



(19) REPUBLIKA HRVATSKA
DRŽAVNI ZAVOD ZA
INTELEKTUALNO VLASNIŠTVO

(10) Identifikator
dokumenta:



HR P20200523 T1

HR P20200523 T1

(12) **PRIJEVOD PATENTNIH ZAHTJEVA
EUROPSKOG PATENTA**

(51) MKP:

C12N 15/10 (2006.01)

C12N 15/64 (2006.01)

C12N 15/66 (2006.01)

(46) Datum objave prijevoda patentnih zahtjeva: 07.08.2020.

(21) Broj predmeta: P20200523T

(22) Datum podnošenja zahtjeva: 30.03.2020.

(96) Broj europske prijave patenta: EP 18162656.5
Datum podnošenja europske prijave patenta: 23.06.2015.

(97) Broj objave europske prijave patenta: EP 3354732 A1
Datum objave europske prijave patenta: 01.08.2018.

(97) Broj objave europskog patenta: EP 3354732 B1
Datum objave europskog patenta: 08.01.2020.

(31) Broj prve prijave: 201462015809 P (32) Datum podnošenja prve prijave: 23.06.2014. (33) Država ili organizacija podnošenja prve prijave: US
201462016400 P 24.06.2014. US
201462036983 P 13.08.2014. US

(62) Broj i datum prvobitne prijave u slučaju podjele patenta: 15735807.8 23.06.2015.

(73) Nositelj patenta:

**Regeneron Pharmaceuticals, Inc., 777 Old Saw Mill River Road,
Tarrytown, NY 10591, US**

(72) Izumitelji:

**Chris Schoenherr, c/o Regeneron Pharmaceuticals, Inc., 777 Old Saw
Mill River Road, Tarrytown, NY 10591, US**

**John McWhirter, c/o Regeneron Pharmaceuticals, Inc., 777 Old Saw Mill
River Road, Tarrytown, NY 10591, US**

**Corey Momont, c/o Regeneron Pharmaceuticals, Inc., 777 Old Saw Mill
River Road, Tarrytown, NY 10591, US**

**Lynn MacDonald, c/o Regeneron Pharmaceuticals, Inc., 777 Old Saw Mill
River Road, Tarrytown, NY 10591, US**

**Andrew Murphy, c/o Regeneron Pharmaceuticals, Inc., 777 Old Saw Mill
River Road, Tarrytown, NY 10591, US**

**Gregg Warshaw, c/o Regeneron Pharmaceuticals, Inc., 777 Old Saw Mill
River Road, Tarrytown, NY 10591, US**

**Jose Rojas, c/o Regeneron Pharmaceuticals, Inc., 777 Old Saw Mill River
Road, Tarrytown, NY 10591, US**

Ka-Man Lai, 127 West Main Street, Unit 201, Tarrytown, NY 10591, US

**David Valenzuela, c/o Regeneron Pharmaceuticals, Inc., 777 Old Saw Mill
River Road, Tarrytown, NY 10591, US**

**Caitlin Montagna, c/o Regeneron Pharmaceuticals, Inc., 777 Old Saw Mill
River Road, Tarrytown, NY 10591, US**

(74) Zastupnik:

ZMP IP d.o.o., 10000 Zagreb, HR

(54) Naziv izuma:

SASTAVLJANJE DNK POSREDOVANO NUKLEAZOM

HR P20200523 T1

PATENTNI ZAHTJEVI

1. *In vitro* Postupak bešavnog sastavljanja dviju ili više dvolančanih nukleinskih kiselina, **naznačen time**, što uključuje:
- (a) dovođenje u kontakt prve nukleinske kiseline sa najmanje jednim nukleaznim sredstvom da bi se dobila prva digestirana nukleinska kiselina kojoj je uklonjen završni dio;
- (b) dovođenje u kontakt prve digestirane nukleinske kiseline sa drugom nukleinskom kiselinom, dvolančanim spojnim oligonukleotidom, i egzonukleazom, pri čemu je spojni oligonukleotid predstavljen linearnom dvolančanom DNK od oko 50 bp do oko 400 bp i uključuje:
- (i) prvu komplementarnu sekvencu koja je komplementarna sa prvom digestiranom nukleinskom kiselinom;
- (ii) razdjelnik; i
- (iii) drugu komplementarnu sekvencu koja je komplementarna sa drugom nukleinskom kiselinom gdje razdjelnik uključuje sekvencu identičnu sa završnim dijelom,
- pri čemu između prve komplementarne sekvence i sekvence identične sa završnim dijelom nema nukleinsko-kiselinskih baza, i između druge komplementarne sekvence i sekvence identične sa završnim dijelom nema nukleinsko-kiselinskih baza, i pri čemu egzonukleaza izlaže prvu i drugu komplementarnu sekvencu; i
- (c) sastavljanje spojnog oligonukleotida sa prvom digestiranom nukleinskom kiselinom i drugom nukleinskom kiselinom, pri čemu se sastavljanjem rekonstituiše završni dio.
2. Postupak iz patentnog zahtjeva 1, **naznačen time**, što sastavljanje u koraku (c) uključuje:
- (i) sparivanje prve komplementarne sekvence spojnog oligonukleotida sa prvom digestiranom nukleinskom kiselinom i druge komplementarne sekvence spojnog oligonukleotida sa drugom nukleinskom kiselinom; i
- (ii) povezivanje spojnog oligonukleotida sa prvom digestiranom nukleinskom kiselinom i drugom nukleinskom kiselinom.
3. Postupak iz patentnog zahtjeva 1 ili 2, **naznačen time**, što korak (a) uključuje još i:
- (i) dovođenje u kontakt druge nukleinske kiseline sa drugim nukleaznim sredstvom i egzonukleazom, pri čemu drugo nukleazno sredstvo siječe drugu nukleinsku kiselinu na drugom ciljnom mjestu da se proizvede druga digestirana nukleinska kiselina koja sadrži nukleotidnu sekvencu komplementarnu sa drugom komplementarnom sekvencom spojnog oligonukleotida, pri čemu se prva digestirana nukleinska kiselina sastavlja sa drugom digestiranom nukleinskom kiselinom; ili
- (ii) dovođenje u kontakt druge nukleinske kiseline sa restrikcionim enzimom i egzonukleazom, pri čemu restrikcioni enzim siječe drugu nukleinsku kiselinu da bi se proizvela druga digestirana nukleinska kiselina koja uključuje nukleotidnu sekvencu komplementarnu sa drugom komplementarnom sekvencom u spojnom oligonukleotidu, pri čemu se prva digestirana nukleinska kiselina sastavlja sa drugom digestiranom nukleinskom kiselinom.
4. Postupak iz bilo kojeg od prethodnih patentnih zahtjeva, **naznačen time**, što korak (b) uključuje još i produžavanje 3' kraja prve digestirane nukleinske kiseline.
5. Postupak iz bilo kojeg od prethodnih patentnih zahtjeva, **naznačen time**, što se spojni oligonukleotid sastavlja sa prvom digestiranom nukleinskom kiselinom i drugom nukleinskom kiselinom u istoj reakciji ili sekvencijalno.
6. Postupak iz bilo kojeg od prethodnih patentnih zahtjeva, **naznačen time**, što najmanje jedno nukleazno sredstvo uključuje Cas protein i vodičku RNK (gRNK) (gRNK-Cas ompleks), *zinc finger* nukleazu, ili efektorsku nukleazu sličnu transkripcijskom aktivatoru (TALEN).
7. *In vitro* postupak bešavnog sastavljanja dviju ili više dvolančanih nukleinskih kiselina, **naznačen time**, što uključuje:
- (a) dovođenje u kontakt prve nukleinske kiseline sa prvim nukleaznim sredstvom da bi nastala prva digestirana nukleinska kiselina sa uklonjenim završnim dijelom;
- (b) dovođenje u kontakt druge nukleinske kiseline sa drugim nukleaznim sredstvom da bi nastala druga digestirana nukleinska kiselina;
- (c) dovođenje u kontakt prve digestirane nukleinske kiseline i druge digestirane nukleinske kiseline sa dvolančanim spojnim oligonukleotidom i egzonukleazom, pri čemu je spojni oligonukleotid predstavljen linearnom dvolančanom DNK dugom od oko 50 bp do oko 400 bp i uključuje:
- (i) prvu komplementarnu sekvencu koja je komplementarna sa prvom digestiranom nukleinskom kiselinom;
- (ii) razdjelnik; i
- (iii) drugu komplementarnu sekvencu koja je komplementarna sa drugom digestiranom nukleinskom kiselinom,
- pri čemu razdjelnik uključuje sekvencu koja je identična sa završnim dijelom,
- pri čemu između prve komplementarne sekvence i sekvence koja je identična sa završnim dijelom nema nukleinsko-kiselinskih baza, i između druge komplementarne sekvence i sekvence koja je identična sa završnim dijelom nema nukleinsko-kiselinskih baza, i pri čemu egzonukleaza izlaže prvu i drugu komplementarnu sekvencu; i

(d) sastavljanje spojnog oligonukleotida sa prvom digestiranom nukleinskom kiselinom i drugom digestiranom nukleinskom kiselinom, pri čemu se sastavljanjem rekonstituiše završni dio.

8. Postupak iz patentnog zahtjeva 7, **naznačen time**, što sastavljanje u koraku (d) uključuje:
- 5 (i) sparivanje prve komplementarne sekvence spojnog oligonukleotida sa prvom digestiranom nukleinskom kiselinom i druge komplementarne sekvence spojnog oligonukleotida sa drugom digestiranom nukleinskom kiselinom; i
- (ii) povezivanje spojnog oligonukleotida sa prvom digestiranom nukleinskom kiselinom i drugom digestiranom nukleinskom kiselinom.
9. Postupak iz patentnog zahtjeva 7 ili 8, **naznačen time**, što korak (c) uključuje još i produžavanje 3' kraja prve digestirane nukleinske kiseline i/ili druge digestirane nukleinske kiseline.
10. Postupak iz bilo kojeg od patentnih zahtjeva 7-9, **naznačen time**, što se spojni oligonukleotid sastavlja sa prvom digestiranom nukleinskom kiselinom i drugom digestiranom nukleinskom kiselinom u istoj reakciji ili sekvencijalno.
11. Postupak iz bilo kojeg od patentnih zahtjeva 7-10, **naznačen time**, što prvo nukleazno sredstvo i/ili drugo nukleazno sredstvo uključuje Cas protein i vodičku RNK (gRNK) (gRNK-Cas kompleks), *zinc finger* nukleazu, ili efektorsku nukleazu sličnu transkripcijskom aktivatoru (TALEN).
12. Postupak iz bilo kojeg od prethodnih patentnih zahtjeva, **naznačen time**, što:
- (I) prva komplementarna sekvencija spojnog oligonukleotida ima između 15 i 120 komplementarnih baza i druga komplementarna sekvencija spojnog oligonukleotida ima između 15 i 120 komplementarnih baza; i/ili
- 20 (II) završni dio ima najmanje 20 bp; i/ili
- (III) razdjelnik ima od oko 20 bp do oko 120 bp.
13. Postupak iz bilo kojeg od prethodnih patentnih zahtjeva, **naznačen time**, što:
- (I) prva nukleinska kiselina, druga nukleinska kiselina, ili obje nukleinske kiseline uključuju bakterijski umjetni kromosom; i/ili
- 25 (II) prva nukleinska kiselina, druga nukleinska kiselina, ili obje nukleinske kiseline uključuju humanu DNK, glodavačku DNK, sintetsku DNK, ili njihovu kombinaciju; i/ili
- (III) prva nukleinska kiselina, druga nukleinska kiselina, ili obje nukleinske kiseline imaju najmanje 10 kb; i/ili
- (IV) prva nukleinska kiselina, druga nukleinska kiselina, ili obje nukleinske kiseline imaju najmanje 10 kb, uključuju bakterijski umjetni kromosom, i uključuju humanu DNK, glodavačku DNK, sintetsku DNK, ili njihovu kombinaciju.
- 30 14. Postupak iz bilo kojeg od prethodnih patentnih zahtjeva, **naznačen time**, što se sastavljaju najmanje tri nukleinske kiseline.
15. Postupak iz bilo kojeg od prethodnih patentnih zahtjeva, **naznačen time**, što:
- (I) spojni oligonukleotid ima od oko 100 bp do oko 300 bp; i/ili
- 35 (II) prva komplementarna sekvencija spojnog oligonukleotida ima između 20 i 80 komplementarnih baza i druga komplementarna sekvencija spojnog oligonukleotida ima između 20 i 80 komplementarnih baza.