



(19) REPUBLIKA HRVATSKA
DRŽAVNI ZAVOD ZA
INTELEKTUALNO VLASNIŠTVO



(10) Identifikator
dokumenta:

HR P20171163 T1

HR P20171163 T1

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

(51) MKP:

C12N 15/11 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)
C12N 15/10 (2006.01)
C12N 15/90 (2006.01)

(46) Datum objave prijevoda patentnih zahtjeva: 06.10.2017.

(21) Broj predmeta: P20171163T

(22) Datum podnošenja zahtjeva u HR: 28.07.2017.

(86) Broj međunarodne prijave: PCT/US2013032589
Datum podnošenja međunarodne prijave: 15.03.2013.

(96) Broj europske prijave patenta: EP 13793997.1
Datum podnošenja europske prijave patenta: 15.03.2013.

(87) Broj međunarodne objave: WO 2013176772
Datum međunarodne objave: 28.11.2013.

(97) Broj objave europske prijave patenta: EP 2800811 A1
Datum objave europske prijave patenta: 12.11.2014.

(97) Broj objave europskog patenta: EP 2800811 B1
Datum objave europskog patenta: 10.05.2017.

(31) Broj prve prijave: 201261652086 P (32) Datum podnošenja prve prijave: 25.05.2012. (33) Država ili organizacija podnošenja prve prijave: US
201261716256 P 19.10.2012. US
201361757640 P 28.01.2013. US
201361765576 P 15.02.2013. US

(73) Nositelji patenta:

The Regents of the University of California, 1111 Franklin Street, 12th Floor, 94607 Oakland, CA 94607, US
University of Vienna, Universitätsring 1, 1010 Vienna, AT
Emmanuelle Charpentier, Department Of Regulation in Infection Biology, Max Planck Institute for Infection Biology, Charitéplatz 1, 10117 Berlin, DE

(72) Izumitelji:

Martin Jinek, 1846 Spruce Street, Berkeley, CA 94709, US
James Harrison Doudna Cate, 164 Vicente Road, Berkeley, CA, US
Wendell Lim, 149 Collins Street, San Francisco, CA 94118, US
Lei Qi, 730 Kinkead Way 302, Albany, CA 94706, US
Emmanuelle Charpentier, Department "Regulation in Infection Biology" Helmholtz Centre for Infection Research, Inhoffenstrasse 7, 38124 Braunschweig, DE
Krzysztof Chylinski, Simmeringer Hauptstrasse 45/8, 1110 Vienna, AT
Jennifer A. Doudna, 164 Vicente Road, Berkeley, CA 94705, US
CPZ - CENTAR ZA PATENTE d.o.o., 10000 Zagreb, HR

(74) Zastupnik:

(54) Naziv izuma:

POSTUPCI I SASTAVI ZA RNK-USMJERENU MODIFIKACIJU CILJANE DNK I RNK-USMJERENE MODULACIJE TRANSKRIPCije

HR P20171163 T1

PATENTNI ZAHTJEVI

1. Postupak za modifikaciju ciljane DNK, **naznačen time, da** postupak obuhvaća stavljanje u doticaj ciljane DNK s kompleksom koji sadrži sljedeće:
 - (a) polipeptid Cas9; i
 - (b) RNK jednostruke molekule koja cilja na DNK, te koja obuhvaća sljedeće:
 - (i) segment koji cilja na DNK, te koji obuhvaća nukleotidnu sekvencu koja je komplementarna sekvenci u ciljanoj DNK; i
 - (ii) segment koji veže protein, te koji djeluje zajedno s navedenim polipeptidom Cas9, pri čemu segment koji veže protein, obuhvaća dva komplementarna nukleotidna odsjeka koji hibridiziraju kako bi tvorili RNK dvostruke strukture (dsRNK)-dupleks, gdje su navedena dva komplementarna nukleotidna odsjeka kovalentno vezana putem interventnih nukleotida, gdje se spomenuto stavljanje u doticaj vrši *in vitro* ili u stanici *ex vivo*; i gdje se kod navedene modifikacije radi o cijepanju ciljane DNK.
2. Postupak prema zahtjevu 1, **naznačen time, da** navedena dsRNK-dupleks ima duljinu od osam baznih parova (bp) do 30 bp.
3. Postupak prema zahtjevu 1 ili 2, **naznačen time, da** postotak komplementarnosti između nukleotida koji hibridiziraju za tvorbu dsRNK-dupleks od segmenta koji veže protein, iznosi više od 70%.
4. Postupak prema zahtjevu 1, 2 ili 3, **naznačen time, da** je ciljane DNK prisutna u bakterijskoj stanici, archaea-bakterijskoj stanici, jednostaničnom eukariotskom organizmu, biljnoj stanici, životinjskoj stanici od beskičmenjaka, ili u životinjskoj stanici od kičmenjaka.
5. Postupak prema zahtjevu 1, 2 ili 3, **naznačen time, da** ciljane DNK je kromosomska DNK.
6. Postupak prema bilo kojem od prethodnih zahtjeva, **naznačen time, da** stavljanje u doticaj obuhvaća uvođenje u stanicu: (a) navedenog polipeptida Cas9, ili polinukleotida koji kodira navedeni polipeptid Cas9, i (b) navedene RNK koja cilja na DNK, ili DNK-polinukleotida koji kodira navedenu RNK koja cilja na DNK.
7. Postupak prema zahtjevu 6, **naznačen time, da** postupak dodatno obuhvaća uvođenje u stanicu polinukleotida od darovatelja.
8. Postupak prema bilo kojem od prethodnih zahtjeva, **naznačen time, da** je domena transdukcije proteina kovalentno vezana na amino-završetak od polipeptida Cas9, pri čemu navedena domena transdukcije proteina olakšava poprečni prijelaz polipeptida Cas9, od citosola do unutar organele stanice.
9. Postupak prema bilo kojem od zahtjeva 1 do 7, **naznačen time, da** je domena transdukcije proteina kovalentno vezana na karboksilni završetak od polipeptida Cas9, pri čemu navedena domena transdukcije proteina olakšava poprečni prijelaz polipeptida Cas9, od citosola do unutar organele stanice.
10. Sastav, **naznačen time, da** obuhvaća sljedeće:
 - (a) polipeptid Cas9, ili polinukleotid koji kodira navedeni polipeptid Cas9; i
 - (b) RNK jednostruke molekule koja cilja na DNK, ili DNK-polinukleotid koji kodira navedenu RNK koja cilja na DNK, dok navedena RNK jednostruke molekule koja cilja na DNK, obuhvaća sljedeće:
 - (i) segment koji cilja na DNK, te koji obuhvaća nukleotidnu sekvencu koja je komplementarna sekvenci u ciljanoj DNK; i
 - (ii) segment koji veže protein, te koji djeluje zajedno s navedenim polipeptidom Cas9, pri čemu segment koji veže protein obuhvaća dva komplementarna nukleotidna odsjeka koji hibridiziraju kako bi tvorili RNK dvostruke strukture (dsRNK)-dupleks; te time, da su navedena dva komplementarna nukleotidna odsjeka kovalentno vezana putem interventnih nukleotida.
11. Sastav prema zahtjevu 10, **naznačen time, da** je domena transdukcije proteina kovalentno vezana na amino-završetak od polipeptida Cas9, pri čemu navedena domena transdukcije proteina olakšava poprečni prijelaz polipeptida Cas9, od citosola do unutar organele stanice.
12. Sastav prema zahtjevu 10, **naznačen time, da** je domena transdukcije proteina kovalentno vezana na karboksilni završetak od polipeptida Cas9, pri čemu navedena domena transdukcije proteina olakšava poprečni prijelaz polipeptida Cas9, od citosola do unutar organele stanice.
13. Sastav prema bilo kojem od zahtjeva 10 do 12, **naznačen time, da** se (a) polipeptid Cas9, ili polinukleotid koji kodira navedeni polipeptid Cas9, i (b) RNK jednostruke molekule koja cilja na DNK, ili DNK-polinukleotid koji kodira navedenu RNK koja cilja na DNK, nalaze u stanici *in vitro* ili *ex vivo*, pri čemu stanica nije ljudski zametak.
14. RNK jednostruke molekule koja cilja na DNK, ili DNK-polinukleotid koji kodira navedenu RNK koja cilja na DNK, **naznačen/a time, da** obuhvaća sljedeće:
 - (a) segment koji cilja na DNK, te koji obuhvaća nukleotidnu sekvencu koja je komplementarna ciljanoj sekvenci u ciljanoj DNK; i

(b) segment koji veže protein, te koji djeluje zajedno s proteinom Cas9, pri čemu segment koji veže protein, obuhvaća dva komplementarna nukleotidna odsjeka koji hibridiziraju kako bi stvorili RNK dvostruke strukture (dsRNK)-dupleks, te su pritom navedena dva komplementarna nukleotidna odsjeka kovalentno vezana putem interventnih nukleotida.

- 5 15. Jedna ili više nukleinskih kiselina, **naznačene time, da** obuhvaćaju sljedeće:
- (a) prva nukleotidna sekvenca koja kodira RNK jednostruke molekule koja cilja na DNK, te koja obuhvaća sljedeće:
- (i) segment koji cilja na DNK, te koji obuhvaća nukleotidnu sekvencu koja je komplementarna ciljanoj sekvenci u ciljanoj DNK; i
- 10 (ii) segment koji veže protein, te koji djeluje zajedno s polipeptidom Cas9, pri čemu segment koji veže protein obuhvaća dva komplementarna nukleotidna odsjeka koji hibridiziraju kako bi tvorili RNK dvostruke strukture (dsRNK)-dupleks, te su pritom dva komplementarna nukleotidna odsjeka kovalentno vezana putem interventnih nukleotida;
- pri čemu je prva nukleotidna sekvenca koja kodira navedenu RNK koja cilja na DNK, radno povezana na promotor; i
- 15 opcijski,
- (b) druga nukleotidna sekvenca koja kodira polipeptid Cas9, gdje je nukleotidna sekvenca koja kodira navedeni polipeptid Cas9, radno povezana na promotor.
16. Jedna ili više nukleinskih kiselina prema zahtjevu 15, **naznačene time, da** navedene nukleinske kiseline predstavljaju jednoga ili više rekombinantnih vektora ekspresije.
- 20 17. Jedna ili više nukleinskih kiselina prema zahtjevu 15, **naznačene time, da** jedan ili više rekombinantnih vektora ekspresije predstavljaju jednoga ili više virusnih vektora.
18. Garnitura, **naznačena time, da** obuhvaća sljedeće:
- (a) polipeptid Cas9 ili nukleinska kiselina koja obuhvaća nukleotidnu sekvencu koja kodira polipeptid Cas9; i
- 25 (b) RNK jednostruke molekule koja cilja na DNK, ili nukleinska kiselina koja obuhvaća nukleotidnu sekvencu koja kodira navedenu RNK jednostruke molekule koja cilja na DNK, pri čemu RNK jednostruke molekule koja cilja na DNK, obuhvaća sljedeće:
- (i) segment koji cilja na DNK, te koji obuhvaća nukleotidnu sekvencu koja je komplementarna sa sekvencom u ciljanoj DNK; i
- 30 (ii) segment koji veže protein, te koji djeluje zajedno s navedenim polipeptidom Cas9, gdje segment koji veže protein obuhvaća dva komplementarna nukleotidna odsjeka koji hibridiziraju kako bi tvorili RNK dvostruke strukture (dsRNK)-dupleks, te time, da su navedena dva komplementarna nukleotidna odsjeka kovalentno vezana putem interventnih nukleotida;
- te time, da su (a) i (b) u zajedničkom spremniku ili u odvojenim spremnicima.
- 35 19. Sastav prema bilo kojem od zahtjeva 10 do 13, RNK jednostruke molekule koja cilja na DNK ili polinukleotid koji kodira navedenu RNK jednostruke molekule koja cilja na DNK, prema zahtjevu 14, jedna ili više nukleinskih kiselina prema bilo kojem od zahtjeva 15 do 17, ili garnitura prema zahtjevu 18, **naznačeni time, da** navedena dsRNK-dupleks ima duljinu od osam baznih parova (bp) do 30 bp.
- 40 20. Sastav prema bilo kojem od zahtjeva 10 do 13 ili 19, RNK jednostruke molekule koja cilja na DNK ili polinukleotid koji kodira navedenu RNK jednostruke molekule koja cilja na DNK, prema zahtjevu 14 ili 19, jedna ili više nukleinskih kiselina prema bilo kojem od zahtjeva 15 do 17 ili 19, ili garnitura prema zahtjevu 18 ili 19, **naznačeni time, da** postotak komplementarnosti između nukleotida koji hibridiziraju za tvorbu dsRNK-dupleks od segmenta koji veže protein, iznosi više od 70%.
- 45 21. Sastav prema bilo kojem od zahtjeva 10 do 13, 19 ili 20, RNK jednostruke molekule koja cilja na DNK ili polinukleotid koji kodira navedenu RNK jednostruke molekule koja cilja na DNK, prema zahtjevima 14, 19 ili 20, jedna ili više nukleinskih kiselina prema bilo kojem od zahtjeva 15 do 17 i 19 ili 20, ili garnitura prema zahtjevima 18, 19 ili 20, **naznačeni time, da** je ciljana DNK prisutna u bakterijskoj stanici, archaea-bakterijskoj stanici, jednostaničnom eukariotskom organizmu, biljnoj stanici, životinjskoj stanici od beskičmenjaka, ili u životinjskoj stanici od kičmenjaka.
- 50 22. Sastav prema bilo kojem od zahtjeva 10 do 13, ili 19 do 21, RNK jednostruke molekule koja cilja na DNK ili polinukleotid koji kodira navedenu RNK jednostruke molekule koja cilja na DNK, prema zahtjevima 14 ili 19 do 21,
- jedna ili više nukleinskih kiselina prema bilo kojem od zahtjeva 15 do 17 ili 19 do 21, ili garnitura prema bilo kojem od zahtjeva 18 do 21, **naznačeni time, da** ciljana DNK je kromosomska DNK.
- 55 23. Sastav prema bilo kojem od zahtjeva 10 do 13, ili 19 do 22, RNK jednostruke molekule koja cilja na DNK ili polinukleotid koji kodira navedenu RNK jednostruke molekule koja cilja na DNK, prema zahtjevima 14 ili 19 do 22,
- jedna ili više nukleinskih kiselina prema bilo kojem od zahtjeva 15 do 17 ili 19 do 22, **naznačeni time, da** se upotrebljavaju u postupku terapijske obrade pacijenta.