cellulare target oppure aventi attività enzimatica in grado di mutare il DNA target, traducendosi in un nuovo peptide codificato dal DNA target.

#### 5.3.5. INVENZIONI DI APPLICAZIONE: GENE EDITING E/O SILENZIAMENTO GENOMICO

In Europa, il sistema CRISPR-Cas è stato protetto per la sua applicazione per interventi di silenziamento o editing genico. Tali applicazioni sono rivendicate nell' EP2764103-B.

Per esempio, il sistema CRISPR-Cas è stato applicato alle cellule eucariotiche di mammifero per operare un silenziamento genico. In particolare il metodo protetto nell' EP3022304-B, applicato per silenziare il gene codificante l'enzima fucosiltransferasi, permette la produzione di anticorpi non fucosilati. Questi anticorpi sono dotati di citotossicità cellulare e il loro silenziamento ne permette l'utilizzo a scopo terapeutico antitumorale.

Il sistema CRISPR-Cas, è stato applicato anche ai vegetali, per la produzione di piante non transgeniche. È protetto dal brevetto EP3008186-B il metodo che prevede l'utilizzo del complesso CRISPR-Cas per operare tagli nel genoma di una pianta, senza inserirvi del materiale genetico esogeno.

Si può produrre una pianta con un tratto modificato, anche utilizzando il complesso CRISPR-Cfp1, come rivendicato nel brevetto EP3009511-B.

#### 5.3.6. BREVETTI EUROPEI CONCESSI SU INVENZIONI IN ALTRI AMBITI TECNICI REALIZZABILI PER MEZZO DI VARIE TECNOLOGIE DI GENE EDITING, TRA CUI IL CRISPR-Cas SYSTEM

Dalla scoperta del sistema di gene editing CRISPR-Cas, e a seguito del suo perfezionamento, il complesso è stato rivendicato in numerose invenzioni non direttamente correlate al sistema

CRISPR-Cas, ma la cui realizzazione prevede uno o più passaggi di ingegneria genetica che richiedono l'utilizzo di enzimi nucleasici.

#### 5.3.6.1. *Vegetali*

Tra questi ricordiamo l'EP2893023-B sull'applicazione del sistema per operare modifiche genomiche di cellule vegetali, mentre l'EP2892321-B ne protegge l'applicazione per il *gene editing* di cellule di soia.

#### 5.3.6.2. *Animali*

Il sistema CRISPR- Cas è tra le tecnologie di *gene editing* utilizzabili per la produzione avicola destinata all'industria alimentare. Nell' EP2839016-B, la tecnologia CRISPR-Cas è citata tra le possibili tecnologie applicabili per conferire ai volatili la resistenza ai virus (in particolare al virus dell'influenza). Il metodo protetto da brevetto prevede l'iniezione di un mix transfettante, comprendente una nucleasi (per esempio Cas) nell'embrione avicolo. Ciò permette l'inserimento, nel genoma delle cellule germinali, di un polinucleotide che consente la riduzione della replicazione virale nelle cellule del volatile.

Tabella 3. Brevetti sul sistema CRISPR-Cas rilasciati in Europa. (Leo L., et al.; 2019)

TIPOLOGIA DI INVENZIONI		BREVETTI RILASCIATI
COMPONENTI del CRISPR-Cas9	CRISPR RNA	1
	gRNA	3
	ENZIMA Cas9	2
	ALTRE NUCLEASI	2
ATTIVITA' del CRISPR-Cas	IDENTIFICARE/ SELEZIONARE ATTIVITA' del COMPLESSO	2
	PROMUOVERE ATTIVITA'	3
	CONFERIRE ALTRE ATTIVITA'	2
VETTORI	CASSETTE DI ESPRESSIONE	5
DELIVERY		2
APPLICAZIONI	GENE EDITING	16
	THERAPY	2
	REGOLAZIONE	1
	TARGETING	2
	CEPPI BATTERICI: CARATTERIZZAZIONE / MODULAZIONE DELLA RESISTENZA	8
	APPLICAZIONE A CEPPI VIRALI	1
INVENZIONI REALIZZABILI UTILIZZANDO VARIE TECNOLOGIE TRA CUI CRISPR	APPLICATE AD ANIMALI	1
	APPLICATE A PIANTE	5
	SCOPO TERAPEUTICO	5

## 5.4. POSSIBILI APPLICAZIONI TERAPEUTICHE DEL CRISPR-Cas SYSTEM

### 5.4.1. APPLICAZIONI TERAPEUTICHE BREVETTATE (i.e. Brevetti già concessi)

Molte applicazioni terapeutiche del sistema CRISPR variamente modificato sono state proposte e brevettate o sono in corso di brevettazione.

Tuttavia, al presente, l'utilizzo del sistema CRISPR-Cas in un metodo di trattamento terapeutico reale su paziente resta una possibilità teorica la cui applicabilità è subordinata ad ulteriori approfondite ricerche scientifiche che ne garantiscano la sicurezza.

Il brevetto EP3126497-B propone l'uso della nucleasi Cas, per trattare l'encefalite virale causata da *Herpes simplex virus*. La proteina enzimatica associata al sistema CRISPR, guidata da un RNA complementare ad una sequenza presente e specificata nel genoma del virus in

questione, opera il taglio del DNA virale, permettendo la neutralizzazione di *Herpes simplex virus*.

Il brevetto EP3116997-B rivendica l'applicazione del sistema CRISPR-Cas per il trattamento di una forma di retinite pigmentosa definita Amaurosi congenita di Leber.

La patologia, che può portare alla cecità nel bambino già nei primi sei mesi di vita, è causata da una mutazione che coinvolge i geni codificanti per proteine della retina, tra i quali il gene CEP209. Il CRISPR è opportunamente ingegnerizzato per legarsi al gene in questione e, veicolato per mezzo di un virus adenoassociato, permette la correzione del gene e il trattamento della patologia.

Inoltre, la tecnologia di gene editing CRISPR-Cas è applicabile per la preparazione di linfociti T utilizzabili in immunoterapia. Come descritto dal brevetto EP3004337-B, tali cellule si ottengono introducendo un frammento genico esogeno oppure una mutazione nel genoma di una cellula T. Per esempio, linfociti T sono modificati in modo da conferire loro un nuovo recettore per un antigene di interesse (virale, batterico o tumorale) definito CAR (*Chimeric Antigen Receptor*)<sup>31</sup> che ne permette l'utilizzo in immunoterapia.

In Europa, tra i brevetti europei che rivendicano invenzioni realizzabili utilizzando le tecnologie di *gene editing* (incluso il sistema CRISPR-Cas) vi è il silenziamento dell'espressione di geni responsabili dello sviluppo di tumori solidi, tra cui il gene NEAT1, il cui silenziamento (vedi EP3102680-B) induce apoptosi selettiva delle cellule cancerogene. È brevettato, in EP3036326-B, anche il silenziamento del gene LINC01212, implicato nello sviluppo del melanoma.

Altri brevetti Europei proteggono delle endonucleasi che permettono l'inserimento nel genoma cellulare di transgeni, allo scopo di trattare malattie monogeniche (come rivendicato in EP3196301-B), o malattie da accumulo lisosomiale, in cui l'integrazione del transgene permette alla cellula di produrre una proteina prima non codificata, come rivendicato nell' EP2872625-B.

---

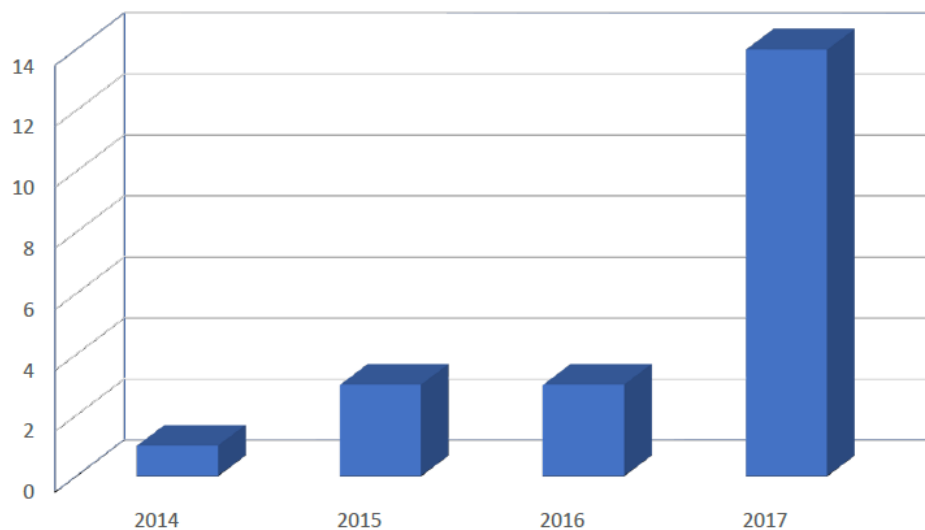
<sup>31</sup> La terapia con CAR-T prevede l'ingegnerizzazione *ex vivo* di cellule T. Si utilizza un vettore che permette l'internalizzazione nel linfocita T (prelevato dal paziente da trattare) di un polinucleotide codificante per l'espressione di una proteina CAR. Quando le cellule T ingegnerizzate vengono inoculate nuovamente nel paziente, sono in grado di riconoscere e attaccare le cellule anomale recanti l'antigene di interesse. L'EMA, Agenzia Europea per i Medicinali, nel 2018 ha approvato la terapia CAR-T per il trattamento di alcune forme resistenti di leucemie.

Sulle reali possibilità di applicazione terapeutica del sistema CRISPR-Cas alle invenzioni brevettate, non si hanno ancora evidenze cliniche rilevanti.

#### 5.4.2. DOMANDE DI BREVETTO EUROPEO CHE APPLICANO IL SISTEMA CRISPR-Cas INGEGNERIZZATO A COMPOSIZIONI O A METODI DI TRATTAMENTO TERAPEUTICO

Le applicazioni terapeutiche del sistema CRISPR-Cas si collocano in un emergente settore di ricerca. Ciò ha consentito il deposito di numerose domande di brevetto, le cui invenzioni sono al momento in corso di brevettazione.

*Grafico 1 Domande di brevetto depositate in Europa su applicazioni terapeutiche del sistema CRISPR-Cas. Il maggior numero di domande di brevetto depositate è riferibile al Broad Institute. (Leo L., et al.; 2019)*



##### *5.4.2.1. DMD (Distrofia muscolare di Duchenne)*

Alcune delle domande depositate in Europa, rivendicano l'utilizzo del complesso CRISPR/Cas in terapia genica per la cura della distrofia muscolare di Duchenne, patologia che si manifesta a causa di una mutazione a carico del gene codificante per la distrofina, proteina che conferisce stabilità alle cellule del tessuto muscolare<sup>32</sup>. La mutazione comporta uno scorrimento del modulo di lettura del polinucleotide, che si riflette in una precoce codifica del codone stop sul filamento trascritto. Ne risulta una proteina strutturalmente tronca e non funzionale.

La domanda EP3452498-A descrive il trattamento della DMD utilizzando il sistema CRISPR-Cas. Il complesso, somministrato intramuscolo o endovena, è stato indirizzato su specifiche

<sup>32</sup> La distrofia muscolare di Duchenne (DMD) è una patologia caratterizzata da miociti mancanti di questa proteina, a causa di una mutazione a carico del gene per essa codificante, collocato sul cromosoma sessuale X.

sequenze target del gene codificante per la distrofina. La proteina Cas, guidata da due distinti RNA guida, taglia il doppio filamento del gene in due siti, situati ad entrambe le estremità dell'esone 51, il quale risulta rimosso dalla sequenza polinucleotidica. Il filamento genico, riparato grazie alla ricombinazione non omologa, riacquisisce il corretto modulo di lettura, codificando per una proteina strutturalmente integra e funzionalmente efficiente.

La domanda di brevetto EP3413908-A, depositata da University of California, rivendica il ripristino del corretto modulo di lettura della sequenza codificante per la distrofina, operando una modifica nel frammento genico compreso tra l'introne 45 e l'introne 55. La modifica prevede il taglio in due punti distinti, grazie a due RNA guida.

Un altro deposito Europeo, EP3332008-A, estende il frammento entro il quale è possibile operare la modifica, per mezzo del sistema CRISPR/Cas, alla sequenza polinucleotidica compresa tra l'esone 45 e il 58, con maggiore preferenza per gli esoni dal 50 al 54.

Sul gene codificante per la distrofina si può operare una mutazione (delezione, inserzione o sostituzione) di uno o più esoni aberranti, associando al complesso anche un *donor template* che piloti la riparazione del filamento complementare, come rivendica la domanda EP3368063-A.

#### 5.4.2.2. VIRUS HIV

Il complesso CRISPR-CAS è rivendicato anche in composizioni per l'applicazione nel trattamento o nella prevenzione di infezioni da retrovirus HIV nei mammiferi.

Il sistema, nella domanda EP3302709-A, viene utilizzato per tagliare il genoma virale in due punti del filamento<sup>33</sup>, permettendo la rimozione delle sequenze interposte tra i 2 tagli. Le due sequenze guida sono complementari: la prima, ad una regione del genoma virale definita LTR<sup>34</sup>, la seconda ad una sequenza target appartenente ad un gene (strutturale o meno) del genoma del virus HIV.

Il complesso di *gene editing* CRISPR-Cas è applicato, in EP3038661-A, anche al trattamento di soggetti portatori di un'infezione latente del virus dell'immunodeficienza umana acquisita.

In questo caso, il CRISPR-Cas viene associato ad un agente antiretrovirale, come un inibitore della trascrittasi inversa<sup>35</sup>. L'acido nucleico codificante per le componenti del sistema CRISPR-Cas è inserito in un vettore virale (lentivirus, adenovirus o AAV), per mezzo del quale viene

---

<sup>33</sup> Il virus HIV è un virus caratterizzato da un genoma a RNA a singolo filamento.

<sup>34</sup> La sequenza LTR del genoma virale è la *Long Terminal Repeat*, presente in più copie nel genoma virale, del quale controlla l'espressione fungendo da promotore, regolando la trascrizione inversa (da RNA a DNA) e la successiva integrazione nel genoma della cellula ospite

<sup>35</sup> Il virus dell'HIV è un retrovirus, cioè necessita dell'enzima trascrittasi inversa per la trascrizione del proprio genoma a RNA in un filamento a DNA, il quale può integrarsi nel genoma della cellula ospite.

veicolato nella cellula. Il vettore è formulato in un opportuno carrier, rappresentato da un colloide polimerico o lipidico (per esempio liposomi, nanoparticelle, micelle co-polimeriche o altri sistemi) che ne permetta l'applicazione topica.

Il trattamento è applicabile anche ai soggetti a rischio quali il personale sanitario e gli operatori di primo soccorso.

La composizione è somministrabile inoltre alle gestanti o alle donne che allattano per ridurre il rischio di trasmissione dell'infezione alla prole.

Il trattamento dell'infezione da HIV secondo la domanda EP3407918-A prevede l'uso di un complesso CRISPR-Cas guidato da almeno due RNA guida differenti, ognuno dei quali complementare ad una distinta sequenza genica inclusa nel genoma del retrovirus HIV. Inoltre la stessa domanda descrive il complesso CRISPR-Cas stabilmente espresso dalla cellula ospite, quindi in grado di operare in qualsiasi momento per tagliare e digerire un frammento di genoma virale complementare ad uno degli RNA guida; in questo modo la cellula ospite è immunizzata nei confronti di nuove infezioni del retrovirus HIV.

#### *5.4.2.3. IMMUNOTERAPIA*

Tra le domande di brevetto che proteggono invenzioni sull'applicazione terapeutica del sistema CRISPR-Cas, EP3429633-A descrive il metodo di ingegnerizzazione delle cellule T ipersensibili a specifici farmaci. Il metodo è applicabile per reprimere la resistenza ai farmaci antitumorali mediata da linfociti T. L'invenzione prevede l'inibizione dell'espressione di almeno un gene per mezzo del taglio operato dall'endonucleasi Cas9. Le cellule-T ingegnerizzate sono ottenute operando l'inattivazione a lungo termine di un gene implicato nel metabolismo, nell'eliminazione o nella detossificazione di uno specifico farmaco.

#### *5.4.2.4. IMMUNODEFICIENZA GRAVE COMBINATA (Serious Combined Immuno Deficiency)*

L'immunodeficienza combinata grave è causata da mutazioni in uno qualsiasi dei possibili geni implicati. Affinché la patologia si manifesti, il gene coinvolto deve essere mutato su entrambi i cromosomi, in quanto la maggior parte delle mutazioni riscontrate nella SCID sono difetti autosomici recessivi.

Una domanda di brevetto europeo, EP3411078-A, prevede il trattamento della malattia utilizzando il sistema CRISPR-Cas. Il metodo protetto consente di ripristinare l'espressione o la funzione della proteina codificata dal gene RAG1.

Il complesso è ingegnerizzato per tagliare il doppio filamento di DNA, operando una mutazione permanente, all'interno del gene RAG1 oppure nei filamenti polinucleotidici prossimali (a monte e a valle) al filamento per esso codificante. Tra le estremità del filamento tagliato è inserito un *donor template* codificante per almeno una porzione del gene RAG1 o un minigene<sup>36</sup> oppure l'intero gene RAG1 normalmente codificante per una proteina funzionale.

#### 5.4.2.5. EMOCROMATOSI EREDITARIA

L'emocromatosi ereditaria è una malattia genetica caratterizzata dal sovraccarico di ferro che si manifesta in presenza di alterazioni a carico del gene HFE.

La domanda di brevetto EP3429632-A protegge il trattamento *ex vivo* della malattia, per il quale è previsto un passaggio di *gene editing* che contempla l'utilizzo del sistema CRISPR-Cas, il quale permette di inserire nelle cellule staminali mesenchimali (prelevate dal paziente e ingegnerizzate<sup>37</sup>) uno o più tagli all'interno o in prossimità del gene HFE. Oppure si può somministrare *in vivo* la nucleasi che taglia il filamento target, associata ad un *donor template* che possa inserirsi nel punto in cui il filamento di DNA della cellula è stato interrotto. Il *donor template* è un polinucleotide comprendente almeno una porzione del gene HFE normalmente funzionale.

#### 5.4.2.6. GENE EDITING DELLE CELLULE EMATOPOIETICHE

Come è stato anticipato in riferimento al brevetto EP3004337-B, le cellule -T ingegnerizzate (CAR-T, cioè *Chimeric Antigen Receptor*) per operare il riconoscimento, il legame e la distruzione delle cellule tumorali, vengono mutate grazie alle tecnologie di *gene editing*. Dette modifiche permettono alla cellula T di esprimere sulla propria superficie uno specifico recettore, in grado di interagire e legarsi con un antigene espresso sulla superficie della cellula tumorale.

Le cellule CAR T sono utilizzate per il trattamento di alcuni tumori del sangue. Tuttavia, non è semplice selezionare un target espresso esclusivamente dalle cellule del sistema emopoietico.

Alcune composizioni CAR T sono ingegnerizzate per selezionare e legare le cellule presentanti gli antigeni CD33 e CD123, espressi dalle cellule tumorali leucemiche. Però, il dominio target CD33 è espresso anche dalle cellule epatiche di Kupffer, mentre l'antigene CD123 è presentato

---

<sup>36</sup> Un minigene contiene le sequenze di controllo e tutte le regioni codificanti affinché la proteina espressa sia strutturalmente e funzionalmente identica a quella espressa dal gene completo presente in natura.

<sup>37</sup> Si produce una cellula staminale pluripotente indotta, indicata con l'acronimo *iPSC* (*induced Pluripotent Stem Cell*).



anche sulla superficie di cellule endoteliali, cellule progenitrici mieloidi<sup>38</sup>, dendritiche, e dai granulociti basofili.

La domanda EP3370741-A descrive l'applicabilità del sistema CRISPR-Cas per proteggere le cellule (sane) del sistema emopoietico (non alterate e naturalmente presentanti l'antigene CD123), dall'azione delle cellule terapeutiche CAR T presentanti il recettore per tale antigene. Al paziente in terapia con cellule CAR T è co-somministrato anche il sistema CRISPR-Cas. L'attività esplicata dal sistema consiste nella riduzione, in cellule sane, dell'espressione dei geni codificanti per entrambi gli antigeni, CD33 e CD123.

L'azione del complesso CRISPR-Cas realizza un gene modificato, codificante per un polipeptide CD33 o CD123, mancante del dominio antigenico corrispondente al target della cellula CAR T.

#### *5.4.2.7. ENDONUCLEASI LEGANTI IL GENE CODIFICANTE PER IL FATTORE VIII DELLA COAGULAZIONE E COMPOSIZIONI PER IL TRATTAMENTO DELL'EMOFILIA.*

Il complesso CRISPR-Cas potrebbe essere utilizzato a scopo terapeutico anche nel trattamento dell'emofilia, malattia genetica ereditaria causata da una mutazione nel gene codificante per il fattore VIII della coagulazione, situato sul cromosoma X.

In alcune forme di emofilia, la mutazione consiste nell'inversione di un *intron* (*Intron* numero 22 o numero 1) all'interno del gene codificante il fattore VIII. L'inversione dell'*intron* è una mutazione in cui si verifica l'inversione dell'orientamento di una regione cromosomica. In Europa è stata depositata la domanda di brevetto EP3243529-A nella quale si richiede la protezione della composizione avente come target alcune specifiche sequenze all'interno dell'introne 22 del suddetto gene.

La composizione così ingegnerizzata, inoculata in cellule staminali pluripotenti indotte (cioè ottenute riprogrammando alcune cellule somatiche dello stesso paziente), è in grado di operare l'inversione dell'introne alterato, permettendo la codifica di una proteina normalmente funzionale.

---

<sup>38</sup> Le cellule mieloidi sono una sottoclasse di cellule staminali emopoietiche. In particolare, le cellule dalla linea mieloide possono differenziarsi in cellule precursori dei macrofagi, granulociti, eritrociti, cellule precursori di trombociti o piastrine e in cellule dendritiche.

#### *5.4.2.8. RETINITE PIGMENTOSA E SINDROME DI USHER (un primo brevetto in fase di concessione ed un secondo brevetto già concesso)*

Una domanda di brevetto europeo prevede il trattamento della sindrome di Usher e della retinite pigmentosa, che si manifesta con sordità associata a perdita progressiva della vista. La causa è riconducibile ad una mutazione nel gene USH2A.

A seguito della somministrazione sottoretinica del complesso CRISPR-Cas, il trattamento prevede il taglio ad opera dell'enzima Cas, guidato da un filamento di RNA guida complementare al gene mutato. Il filamento è riparato grazie ad un *template*, che permette di ricostituire la sequenza più comune in natura. domanda EP3114227-A (Con comunicazione del 10.16.2019, l'EPO ha anticipato l'intenzione di concedere brevetto basato su questa domanda).

#### *5.4.2.9. AMAUROSIS CONGENITA DI LEBER*

Un'altra forma di retinite pigmentosa è l'amaurosi congenita di Leber. Tra i brevetti concessi per il trattamento di questa patologia utilizzando il sistema CRISPR-Cas, vi è il brevetto EP3116997-B, trattato nella sezione 5.4.1.

#### *5.4.2.10. MALATTIE AUTOSOMICHE DOMINANTI*

La domanda di brevetto europeo EP3289080 divulga un metodo per il trattamento delle malattie autosomiche dominanti a carico dell'occhio. Il metodo prevede la somministrazione oculare di un vettore virale ricombinante codificante per un sistema CRISPR-Cas, il quale è diretto ad un gene responsabile dello sviluppo della malattia autosomica dominante; l'RNA guida del complesso si ibridizza con tale gene.

Le rivendicazioni elencano le malattie a carico dell'occhio sensibili a tale trattamento, tra cui la distrofia dei coni, la cecità notturna stazionaria congenita, la retinopatia, le degenerazioni della macula ed altre patologie, con preferenza per la retinite pigmentosa, la degenerazione maculare senile e la distrofia retinica a nido d'ape di Doyne.

Il complesso è associato ad un promotore in grado di modulare, nelle cellule oculari, l'espressione dei prodotti genici codificati dai geni implicati nella manifestazione di malattie autosomiche dominanti a carico dell'occhio. Il sistema può quindi essere applicato ai diversi geni target responsabili delle patologie sopraelencate, in particolare ai geni RHO ed EFEMP1.

#### *5.4.2.11. MALATTIA DI HUNTINGTON*

La Malattia di Huntington è una malattia genetica a carico del sistema nervoso centrale che causa la progressiva degenerazione dei neuroni di alcune aree cerebrali.

È stata depositata in Europa la domanda EP3177726-A che descrive il kit per il trattamento di tale patologia. Il kit comprende un vettore virale, una proteina Cas9, un RNA guida a singolo filamento in grado di riconoscere il gene HTT (la cui mutazione è responsabile della patologia in questione) ed un *template* per la riparazione del filamento tagliato. Il vettore virale utilizzato, è un virus adenoassociato mutato al fine di ottimizzarne l'efficienza e la sicurezza.

#### 5.4.2.12. SINDROME DEL CROMOSOMA X FRAGILE

La sindrome del cromosoma X fragile è una malattia genetica dovuta ad una mutazione del gene FMR1, situato sul cromosoma X. La principale manifestazione clinica della patologia è il ritardo mentale, associato ad un lieve dismorfismo fisico.

In soggetti non affetti da tale sindrome, il numero di sequenze nucleotidiche CGG all'interno del gene è compreso tra 6 e 45. In pazienti portatori della sindrome in questione, la tripletta CGG è invece presente oltre 200 volte sul gene FMR1.

È stata depositata una domanda di brevetto europeo EP3359677 che rivendica l'applicazione del sistema CRISPR- Cas per trattare la patologia associata a tale mutazione. Per mezzo di un vettore virale, è veicolato e introdotto nelle cellule un acido nucleico codificante per Cas9 e per l'RNA guida. Lo scopo è la riduzione delle sequenze CGG, nel gene FMR1, ad un numero inferiore a 44, come si presenta nella forma più diffusa in natura e come riscontrato nei soggetti non affetti dalla sindrome del cromosoma X fragile.

#### 5.4.2.13. GLAUCOMA

Il glaucoma è una patologia neurodegenerativa delle cellule gangliari della retina, cui segue il danno al nervo ottico che porta irreversibilmente alla cecità. Il gene che permette una corretta visione è associato ad alcuni geni che ne possono reprimere l'espressione, tra cui SIX6. La domanda EP3347469-A richiede la protezione brevettuale del metodo di trattamento del glaucoma che consente di ridurre il contributo di SIX6 allo sviluppo della patologia, modificando l'espressione del gene e di conseguenza del suo prodotto proteico, per mezzo di una proteina Cas guidata dal single guide RNA complementare a SIX6. Contemporaneamente, è somministrato un *template* di riparazione per sostituire la porzione del gene digerita dall'enzima Cas.

La composizione ha una formulazione liquida per la somministrazione con un contagocce oculare.

#### 5.4.2.14. MIOPATIE TITINA-DIPENDENTI

La titina è la proteina più abbondante nel muscolo dopo actina e miosina.

Mutazioni del gene TTN, codificante per la titina, sono causa di miopatie, cardiomiopatie (aritmie e disturbi della conduzione) e distrofie muscolari.

La domanda di brevetto EP3377042-A, rivendica l'isolamento di cardiomiociti presentanti una mutazione a carico del gene TTN, la loro modifica con il sistema di gene editing CRISPR-Cas (associato ad un *template* comprendente un frammento della sequenza non mutata del gene TTN) e il successivo reimpianto nel paziente. La tecnica permette la correzione permanente della mutazione e il ripristino dell'attività della titina.

#### 5.4.2.15. SCLEROSI LATERALE AMIOTROFICA e DEGENERAZIONE LOBARE FRONTOTemporALE

La sclerosi laterale amiotrofica, o SLA, è una malattia neurodegenerativa progressiva che interessa i motoneuroni. I sintomi clinici della patologia sono: rigidità muscolare associata a contrazioni e debolezza dovuta alla diminuzione della massa muscolare.

La Degenerazione Lobare Frontotemporale indica invece uno spettro di malattie neurodegenerative.

Entrambe queste situazioni sono associate a mutazioni a carico del gene C9orf72.

La domanda di brevetto Europeo EP3394260-A descrive l'impiego del sistema di gene editing CRISPR-Cas per il ripristino dell'attività della proteina codificata dal gene in oggetto.

Isolando una cellula somatica, preferibilmente un fibroblasto, la si induce alla pluripotenza e la si sottopone al *gene editing* per ripristinare la funzione della proteina tradotta da C9orf72. La cellula così ottenuta è fatta replicare. Segue il reimpianto nello stesso paziente donatore.

#### 5.4.2.16. REGOLAZIONE DELLA TRASCRIZIONE E APPLICAZIONE AL TRATTAMENTO DEL MAL DI SCHIENA

La domanda di brevetto europeo EP3310395-A divulga l'impiego del complesso CRISPR-Cas in una composizione farmaceutica, opportunamente formulata per la somministrazione intervertebrale, al fine di trattare il mal di schiena associato alla degenerazione dei dischi intervertebrali.

Il complesso comprende una proteina Cas9 ottimizzata per l'espressione in cellule eucariotiche e privata della sua attività nucleasica; la Cas9 così ingegnerizzata è fusa ad una proteina in grado di regolare la trascrizione genica, ovvero in grado di modulare l'espressione di un gene target coinvolto nella degenerazione dei dischi intervertebrali.

#### *5.4.2.17. ERADICAZIONE GUIDATA DA RNA DELL'HERPES SIMPLEX DI TIPO I E DI ALTRI HERPESVIRUS*

La domanda EP3244932-A richiede la protezione brevettuale per una composizione utilizzata nel trattamento o nella prevenzione di infezioni da *herpesvirus*.

Tale composizione comprende un sistema CRISPR-Cas in cui l'RNA guida è complementare ad una sequenza target nel genoma virale, mentre la proteina ad attività nucleasica è una variante di Cas9. La nucleasi, oltre ad essere ottimizzata per essere espressa nella cellula umana, può presentare una o più mutazioni rispetto al Cas9 naturale, nonché può essere una proteina ad attività nucleasica CfpI1.

L' *herpesvirus* bersaglio è selezionato tra herpes simplex di tipo I, di tipo 2, herpesvirus umano di tipo 3, virus della varicella zoster, herpesvirus umano di tipo 4, virus di Hepstein-Barr, Cytomegalovirus, herpesvirus associato al sarcoma di Kaposi ed altri herpesvirus.

La sequenza target, in particolare, comprende una sequenza inclusa nel dominio ICPO del genoma virale, il quale codifica per una proteina multifunzionale e regolatrice del ciclo virale.

#### *5.4.2.18. DOLORE NEUROPATICO*

Nella domanda di brevetto europeo EP3204050-A è descritto un polinucleotide per il trattamento del dolore neuropatico, il quale viene somministrato in un vettore non in grado di integrarsi nel genoma cellulare. Il dolore neuropatico è causato da una disfunzione o da una degenerazione del sistema nervoso (centrale o periferico); non è quindi correlato a stimoli nocicettivi meccanici, chimici o termici rilevati dalle terminazioni afferenti.

Il danno nervoso attiva la glia, la quale permette la liberazione a livello spinale di mediatori del dolore che sostengono l'instaurarsi del dolore neuropatico.

Il polinucleotide dell'invenzione comprende un promotore dell'espressione a livello del ganglio trigeminale e del ganglio della radice dorsale. Tale promotore è associato ad un'endonucleasi guidata da un RNA guida, il quale è complementare ad una sequenza polinucleotidica presente sul gene hCSF1 (gene codificante per una proteina che promuove la differenziazione delle cellule staminali emopoietiche in neutrofili). Nello stesso complesso polinucleotidico è incluso un promotore della polimerasi III.

Il polinucleotide diminuisce o annulla l'espressione del gene target, diminuendo l'attivazione della microglia, rappresentante la componente cellulare a funzione immunitaria del sistema nervoso.

Il vettore è somministrato per mezzo di un'iniezione che può essere intratecale, intragangliare (in un singolo ganglio della radice dorsale o in più gangli, oppure nel ganglio trigeminale), intraneurale, sottocutanea (nelle terminazioni nervose periferiche) oppure intraventricolare.



## CAPITOLO 6 - APPLICAZIONI DEL CRISPR: IN AGRICOLTURA

### 6.1. PRODOTTO DEL GENE EDITING

Il sistema CRISPR-Cas è applicabile in agricoltura, settore in cui, l'utilizzo delle tecnologie di *gene editing* per operare delle piccole mutazioni, permette di generare delle specie vegetali più resistenti alle malattie, consentendo l'utilizzo di minori quantità di pesticidi.

Grazie al *gene editing*, nel genoma dell'organismo si può operare il silenziamento di un gene, per spegnimento o delezione dello stesso, oppure uno scorrimento del *reading frame*, ovvero del quadro di lettura del polinucleotide.

Perché si verifichi questa seconda possibilità, è sufficiente la delezione di una singola base (o, più in generale, di un numero di basi che non sia multiplo di 3, in quanto la lettura dei nucleotidi avviene in triplette). Si genera così un *frameshift*: uno scorrimento del modulo di lettura che determina delle triplette sfalsate, modificando la sequenza amminoacidica codificata lungo l'intero filamento.

In entrambi i casi, la mutazione si verifica nell'ambito del corredo genico endogeno all'organismo.

### 6.2. GENOMA TRANSGENICO

Per generare un genoma transgenico, si utilizzano delle tecnologie che permettano di introdurre un intero gene eterologo nel genoma di un organismo. Il prodotto dell'espressione del genoma così mutato, viene classificato come OGM (*Organismo Geneticamente Modificato*).

In Europa, la sentenza della Corte di Giustizia Europea del 25 luglio 2018 (C-528/16) ha equiparato i vegetali ottenuti per mutagenesi con sistemi di *gene editing*, quindi presentanti solo piccole modifiche geniche, a quelli transgenici, nel cui genoma è invece inserito un intero gene eterologo.

Il Giappone, al contrario, ha applicato gli stessi principi del Ministero dell'Agricoltura statunitense, scegliendo di non assoggettare i vegetali *gene edited* alla stessa normativa cui sono sottoposti i vegetali OGM.

Se la tecnologia di *gene editing* CRISPR-Cas possa essere considerata o meno una tecnologia di produzione di transgeni, resta un dibattito ancora aperto. Il sistema viene utilizzato il più delle volte per operare una mutazione, una delezione o un'inserzione a carico di una singola base, ma potenzialmente e opportunamente ingegnerizzato, può veicolare una maggiore quantità di materiale genetico.

### 6.3. OGM IN EUROPA

Il Parlamento Europeo e del Consiglio, con la direttiva 2001/18/CE, nel marzo 2001, ha indicato gli organismi che rientrano nella definizione di OGM e le norme alle quali è sottoposta l'immissione nell'ambiente di tali organismi.<sup>39</sup> La direttiva prevede l'immissione nell'ambiente e la commercializzazione di organismi transgenici esclusivamente previa valutazione del rischio per l'uomo e per l'ambiente; è inoltre richiesto che per ogni prodotto ne sia certificata la tracciabilità, con precisi obblighi su etichettatura e monitoraggio.

La sentenza della Corte di Giustizia Europea del 25 luglio 2018, in riferimento alla causa C-528/16<sup>40</sup>, ha equiparato il *gene editing* al genoma transgenico.

La causa, mossa dalla Confédération Paysanne, era rivolta contro il Ministero dell'Agricoltura francese, il quale rifiutava di abrogare la disposizione nazionale che escludeva dalla definizione di OGM gli organismi derivanti da un processo di mutagenesi. In particolare, il Ministero francese permetteva la coltivazione di piante modificate con *gene editing*, per renderle resistenti all'erbicida VrTH, senza inoculare dei geni derivanti da altre specie.

L'associazione ha fatto ricorso all'azione legale nel 2015, richiedendo il giudizio del Consiglio di Stato francese, il quale, nel 2016, ha rinviato il caso alla Corte di Giustizia Europea. Quest'ultima ha sostenuto che, comportando, entrambe le classi di tecnologie coinvolte, delle mutazioni genetiche, presumibilmente il *gene editing* apporti al genoma gli stessi effetti dell'introduzione di un gene eterologo. Considerare le tecnologie assimilabili, implica il presupporre che entrambe apportino gli stessi rischi; è quindi opportuno che siano sottoposte alla medesima legislazione.

La Corte ha stabilito che le tecniche di *gene editing* siano sottoposte alla normativa sugli OGM, in quanto alterano il materiale genetico di un organismo in un modo che non si verifica in natura<sup>41</sup>.

Tale presa di posizione è stata giustificata ritenendo che il considerevole numero di tecnologie sviluppatesi o perfezionatesi successivamente al 2001, anno della direttiva, parallelamente alla loro innovazione, hanno fatto emergere la necessità di un provvedimento precauzionale, non

---

<sup>39</sup> Parlamento europeo e del Consiglio, *Direttiva 2001/18/CE sull'emissione deliberata nell'ambiente di organismi geneticamente modificati*, <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/IT/TXT/?uri=CELEX%3A32001L0018>

<sup>40</sup> <http://curia.europa.eu/juris/celex.jsf?celex=62016CJ0528&lang1=it&lang2=EN&type=TEXT&ancre=>

<sup>41</sup> Corte di giustizia dell'Unione europea, *Gli organismi ottenuti mediante mutagenesi costituiscono OGM e, in linea di principio, sono soggetti agli obblighi previsti dalla direttiva sugli OGM - Sentenza nella causa C-528/16*, Comunicato Stampa n. 111/18, 25 luglio 2018



essendoci ancora alcuna garanzia di sicurezza per la salute dei consumatori e del rispetto dell'ambiente.

#### 6.3.1. OBBLIGO PER GLI STATI

Ciononostante, nel comunicato stampa del 25 luglio, la Corte rinvia agli Stati Membri il compito di determinare, per gli organismi in oggetto ed in conformità con la legge europea, se tali organismi debbano sottostare agli obblighi della direttiva 2001/18/CE o ad altre leggi.

#### 6.3.2. ESCLUSIONI

La Corte di Giustizia ha ritenuto di escludere dalla decisione le tecnologie di *gene editing* il cui uso è consolidato e delle quali è stato possibile dimostrarne nel tempo, grazie alle numerose applicazioni, la sicurezza dell'utilizzo nella produzione agricola.

Una di queste tecniche implica l'utilizzo dei raggi gamma sulle coltivazioni, seguiti dalla selezione dei soli organismi che, a seguito dell'esposizione, hanno sviluppato delle caratteristiche favorevoli.

Gli esperti del settore si interrogano su come una tecnica che può comportare un enorme numero di mutazioni, possa essere considerata più sicura del *gene editing*.

#### 6.3.3. CONSIDERAZIONI e CONSEGUENZE

Il provvedimento della Corte di Giustizia ignora la sicurezza dei tratti sviluppati nella pianta, regolamentando esclusivamente la tecnica usata per produrla; non considerando quindi che alcune pratiche di agricoltura tradizionale, essendo supportate da processi che portano a mutazioni casuali, potrebbero essere molto più rischiose di una tecnica di *gene editing*, che è modulabile, specifica e precisa.

Non è un approccio scientifico, quello di suddividere le piante in base al processo di produzione; utilizzando diversi processi di produzione, si può infatti produrre lo stesso organismo.

In aggiunta, in molti casi, esaminando un prodotto, è impossibile determinare quale tecnica abbia condotto alla sua produzione.

Dopo che in Europa il *gene editing* è stato equiparato alla creazione di organismi transgenici, anche per l'applicazione del CRISPR all'agricoltura sarà necessario presentare la stessa documentazione richiesta per un OGM, seguita dal lungo processo regolatorio di approvazione cui sono assoggettate le piante transgeniche.

#### 6.4. USA E GIAPPONE, CROPS by CRISPR

Nel febbraio 2019, un report delle autorità giapponesi ha espresso un orientamento opposto a quello europeo, preannunciando la definitiva esclusione dei prodotti modificati con *gene editing* dalla potenziale classificazione come OGM. Anticipava quindi, che sarebbe stata permessa la vendita di alimenti geneticamente modificati, senza richiedere alcuna valutazione di sicurezza, ritenendo sufficiente che tali prodotti avessero soddisfatto determinati criteri.

A tale report ha fatto seguito il commento dell'Unione Giapponese dei Consumatori, che giustificava la propria opposizione alle tecniche di *genome editing* nel settore alimentare sottolineando l'impossibilità di evitare le mutazioni off target, la possibilità di mutazioni ereditabili e infine, dopo la rimozione del gene, la difficoltà nel valutare se la sua influenza persista.

Il Giappone ha confermato di voler seguire il modello statunitense<sup>42</sup>, e con un comunicato finale, ha confermato la decisione: se le tecniche per la produzione di alimenti non implicano l'introduzione di geni o frammenti eterologhi, non sarà richiesto alcun test di sicurezza.

Sarà sufficiente comunicare le informazioni sulla tecnica utilizzata, i geni target e altri dettagli che, nel rispetto della proprietà industriale, verranno resi pubblici o meno.

Ulteriori informazioni potranno essere richieste al produttore, nei casi in cui quelle fornite siano considerate insufficienti. Tali alimenti geneticamente modificati saranno dotati di un'etichetta distintiva.

---

<sup>42</sup> Dal 2016, il Dipartimento dell'Agricoltura degli Stati Uniti non considera i cereali (*crops*), derivati da gene editing, al pari dei transgenici.

## **CONCLUSIONI**

L'Università della California, con sede a Berkeley, è stata la prima a depositare, nel maggio 2012 negli Stati Uniti, una domanda di brevetto prioritaria sull'ingegnerizzazione del sistema CRISPR e la sua applicazione ad una cellula.

UC BERKELEY ha rivendicato il sistema CRISPR in modo generale, applicabile anche alle cellule eucariotiche, ma ha descritto in maniera completa e sufficiente solo l'applicazione su cellule procariotiche.

Tale invenzione, dal 2012, anno della sua realizzazione, ha aperto le porte allo studio di questo sistema nei laboratori di ricerca di tutto il mondo. Ad oggi, sono state depositate migliaia di domande per l'ottenimento di brevetti sul sistema CRISPR.

Questa tecnica, per la sua semplicità d'ingegnerizzazione, si dimostrava promettente rispetto alle complesse tecniche precedenti che utilizzavano la nucleasi TALEN o la nucleasi a *Zn-finger* (o dita di zinco).

Già nel dicembre dello stesso 2012, anno della priorità di Berkeley, Feng Zhang, ricercatore del BROAD INSTITUTE, depositava una propria domanda di brevetto prioritaria rivendicando, con risultati sperimentali, l'applicazione del sistema CRISPR-Cas alle sole cellule eucariotiche. La stessa domanda di brevetto è stata depositata in Europa nel dicembre 2013.

Inoltre il BROAD INSTITUTE richiedeva all'USPTO la procedura d'esame accelerata, che portava alla concessione del corrispondente brevetto nell'aprile 2014.

Dunque, in USA, il primo brevetto sul CRISPR, che ne divulgava l'applicazione sulle cellule eucariotiche, veniva concesso nello stesso anno in cui Doudna (ricercatrice dell'UC Berkeley) aveva pubblicamente dichiarato le proprie incertezze su tale applicazione. Intanto, la sua domanda di brevetto (UC Berkeley), nonostante si riferisse ad una priorità con data precedente a quella del Broad Institute, era ancora in fase d'esame.

A seguito di queste vicende è stato interessante rilevare che una situazione del genere non è inusuale: spesso accade che l'invenzione generica e una sua applicazione specifica siano indipendenti. Pertanto, per quanto riguarda le licenze, chiunque intenda applicare il sistema agli eucarioti, dovrebbe richiederle entrambe.

L'analisi della disputa statunitense dimostra che:

- Affinché un brevetto possa considerarsi completo, tutte le forme di realizzazione dell'invenzione rivendicate dal brevetto stesso devono essere descritte in maniera sufficientemente dettagliata e completa da permettere all'esperto del ramo di realizzarle.

- Dopo il deposito della domanda di brevetto, ogni affermazione degli inventori stessi, pur in buona fede e supportata scientificamente, può ritorcersi o contro la validità del brevetto stesso,

oppure confermare l'inventività di altro inventore.

In Europa il destino del Brevetto BROAD cambia: viene revocato per meri errori burocratici da parte dei richiedenti ovvero in assenza di una completa e regolare cessione dei diritti di priorità.

In Europa, come conseguenza, per quanto riguarda le licenze, chiunque intenda applicare il sistema agli eucarioti dovrebbe richiederle solo ad UC Berkeley.

Emerge da questo lavoro di tesi come, ai fini di un'ottimale gestione dei diritti brevettuali, sia imprescindibile l'attenta valutazione di ogni singolo aspetto burocratico da parte dei *patent attorneys* coinvolti.

Infine, in seguito all'analisi di tantissimi brevetti e/o domande di brevetto, si può affermare che il futuro del CRISPR è orientato alla cura di forme di cancro, malattie neurodegenerative, infezioni virali, malattie geniche ereditarie e disordini immunologici.

Tuttavia l'elevato numero di effetti *off-target* operati dal sistema CRISPR- Cas rappresenta il principale limite nell'applicazione terapeutica di questa tecnologia.

Nel tentativo di superare l'ostacolo, il sistema è stato ulteriormente ottimizzato.

La più recente evoluzione del CRISPR-Cas è la tecnologia denominata *Prime Editing* ("*Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA*" Published online: 21 October 2019 (Nature Vol 576-5 December 2019) che permetterebbe di ridurre drasticamente il numero di effetti off target, consentendo possibili applicazioni terapeutiche.

Al momento nelle banche dati non si rintracciano domande di brevetto relative a questo nuovo sistema.

## BIBLIOGRAFIA

Chang Liu, Li Zhang, Hao Liu, and Kun Cheng. 2018. Delivery Strategies of the CRISPR-Cas9 Gene-Editing System for Therapeutic Applications. *HHS Author Manuscripts*; 266:17–26.

Egelie, K.J., Graff, G.D., Strand, S.P., Johansen, B., *The emerging patent landscape of CRISPR- Cas gene editing technology*, “Nature Biotechnology”, Ottobre 2016 10:1025-1031

Germinario, C., *La Protezione Brevettuale delle Invenzioni nel Settore Biologico*, Seminario Università di Bologna, 9 maggio 2018

Germinario, C., *La Protezione Brevettuale delle Invenzioni nel Settore Medico/Farmaceutico*, Seminario Università di Bologna, 9 maggio 2018

Horii, T., Hatada, I., *Genome engineering using the CRISPR/Cas system*, “World Journal of Medical Genetics”, 2014; 4(3): 69-76

Jiang, F., Doudna, J., *CRISPR-cas9 Structures and Mechanisms*, “Annu. Rev. Biophys”, 2017, 46:505 - 529.

Leo L., Germinario C., Di Giovine P., Bigucci F., Rossi G.M., Bertoli S., D’orazio G., Cini M., Rampinelli P., *Brevettabilità nel settore biotech - CRISPR - il sistema DNA-editing di origine batterica - panoramica dei brevetti europei concessi a seguito della sua ingegnerizzazione*, Dipartimento di Farmacia e Biotecnologie - FaBiT - Università di Bologna; atti di: 59° Simposio AFI Associazione Farmaceutici dell'Industria, Rimini, 5-6-7 giugno 2019 [Contributo in Atti di convegno].

Makarova K.S., Haft D. H., Barrangou R., Brouns S. J. J., Charpentier E., Horvath P., Moineau S., Mojica F. J. M., Wolf Y. I., Yakunin A. F., Van Der Oost J., Koonin E. V., *Evolution and classification of the CRISPR–Cas systems*, Nature Reviews, 2011. 9:467 - 77

Min Y.-L., Bassel-Duby R., Olson E. N., *CRISPR Correction of Duchenne Muscular Dystrophy*. Annual Review of Medicine. 2019. 70:239– 55

Noonan, K., E., *Regents of the University of California v. Broad Institute*, “Patent Docs”, Settembre/ 2018, <https://www.patentdocs.org/2018/09/regents-of-the-university-of-california-v-broad-institute-inc-fed-cir-2018.html>

Normile, D., *Gene-edited foods are safe, Japanese panel concludes*, “Science”, 03/2019

Stokstad, E., *European court ruling raises hurdles for CRISPR crops*, “Science”, luglio 2018

Tasian S. K., *Acute myeloid leukemia chimeric antigen receptor T-cell immunotherapy: how far up the road have we traveled?*, *Therapeutic Advances in Hematology*, 2018; 9(6): 135 – 148.

Wen W.S., Yuan, Z.M., Ma, S.J., Xu, J., Yuan, D.T., *CRISPR-Cas9 systems: versatile cancer modelling platforms and promising therapeutic strategies*, “International Journal of Cancer”, 2016, 138:1328 - 1336

#### BREVETTI CONCESSIONI IN EUROPA

EP2771468 (2015), Zhang F., *Engineering of systems, methods and optimized guide compositions for sequence manipulation*.

EP2931897 (2017), Zhang F, Heidenreich M, Ran F, Swiech M. *Delivery, engineering and optimization of systems, methods and compositions for sequence manipulation and therapeutic applications*.

EP3079726 (2018), Anderson D.G., Dahlman J., Langer R., Platt R.J., Zhang F., *Delivery, use and therapeutic applications of the crispr-cas systems and compositions for targeting disorders and diseases using particle delivery components*

EP3066201 (2018), Borisy A., Davidson B., Mata-Fink J., Palestrant D., Rodriguez E., Zhang F., *CRISPR-related methods and compositions with governing gRNAs*

EP2877571 (2018), Ali H., Bradley A., Lee E.C., *Methods, cells and organisms*

EP2825654 (2017), Bikard D. O., Cong L., Cox D.B.T., Hsu P., Jiang W., Lin S., Marraffini L., Platt R.J., Ran F., Sanjana N.E., Zhang F., *CRISPR-cas component systems, methods and compositions for sequence manipulation*

EP2892321 (2018), Ainley W.M., Guschin D.Y., Miller J., Samuel P., Webb S.R., Zhang L., *FAD2 performance loci and corresponding target site specific binding proteins capable of inducing targeted breaks*

EP2839016 (2018), Tyack S.g., *Cell transfection method*

EP2893023 (2018), Ainley W.M., Cogan N., Forster J., Gupta M., Guschin D.Y., Hayden M., Henry M.J. Miller J.C., Sawbridge T., Spangenberg G., Webb S.R., *FAD2 performance loci and corresponding target site specific binding proteins capable of inducing targeted breaks*

EP3009511 (2016), Abudayyeh O., Gootenberg J., Slaymaker I., Zetsche B., Zhang F., *Novel CRISPR enzymes and systems*

EP3008186 (2018), Voytas, D., Zhang F., Li J., Stoddard T., Luo S., *Methods for non-transgenic genome editing in plants*

EP3022304 (2018), Yu B., Larrick J.W., *Methods and compositions for producing double allele knock outs*

EP3241902 (2018), Charpentier E., Jinek M., Doudna C.J.H., Lim W., Qi L., Chylinski K., Doudna J., *Methods and compositions for RNA-directed target DNA modification and for RNA-directed modulation of transcription*

EP3091072 (2018), Brouns S.J.J., Van Der Oost J., *Modified CASCADE Ribonucleoproteins and uses thereof*

EP2971041 (2018), Joung J.K., Tsai S., *Using RNA-guided foki nucleases (RFNS) to increase specificity for RNA-guided genome editing*

EP2764103 (2015), Zhang F., *CRISPR-cas systems and methods for altering expression of gene products*

EP2800811, (2017), Charpentier E., Doudna C. J., Doudna J., Jinek M., Lim W., Qi L., Chylinski K., *Methods and compositions for RNA-directed target DNA modification and for RNA-directed modulation of transcription*

EP1916903 (2010), Barrangou R., Boyaval P., Fremaux C., Horvath P., Romero D., *Use of CRISPR associated genes (cas)*

EP2489275 (2012), Barrangou R., Boyaval P., Fremaux C., Horvath P., Romero D., *CRISPR escape phage mutants*

EP307972 (2018), Anderson D., Dahlman J., Langer R., Platt R., Zhang F., *Delivery, use and therapeutic applications of the CRISPR-cas systems and compositions for targeting disorders and diseases using particle delivery components*

EP2367938 (2014), Fourcassie P., Fremaux C., Horvath P., Manoury E., *Genetic cluster of strains of streptococcus thermophilus having unique rheological properties for dairy fermentation.*

EP2912175 (2018), Kim J.S., Kim J. M., Kim S., Kim S., Cho S. W., *Composition for cleaving a target DNA comprising a guide RNA specific for the target DNA and cas protein-encoding nucleic acid or cas protein, and use thereof,*

EP2271744 (2013), Chambaud I., Druesne A., Grompone G., Saint D., Smokvina T., Villain A.C., Khlebnikov A., *Novel strain of lactobacillus paracasei subspecies paracasei having antimicrobial and immunomodulatory properties*

EP3116997 (2019), Maeder M.L., Bumcrot D.A., Shen S., *CRISPR/cas-related methods and compositions for treating leber's congenital amaurosis 10 (LCA10)*

EP3126497 (2018), Maeder M.L., Friedland A.E., Welstead G.G., Bumcrot D.A., *CRISPR/CAS-related methods and compositions for treating herpes simplex virus type (HSV1)*



EP3004337 (2017), Duchateau P., Choulika A., Poirot L., *Methods for engineering T cells for immunotherapy by using RNA-guided cas nuclease system*

EP3102680 (2018), Marine J.C., Standaert L., *Inhibition of NEATI for treatment of solid tumors*

EP3036326 (2017), Marine J.C., Leucci E., Vandesompele J., Mestdagh P., *Inhibition of a LNCRNA for treatment of melanoma*

EP3196301 (2018), Rebar E., *Methods and compositions for the treatment of monogenic diseases*

EP2872625 (2016), Rebar E., *Methods and compositions for the treatment of lysosomal storage diseases*

EP3004337 (2017) Duchateau P., Choulika A., Poirot L., *Methods for engineering T cells for immunotherapy by using RNA-guided cas nuclease system*

#### BREVETTI CONCESSI NEGLI STATI UNITI

US8697359 (2014), Zhang F., *CRISPR-Cas systems and methods for altering expression of gene products.*

US10000772 (2018), Doudna J., Jinek M., Charpentier E., Chylinski K., *Methods and compositions for RNA-directed target DNA modification and for RNA-directed modulation of transcription*

#### DOMANDE DI BREVETTO EUROPEO

EP3452498-A, Bumcrot D.A., Huston N.C., Tycko J.C., Robinson-Hamm J., Gersbach C.A., *CRISPR/CAS-related methods and compositions for treating duchenne muscular dystrophy*

EP3413908-A, Pyle A.D., Young C.S., Spencer M.J., *Methods and compositions for modifying a mutant dystrophin gene in a cell's genome*

EP3332008-A, Tremblay J.P., Iyombe-Engembe J.P., Chapdelaine P., *Modification of the dystrophin gene and uses thereof*

EP3368063-A, Kabadi A.M., Cowan C.A., Lundberg A.S., *Materials and methods for treatment of duchenne muscular dystrophy*

EP3302709-A, Khalili K., Hu W., Zhang Y., *Methods and compositions for RNA-guided treatment of HIV infection*

EP3038661-A, Khalili K., Hu W., *Methods and compositions for RNA-guided treatment of HIV infection*

EP3407918-A, Khalili K., Malcolm T., *Methods and compositions for RNA-guided treatment of HIV infection*

EP3429633-A, Valton J., Zennou V., Duchateau P., Poirot L., *A method of engineering drug-specific hypersensitive T-cells for immunotherapy by gene inactivation*

EP3411078-A, Cradick T.J., Cowan C.A., Lundberg A.S., Cost G.J., *Materials and methods for treatment of severe combined immunodeficiency (SCID) or Omenn syndrome*

EP3429632-A, Bogorad R.L., Cowan C.A., Lundberg A.S., *Materials and methods for treatment of hereditary haemochromatosis*

EP3370741-A, Gill S., Kim M., *Methods and compositions for gene editing in hematopoietic stem cells*

EP3243529-A, Kim D.W. Kim J.S., Park C.Y., Kim D.H., Kim J.E., Kweon J.Y., *Endonuclease targeting blood coagulation factor viii gene and composition for treating hemophilia comprising same*

EP3114227-A, Maeder M.L., Bumcrot D-A., *CRISPR/cas-related methods and compositions for treating usher syndrome and retinitis pigmentosa*

EP3289080-A, Wu W.H., Tsai Y.T., Chan L., Tsang S.H., *Gene therapy for autosomal dominant diseases*

EP3177726-A, Deglon N., Merienne N., *Genome editing for the treatment of Huntington's disease*

EP3359677-A, Davidson B.L., Yrigollen C.M., Monteys A., Simpson B., *Compositions and methods for treating fragile X syndrome and related syndromes*

EP3347469-A, Zheng L., Zhu J., Zhao L., Ai M., Li O., Zhang K., *Methods and compositions for the treatment of glaucoma*

EP3377042-A, Rodino K.L., Potter R., *Materials and methods for treatment of titin-based myopathies and other titinopathies*

EP3394260-A, Cowan C.A., Kabadi A.M., Lundberg A.S., *Materials and methods for treatment of amyotrophic lateral sclerosis and/or frontal temporal lobular degeneration*

EP3310395-A, Bowles R.D., Farhang N., Stover J., Setton L., Guilak F., Gersbach C., Brunger J., *RNA-guided transcriptional regulation and methods of using the same for the treatment of back pain*

EP3244932-A, Roehm P.C., Khalili K., Shekarabi S.M., Wollebo H., *RNA guided eradication of herpes simplex type I and other related herpesviruses*

EP3204050-A, Basbaum A., Kuhn J., Guan Z., *Targeted disruption of a CSF1-DAP12 pathway member gene for the treatment of neuropathic pain*

FONTI NORMATIVE

Codice della Proprietà Industriale, DECRETO LEGISLATIVO n. 30, 10 febbraio 2005.

Direttiva 98/44/CE del Parlamento Europeo e del Consiglio, del 6 luglio 1998, *sulla protezione giuridica delle invenzioni biotecnologiche*.

Direttiva 2001/18/CE del Parlamento europeo e del Consiglio sull'emissione deliberata nell'ambiente di organismi geneticamente modificati.

European Patent Convention 2000.

#### ALTRE FONTI UFFICIALI

Consumers Union of Japan, *CUJ Public Comment about Genome Editing Techniques for Food*, Febbraio 2019, <http://www.nishoren.org/en/?p=2045>.

Corte di giustizia dell'Unione europea, *Gli organismi ottenuti mediante mutagenesi costituiscono OGM e, in linea di principio, sono soggetti agli obblighi previsti dalla direttiva sugli OGM - Sentenza nella causa C-528/16*, Comunicato Stampa n. 111/18, 25 luglio 2018.

Regents of the University of California, University of Vienna, E. Charpentier (*Appellants*), V. Broad Institute, Inc., Massachusetts, Institute of technology, President and Fellows of Harvard College (*Appellees*). United States Court of Appeals for the Federal Circuit, *Appel from the United States Patent and Trademark Office*, Patent Trial and Appeal Board in No. 106,048, Settembre 10, 2018.

Visser, D., *“The annotated European Patent Convention”*, (18<sup>th</sup> revised edition) H. Tel, Publisher, 2010.

<http://www.sciencemediacentre.org/expert-reaction-to-court-of-justice-of-the-european-union-ruling-that-gmo-rules-should-cover-plant-genome-editing-techniques/> , *Expert reaction to Court of Justice of the European Union ruling that GMO rules should cover plant genome editing techniques*, Luglio 2018.

#### BANCHE DATI

The Official Journal of the EPO

<https://www.epo.org/law-practice/legal-texts/official-journal.html>

ESPACENET – European Patent Office

<https://worldwide.espacenet.com/>

ORBIT

<https://www.orbit.com/>

The Court of Justice of the European Union, “Case-law”,

[https://curia.europa.eu/jcms/jcms/P\\_106308/en/](https://curia.europa.eu/jcms/jcms/P_106308/en/)

---

## **RINGRAZIAMENTI**

Ringrazio la Prof.ssa Rampinelli, per aver stimolato la mia curiosità nella brevettistica e per avermi seguita durante tutto il mio percorso di preparazione della tesi.

Ringrazio il dott. Claudio Germinario che mi ha dedicato il suo tempo, insegnandomi contenuti avvalorati dalla sua consolidata esperienza nel settore. Grazie per i preziosissimi consigli e per la passione a me trasmessa.

Ringrazio il dott. Paolo Di Giovine, il cui contributo nelle ricerche è stato indispensabile.

Ringrazio tutto il personale della SIB per avermi accolta e supportata.

Grazie al Prof. Perini per la disponibilità e per i suoi chiarimenti.

Ringrazio il Dr. Manzotti e le dottoresse Teresa, Emilia, Enrichetta, Fabia e Mara, per avermi insegnato con passione e con cura la professione e per essere stati la mia famiglia.

---