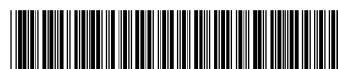




(19) REPUBLIKA HRVATSKA
DRŽAVNI ZAVOD ZA
INTELEKTUALNO VLASNIŠTVO

(10) Identifikator
dokumenta:



HR P20120480 T1

HR P20120480 T1

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

(51) MKP:

C12N 15/09 (2006.01)
C12N 15/00 (2006.01)

(46) Datum objave prijevoda patentnih zahtjeva: 31.07.2012.

(21) Broj predmeta: P20120480T

(22) Datum podnošenja zahtjeva u HR: 08.06.2012.

(86) Broj međunarodne prijave: PCT/EP2006009448
Datum podnošenja međunarodne prijave: 28.09.2006.

(96) Broj europske prijave patenta: EP 06805937.7
Datum podnošenja europske prijave patenta: 28.09.2006.

(87) Broj međunarodne objave: WO 2007036366
Datum međunarodne objave: 05.04.2007.

(97) Broj objave europske prijave patenta: EP 1934345 A2
Datum objave europske prijave patenta: 25.06.2008.

(97) Broj objave europskog patenta: EP 1934345 B1
Datum objave europskog patenta: 21.03.2012.

(31) Broj prve prijave: 102005046490

(32) Datum podnošenja prve prijave:

28.09.2005.

(33) Država ili organizacija podnošenja prve prijave: DE

(73) Nositelj patenta:

(72) Izumitelji:

BioNTech AG, Hölderlingstrasse 8, 55131 Mainz, DE
Ugur Sahin, Philipp-von-Zabern-Platz 1, 55116 Mainz, DE
Silke Holtkamp, Am Buchholz 2, 45470 Mülheim, DE
Özlem Türeci, Philipp-von-Zabern-Platz 1, 55116 Mainz, DE
Sebastian Kreiter, Külbstrasse 16, 55131 Mainz, DE

(74) Zastupnik:

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

(54) Naziv izuma:

**MODIFIKACIJE RNK KOJE POVEĆAVAJU STABILNOST TRANSKRIPCije I EFIKASNOST
TRANSLACIJE**

HR P20120480 T1

PATENTNI ZAHTEJEVI

- 5 1. Molekula nukleinske kiseline koja sadrži u 5'→3' smjeru transkripcije:
 - (a) pokretač,
 - (b) transkriptabilnu sekvencu nukleinske kiseline ili sekvencu nukleinske kiseline za uvođenje transkriptabilne sekvence nukleinske kiseline,
 - (c-1) prvu sekvencu nukleinske kiseline,
 - 10 (c-2) drugu sekvencu nukleinske kiseline i, ukoliko je potrebno,
 - (c-3) najmanje još jednu narednu sekvencu nukleinske kiseline,
 - pri čemu su sekvence nukleinskih kiselina (c-1), (c-2) i, ukoliko je potrebno,
 - (c-3) izabrane iz grupe koja se sastoji od slijedećih:
 - (I) sekvenca nukleinske kiseline koja odgovara 3'-netransliranoj regiji globin gena i
 - 15 (II) sekvenca nukleinske kiseline koja je najmanje 90% identična sa sekvencom nukleinske kiseline pod (I),

pri čemu su sekvence nukleinskih kiselina (c-1), (c-2) i, ukoliko je potrebno, (c-3) nezavisno jedna od druge dobijene od gena koji je izabran iz grupe koja se sastoji od alfa2-globin gena, alfa1-globin gena i beta-globin gena i pri čemu sekvence nukleinskih kiselina (b), (c-1), (c-2) i, ukoliko je potrebno, (c-3) pod kontrolom pokretača (a) mogu biti transkribirane u jedan zajednički transkript, u kojem su sekvence nukleinskih kiselina koje su transkribirane sa sekvenci nukleinskih kiselina (c-1), (c-2) i, ukoliko je potrebno, (c-3) aktivne tako da povećavaju efikasnost translacije i/ili stabilnost sekvence nukleinske kiseline transkribirane sa transkriptabilne sekvence nukleinske kiseline (b).

- 20 2. Molekula nukleinske kiseline prema zahtjevu 1, pri čemu sekvence nukleinskih kiselina (c-1), (c-2) i, ukoliko je potrebno, (c-3) mogu biti identične ili različite.
- 25 3. Molekula nukleinske kiseline prema zahtjevu 1 ili 2, koja dalje sadrži (d) sekvencu nukleinske kiseline koja, pri transkripciji pod kontrolom pokretača (a), kodira nukleotidnu sekvencu od najmanje 20 uzastopnih A nukleotida u transkriptu.
- 30 4. Molekula nukleinske kiseline prema zahtjevu 3, pri čemu sekvence nukleinskih kiselina (b), (c-1), (c-2), ukoliko je potrebno, (c-3), i (d) pod kontrolom pokretača (a) mogu biti transkribirane u jedan zajednički transkript, u kojem su sekvence nukleinskih kiselina transkribirane sa sekvenci nukleinskih kiselina (c-1), (c-2), ukoliko je potrebno, (c-3) i (d) aktivne tako da povećavaju efikasnost translacije i/ili stabilnost sekvence nukleinske kiseline transkribirane sa transkriptabilne sekvence nukleinske kiseline (b).
- 35 5. Molekula nukleinske kiseline prema zahtjevu 3 ili 4, pri čemu sekvenca nukleinske kiseline (d), pri transkripciji pod kontrolom pokretača (a), kodira nukleotidnu sekvencu od najmanje 40 uzastopnih A nukleotida u transkriptu.
- 6. Molekula nukleinske kiseline prema zahtjevu 5, pri čemu sekvenca nukleinske kiseline (d), pri transkripciji pod kontrolom pokretača (a), kodira nukleotidnu sekvencu od najmanje 80 uzastopnih A nukleotida u transkriptu.
- 7. Molekula nukleinske kiseline prema zahtjevu 6, pri čemu sekvenca nukleinske kiseline (d), pri transkripciji pod kontrolom pokretača (a), kodira nukleotidnu sekvencu od najmanje 100 uzastopnih A nukleotida u transkriptu.
- 40 8. Molekula nukleinske kiseline prema zahtjevu 7, pri čemu sekvenca nukleinske kiseline (d), pri transkripciji pod kontrolom pokretača (a), kodira nukleotidnu sekvencu od oko 120 uzastopnih A nukleotida u transkriptu.
- 9. Molekula nukleinske kiseline prema bilo kojem od zahtjeva 3 do 8, **naznačena time**, što se može presjecati, a prvenstveno enzimski ili na drugi biokemijski način, u okviru sekvence nukleinske kiseline (d) tako da spomenuto presjecanje rezultira molekulom nukleinske kiseline koja sadrži, u 5' → 3' smjeru transkripcije, pokretač (a), sekvencu nukleinske kiseline (b), sekvence nukleinskih kiselina (c-1), (c-2), ukoliko je potrebno, (c-3) i najmanje jedan dio sekvence nukleinske kiseline (d), pri čemu najmanje jedan dio sekvence nukleinske kiseline (d), pri transkripciji pod kontrolom pokretača (a), kodira nukleotidnu sekvencu od najmanje 20 uzastopnih A nukleotida u transkriptu i pri čemu transkript kao 3'- terminalni nukleotid sadrži A nukleotid spomenute nukleotidne sekvence od najmanje 20 uzastopnih A nukleotida.
- 45 10. Molekula nukleinske kiseline prema zahtjevu 9, pri čemu spomenuta molekula nukleinske kiseline, poslije presijecanja na kraju lanca koji služi kao matrica za nukleotidnu sekvencu od najmanje 20 uzastopnih A nukleotida, ima T nukleotid koji je dio nukleotidne sekvence koja služi kao matrica za spomenutu nukleotidnu sekvencu od najmanje 20 uzastopnih A nukleotida u transkriptu.
- 11. Molekula nukleinske kiseline prema zahtjevu 9 ili 10, pri čemu najmanje jedan dio sekvence nukleinske kiseline (d), pri transkripciji pod kontrolom pokretača (a), kodira nukleotidnu sekvencu od najmanje 40 uzastopnih A nukleotida u transkriptu.
- 55 12. Molekula nukleinske kiseline prema zahtjevu 11, pri čemu najmanje jedan dio sekvence nukleinske kiseline (d), pri transkripciji pod kontrolom pokretača (a), kodira nukleotidnu sekvencu od najmanje 80 uzastopnih A nukleotida u transkriptu.
- 60 13. Molekula nukleinske kiseline prema zahtjevu 12, pri čemu najmanje jedan dio sekvence nukleinske kiseline (d), pri transkripciji pod kontrolom pokretača (a), kodira nukleotidnu sekvencu od najmanje 100 uzastopnih A nukleotida u transkriptu.

14. Molekula nukleinske kiseline prema zahtjevu 13, pri čemu najmanje jedan dio sekvence nukleinske kiseline (d), pri transkripciji pod kontrolom pokretača (a), kodira nukleotidnu sekvencu od oko 120 uzastopnih A nukleotida u transkriptu.
15. Molekula nukleinske kiseline prema bilo kojem od zahtjeva 9 do 14, **naznačen time** što je zatvorena kružna molekula prije presijecanja i što je linearna molekula poslije presijecanja.
16. Molekula nukleinske kiseline prema bilo kojem od zahtjeva 9 to 15, pri čemu se presijecanje izvodi uz pomoć restriktijskog mjesta presjeka.
17. Molekula nukleinske kiseline prema zahtjevu 16, pri čemu je restriktijsko mjesto presjeka restriktijsko mjesto presjeka za restriktijsku endonukleazu tipa IIS.
18. Molekula nukleinske kiseline prema zahtjevu 17, pri čemu je sekvenca za prepoznavanje restriktijske endonukleaze tipa IIS locirana 5-26 parova baza nizvodno od 3' kraja sekvence nukleinske kiseline (d).
19. Molekula nukleinske kiseline prema zahtjevu 18, pri čemu je sekvenca za prepoznavanje restriktijske endonukleaze tipa IIS locirana 24-26 parova baza nizvodno od 3' kraja sekvence nukleinske kiseline (d).
20. Molekula nukleinske kiseline prema bilo kojem od zahtjeva 1 do 19, pri čemu je beta-globin gen humani betaglobin gen.
21. Molekula nukleinske kiseline prema bilo kojem od zahtjeva 1 do 20, pri čemu transkriptabilna sekvenca nukleinske kiseline sadrži sekvencu nukleinske kiseline za kodiranje peptida ili proteina, a sekvenca nukleinske kiseline za uvođenje transkriptabilne sekvence nukleinske kiseline je višestruko mjesto kloniranja.
22. Molekula nukleinske kiseline prema bilo kojem od zahtjeva 1 do 21, koji dalje sadrži jedan ili više članova koji su izabrani iz grupe koja se sastoji od slijedećih: (i) reporter gen; (ii) selektabilni marker; i (iii) početak replikacije.
23. Molekula nukleinske kiseline prema bilo kojem od zahtjeva 1 do 22, pri čemu molekula nukleinske kiseline ima zatvorenu kružnu konformaciju.
24. Molekula nukleinske kiseline prema bilo kojem od zahtjeva 1 do 23, koji je podesan, a posebno poslije linearizacije, za *in vitro* transkripciju RNK, a posebno iRNK.
25. Molekula nukleinske kiseline koja se može dobiti linearizacijom molekule nukleinske kiseline prema bilo kojem od zahtjeva 1 do 24.
26. RNK koja se može dobiti transkripcijom, a prvenstveno *in vitro* transkripcijom, sa molekulom nukleinske kiseline prema bilo kojem od zahtjeva 1 do 25 pod kontrolom pokretača (a), pri čemu su u RNK transkriptima sekvence nukleinskih kiselina (b), (c-1), (c-2) i, ukoliko je potrebno, (c-3) prisutne u zajedničkom transkriptu.
27. Postupak *in vitro* transkribiranja izabrane RNK molekule sa ciljem da se poveća njena stabilnost i/ili efikasnost translacije, koji sadrži:
 - (i) kupliranje prve sekvence nukleinske kiseline (b-1) na 3' kraju sekvence nukleinske kiseline (a) koja može biti transkribirana da bi dala spomenutu RNK molekulu,
 - (ii) kupliranje druge sekvence nukleinske kiseline (b-2) na 3' kraju spomenute prve sekvence nukleinske kiseline (b-1), i, ukoliko je potrebno,
 - (iii) kupliranje najmanje jedne naredne sekvence nukleinske kiseline (b-3) na 3' kraju spomenute druge sekvence nukleinske kiseline (b-2), pri čemu su sekvence nukleinskih kiselina (b-1), (b-2) i, ukoliko je potrebno, (b-3) izabrane iz grupe koja se sastoji od slijedećih:
 - (I) sekvenca nukleinske kiseline koja odgovara 3'-netransliranoj regiji globin gena i
 - (II) sekvenca nukleinske kiseline koja je najmanje 90% identična sa sekvencom nukleinske kiseline pod (I),

pri čemu su sekvence nukleinskih kiselina (b-1), (b-2) i, ukoliko je potrebno, (b-3) nezavisno jedna od druge dobijene od gena izabranog iz grupe koja se sastoji od alfa2-globin gena, alfa1-globin gena i beta-globin gena i (iv) transkribiranje *in vitro* dobijene nukleinske kiseline,

pri čemu sekvence nukleinskih kiselina (a), (b-1), (b-2) i, ukoliko je potrebno, (b-3) mogu biti transkribirane u jedan zajednički transkript, u kojem su sekvence nukleinskih kiselina transkribirane sa sekvenci nukleinskih kiselina (b-1), (b-2) i, ukoliko je potrebno, (b-3) aktivne tako da povećavaju efikasnost translacije i/ili stabilnost sekvence nukleinske kiseline transkribirane sa transkriptabilne sekvence nukleinske kiseline (a).

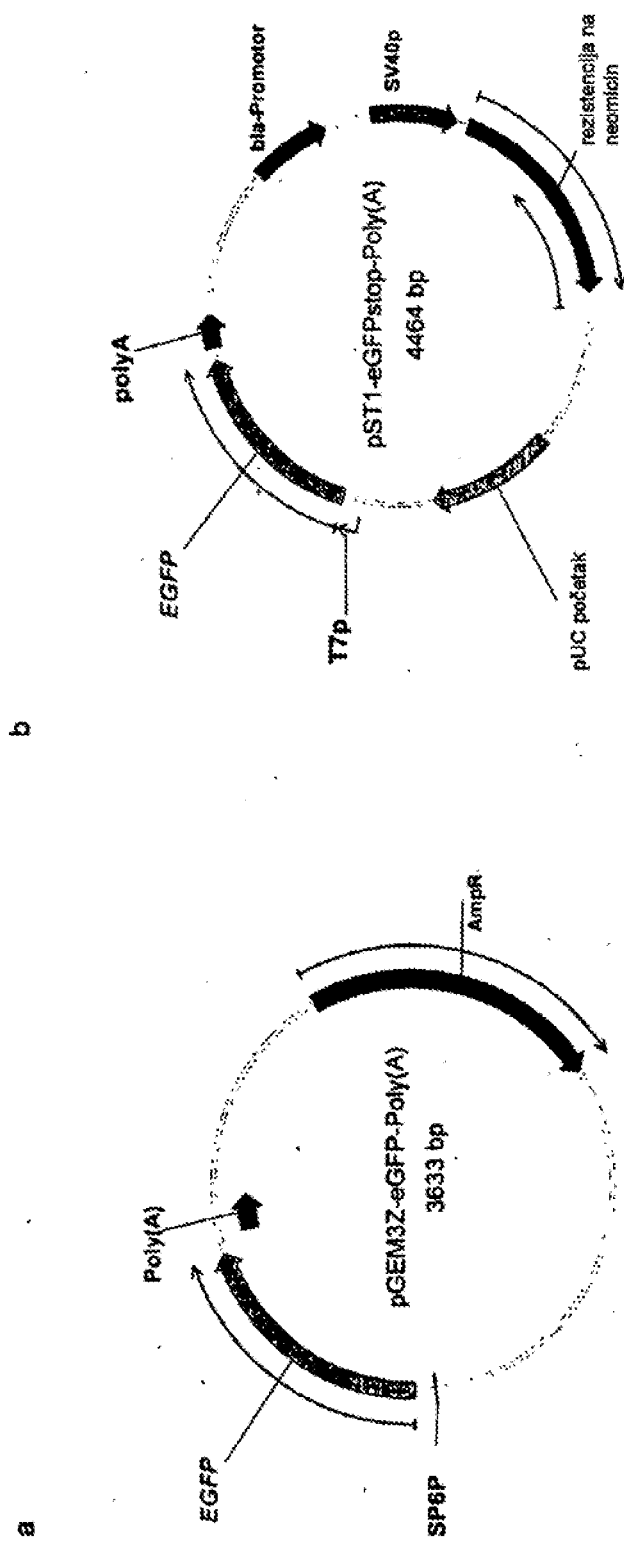
- 28. Postupak translacije izabrane iRNK molekule sa ciljem povećanja njezine ekspresije, koji sadrži:
 - (i) kupliranje prve sekvence nukleinske kiseline (b-1) na 3' kraju sekvence nukleinske kiseline (a) koja može biti transkribirana da se dobije spomenuti iRNK molekule,
 - (ii) kupliranje druge sekvence nukleinske kiseline (b-2) na 3' kraju spomenute prve sekvence nukleinske kiseline (b-1), i, ukoliko je potrebno,
 - (iii) kupliranje najmanje jedne naredne sekvence nukleinske kiseline (b-3) na 3' kraju spomenute druge sekvence nukleinske kiseline (b-2),

pri čemu su sekvence nukleinskih kiselina (b-1), (b-2) i, ukoliko je potrebno, (b-3) izabrane iz grupe koja se sastoji od slijedećih:

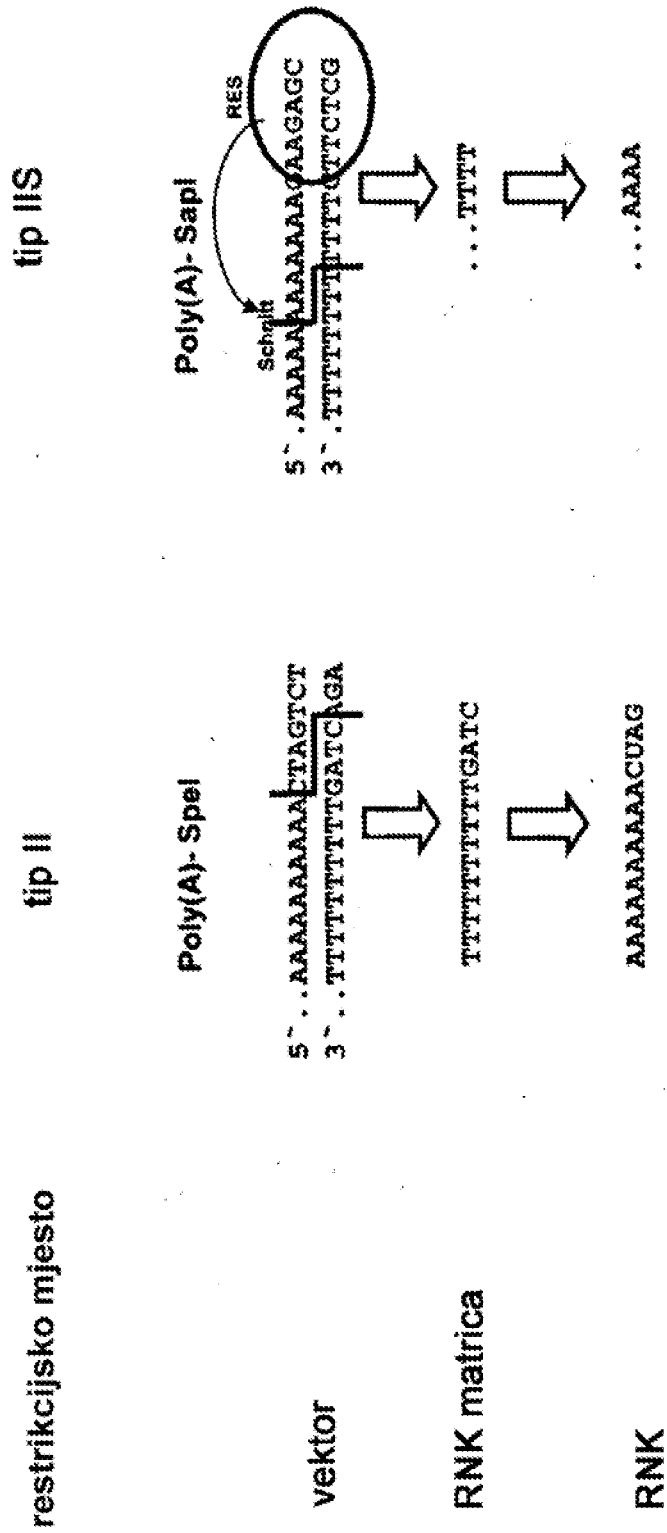
 - (I) sekvenca nukleinske kiseline koja odgovara 3'-netransliranoj regiji globin gena i
 - (II) sekvenca nukleinske kiseline koja je najmanje 90% identična sekvenci nukleinske kiseline pod (I),

pri čemu su sekvence nukleinskih kiselina (b-1), (b-2) i, ukoliko je potrebno, (b-3) nezavisno jedna od druge izvedene od gena izabranog iz grupe koja se sastoji od alfa2-globin gena, alfa1-globin gena i beta-globin gena i (iv) translacije iRNK koja se može realizirati transkribiranjem dobijene nukleinske kiseline,

- 5 pri čemu sekvence nukleinskih kiselina (a), (b-1), (b-2) i, ukoliko je potrebno, (b-3) mogu biti transkribirane u jedan zajednički transkript, u kojem su sekvence nukleinskih kiselina transkribirane sa sekvenci nukleinskih kiselina (b-1), (b-2) i, ukoliko je potrebno, (b-3) aktivne tako da povećavaju efikasnost translacije i/ili stabilnost sekvence nukleinske kiseline transkribirane sa transkriptabilne sekvence nukleinske kiseline (a).
29. Postupak prema zahtjevu 28, pri čemu se transkripcija izvodi *in vitro*.
- 10 30. Postupak prema bilo kojem od zahtjeva 27 do 29, koji dalje sadrži kupliranje sekvence nukleinske kiseline (c) koja, kada je transkribirana, kodira nukleotidnu sekvencu od najmanje 20 uzastopnih A nukleotida, na 3' kraju sekvence nukleinske kiseline (b-2) ili, ukoliko je potrebno, sekvence nukleinske kiseline (b-3).
31. Postupak prema zahtjevu 30, pri čemu sekvence nukleinskih kiselina (a), (b-1), (b-2) i, ukoliko je potrebno, (b-3), i (c) mogu biti transkribirane u jedan zajednički transkript, u kojem su sekvence nukleinskih kiselina transkribirane sa sekvenci nukleinskih kiselina (b-1), (b-2), ukoliko je potrebno, (b-3) i (c) aktivne tako da povećavaju efikasnost translacije i/ili stabilnost sekvence nukleinske kiseline transkribirane sa sekvence nukleinske kiseline (a).
- 15 32. Postupak prema zahtjevu 30 ili 31, **naznačen time** što dalje sadrži, prije transkripcije dobijene nukleinske kiseline, presjecanje u okviru sekvence nukleinske kiseline (c) tako da transkripcija nukleinske kiseline koja je dobijena na ovaj način generira transkript koji ima sekvence nukleinskih kiselina transkribirane sa sekvenci nukleinskih kiselina (a), (b-1), (b-2) i, ukoliko je potrebno, (b-3) i na svom 3'-kraju sadrži nukleotidnu sekvencu od najmanje 20 uzastopnih A nukleotida, pri čemu transkript kao 3'-terminalni nukleotid sadrži A nukleotid pomenute nukleotidne sekvence od najmanje 20 uzastopnih A nukleotida.
- 20 33. Postupak prema bilo kojem od zahtjeva 27 to 32, pri čemu je beta-globin gen humani beta-globin gen.
34. Postupak prema zahtjevu 32, pri čemu se presjecanje izvodi uz pomoć restrikcijskog mjesta presjeka.
- 25 35. Postupak prema zahtjevu 34, pri čemu je restrikcijsko mjesto presjeka restrikcijsko mjesto presjeka za restrikcijsku endonukleazu tipa IIS.
36. Postupak prema zahtjevu 35, pri čemu je sekvenca za prepoznavanje restrikcijske endonukleaze tipa IIS locirana 5-26 parova baza nizvodno od 3' kraja sekvence nukleinske kiseline koja, pri transkripciji, kodira nukleotidnu sekvencu od najmanje 20 uzastopnih A nukleotida.
- 30 37. Postupak prema zahtjevu 36, pri čemu je sekvenca za prepoznavanje restrikcijske endonukleaze tipa IIS locirana 24-26 parova baza nizvodno od 3' kraja sekvence nukleinske kiseline koja, pri transkripciji, kodira nukleotidnu sekvencu od najmanje 20 uzastopnih A nukleotida.
38. RNK koja se može dobiti postupkom transkripcije *in vitro* izabrane RNK molekule prema bilo kojem od zahtjeva 27 i 30-37, pri čemu su RNK transkripti sekvenci nukleinskih kiselina (a), (b-1), (b-2) i, ukoliko je potrebno, (b-3) prisutni u zajedničkom transkriptu.
- 35 39. Primjena RNK prema zahtjevu 26 ili 38 za transfektiranje stanice domaćina.
40. Primjena prema zahtjevu 39, pri čemu je stanica domaćin stanica koja prezentira antigen, a posebno dentritska stanica, monocit ili makrofag.



Slika 1.

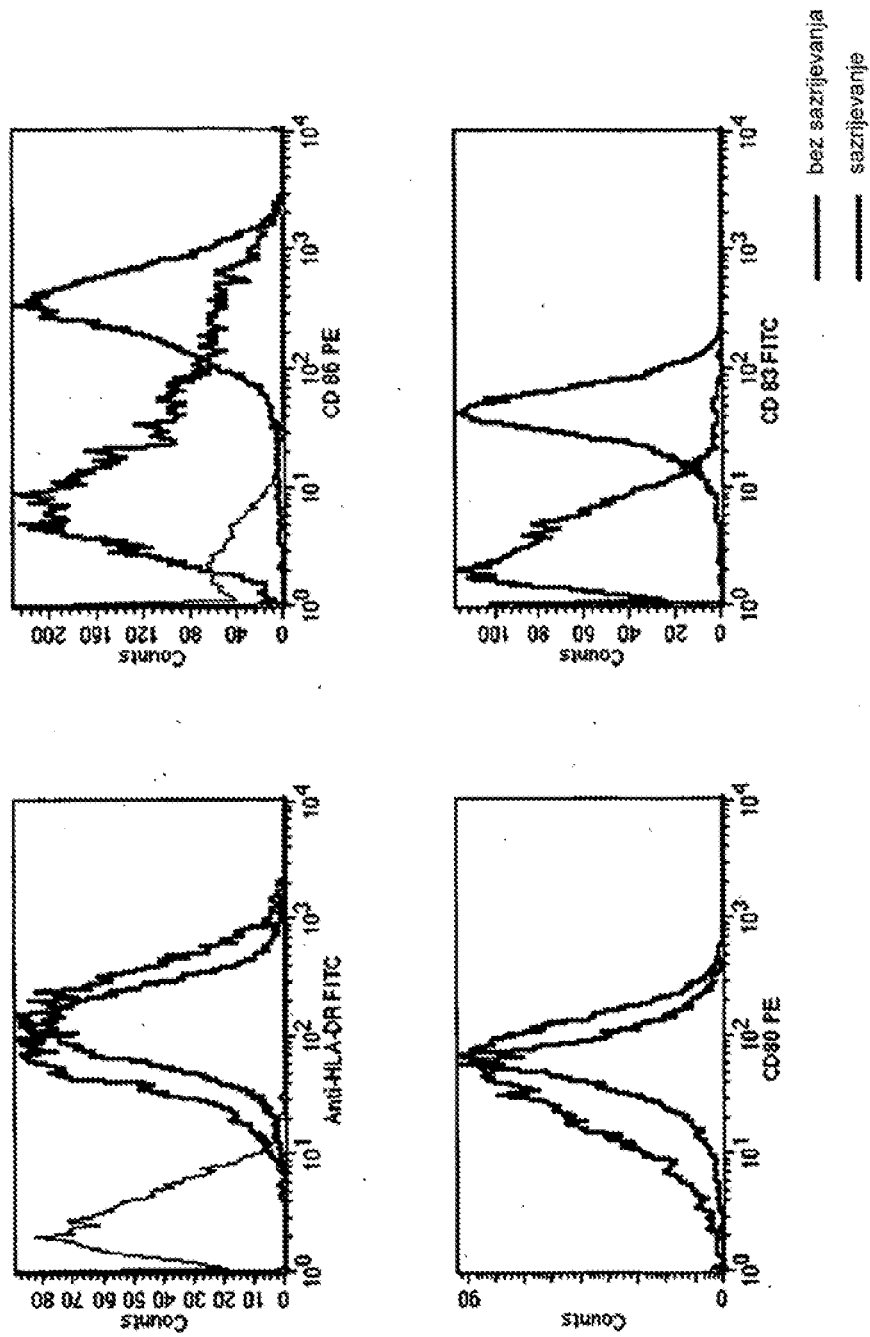


Slika 2.

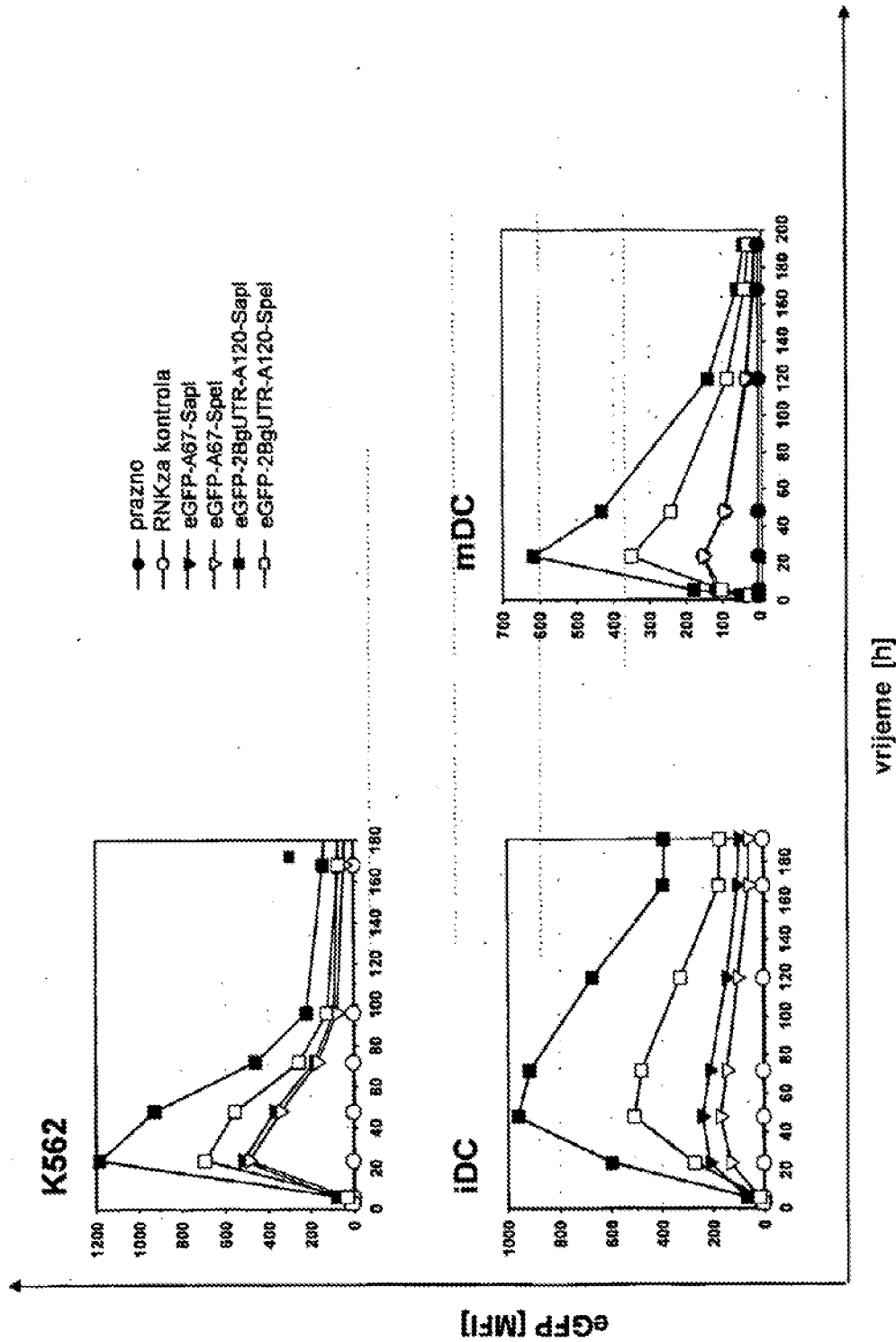
konstruktiv vektora

	IVT vektor	IRNK transkripti
a	pST1-eGFP-2BgUTR-A120-SapI	Cap eGFP 3'Bg 3'Bg A(120)3'
	pST1-eGFP-2BgUTR-A120-SpeI	Cap eGFP 3'Bg 3'Bg A(120)CTAGT3'
	pST1-eGFP-A67-SapI	Cap eGFP A(67)3'
	pST1-eGFP-A67-SpeI	Cap eGFP A(67)CTAGT3'
b	pST1-eGFP-2BgUTR-A0-SapI	Cap eGFP 3'Bg 3'Bg
	pST1-eGFP-2BgUTR-A16-SapI	Cap eGFP 3'Bg 3'Bg A(16)3'
	pST1-eGFP-2BgUTR-A42-SapI	Cap eGFP 3'Bg 3'Bg A(42)3'
	pST1-eGFP-2BgUTR-A51-SapI	Cap eGFP 3'Bg 3'Bg A(51)3'
	pST1-eGFP-2BgUTR-A120-SapI	Cap eGFP 3'Bg 3'Bg A(120)3'

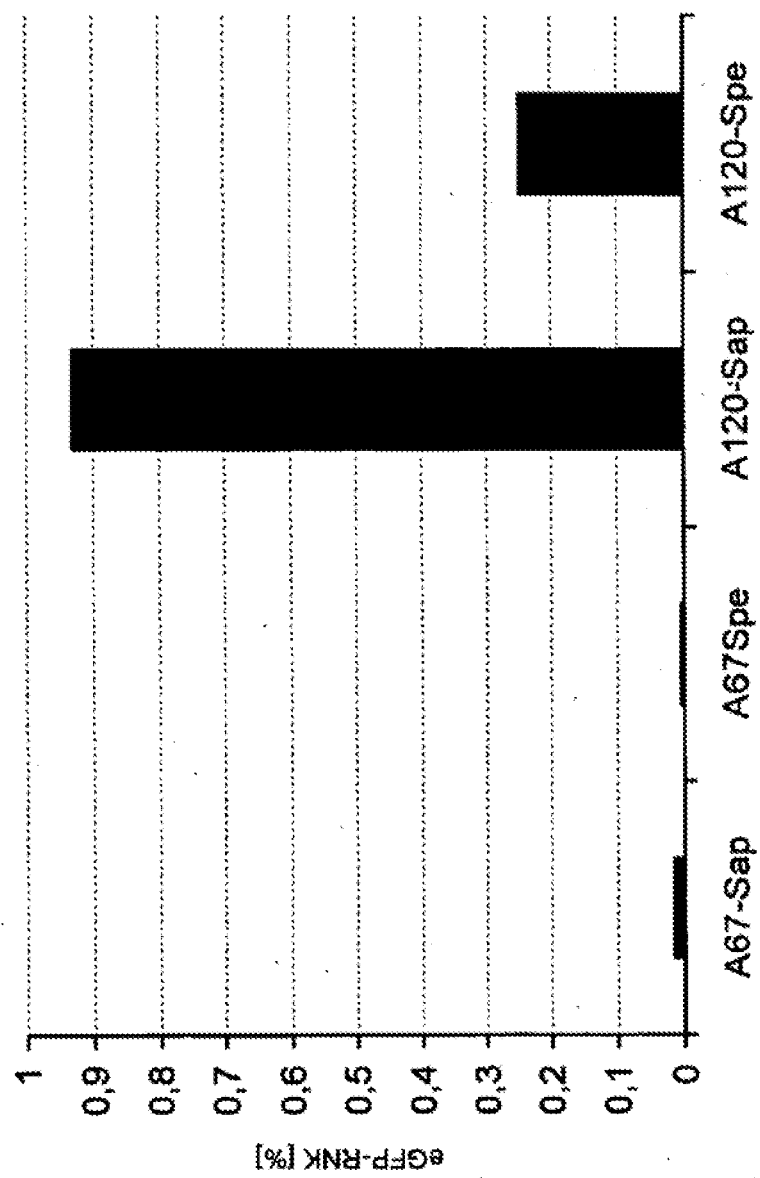
Slika 3.



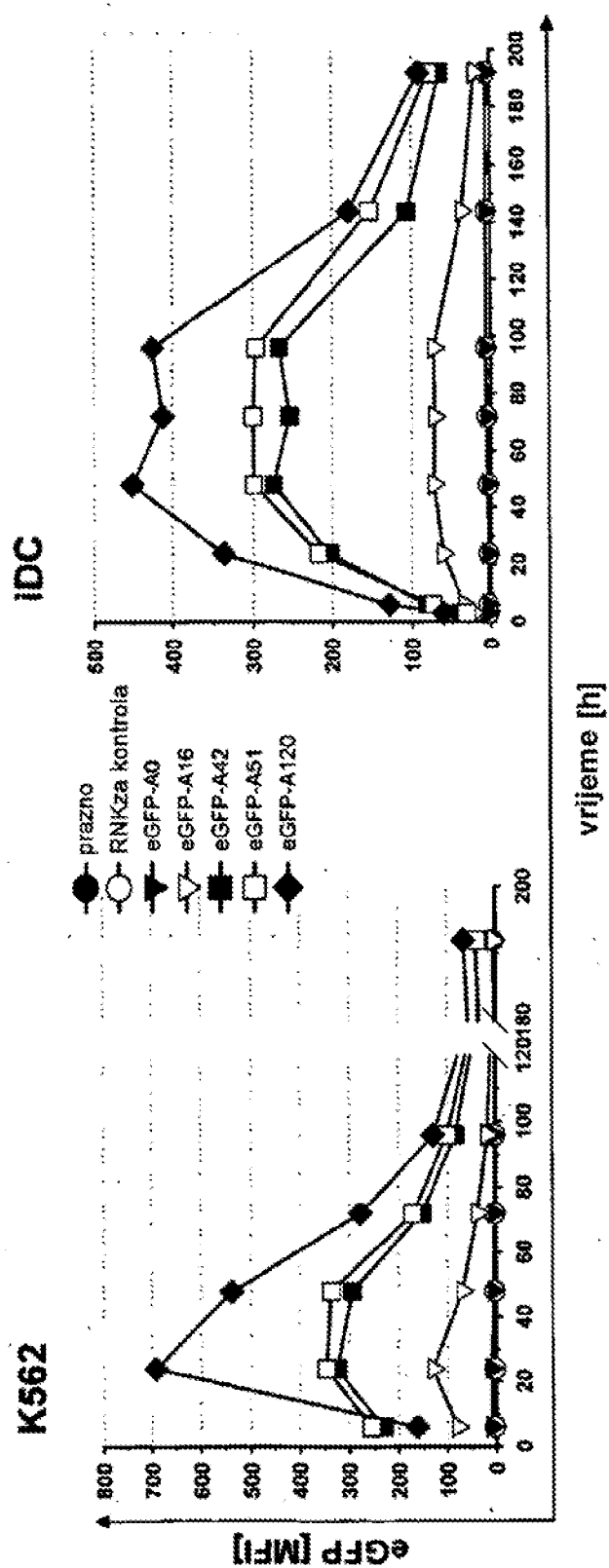
Slika 4.



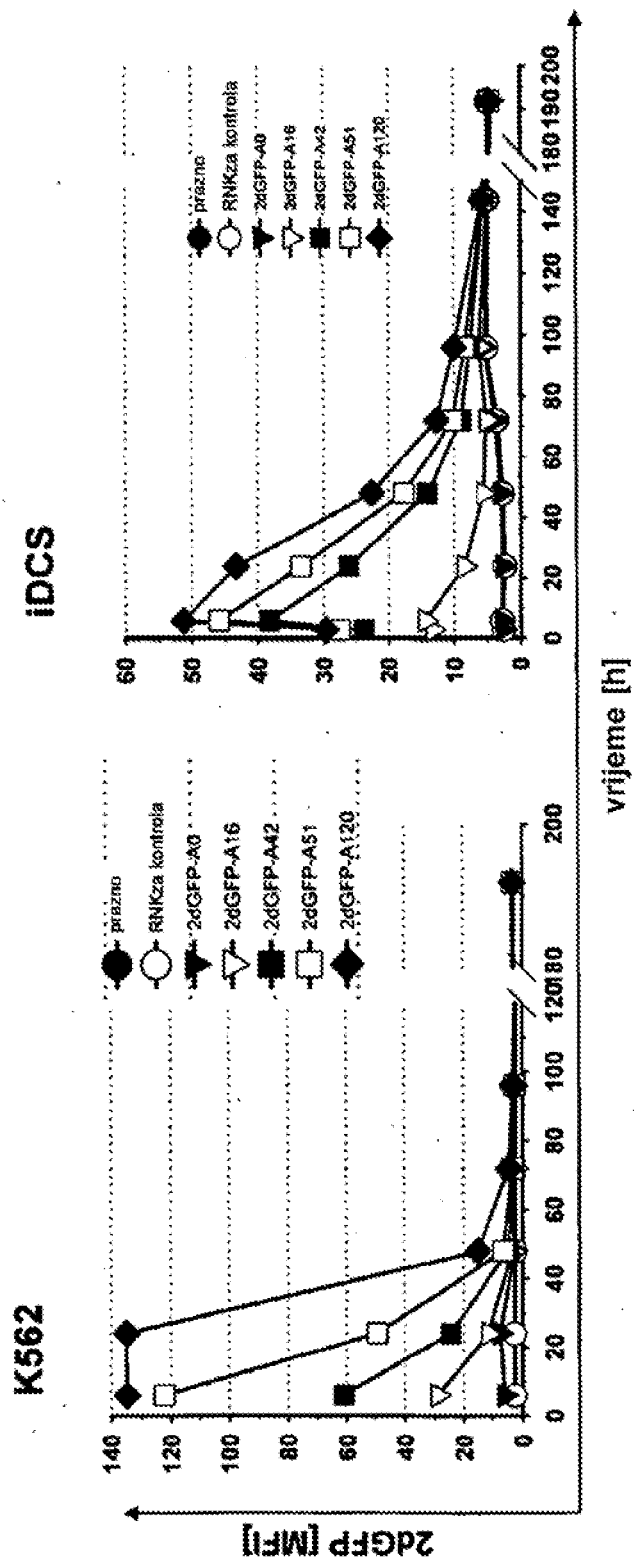
Slika 5.(a)



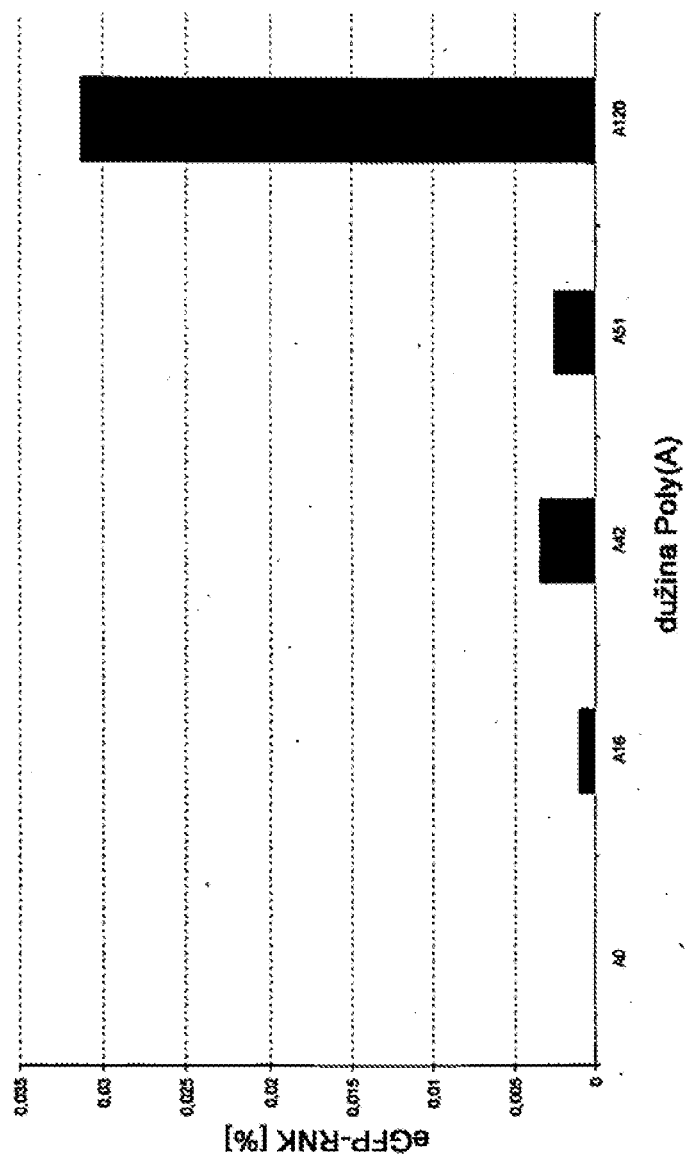
Slika 5.(b)



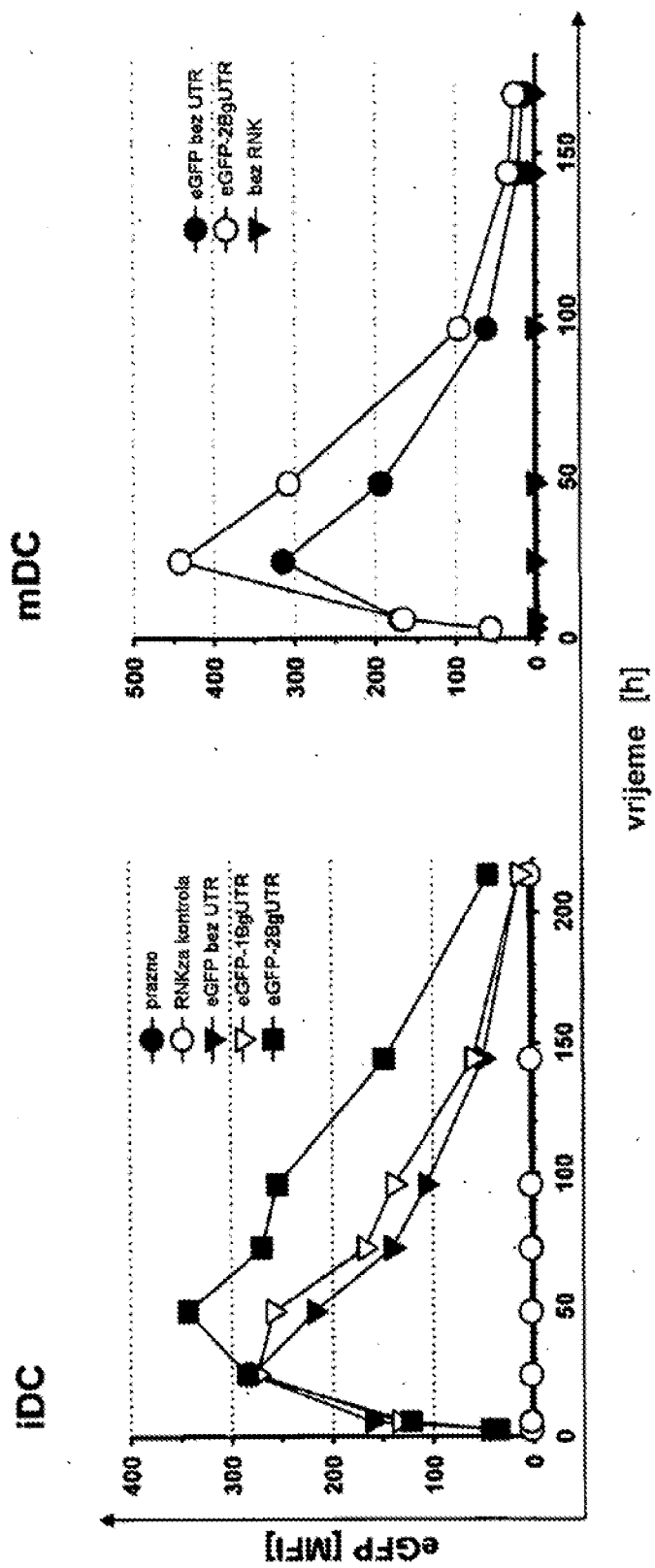
Slika 6.(a)



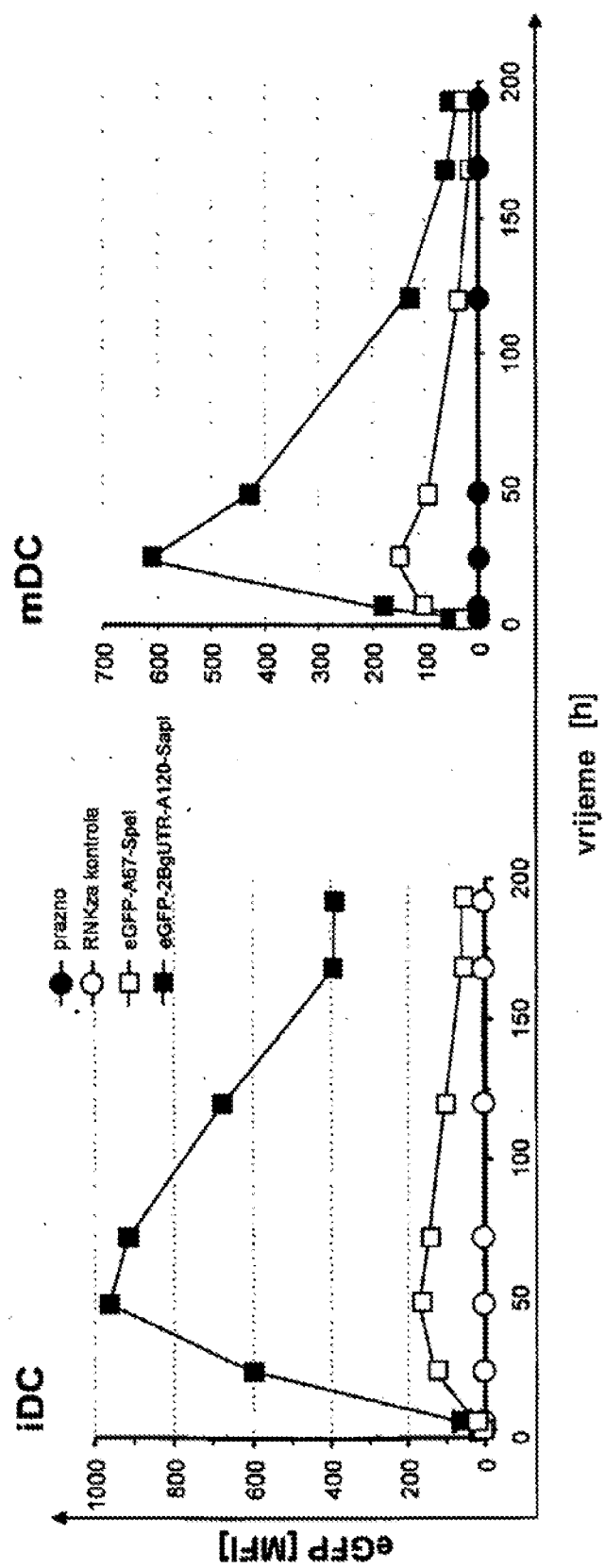
Slika 6.(b)



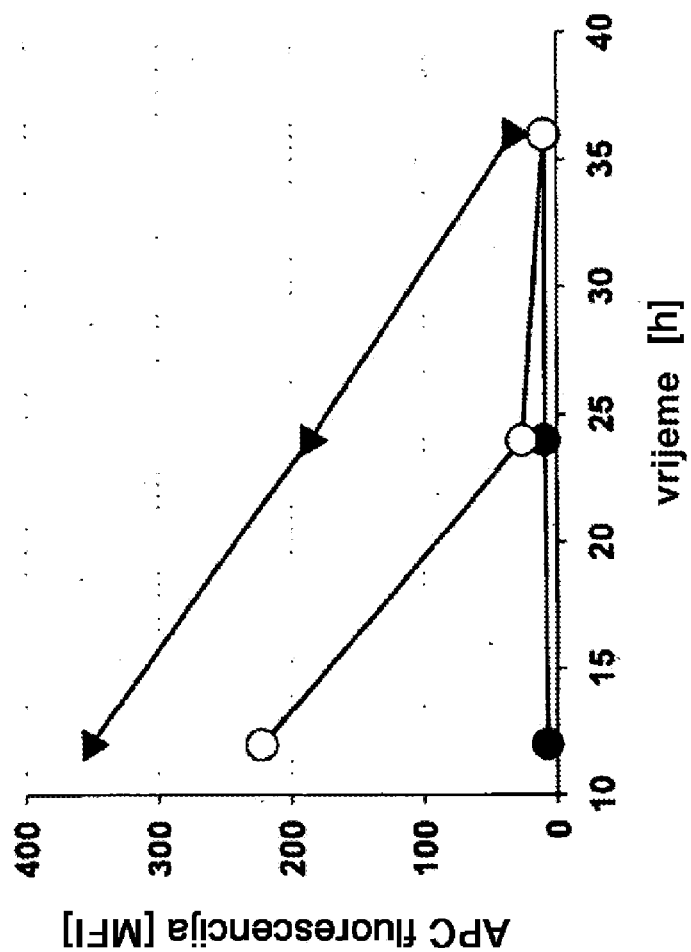
Slika 6.(c)



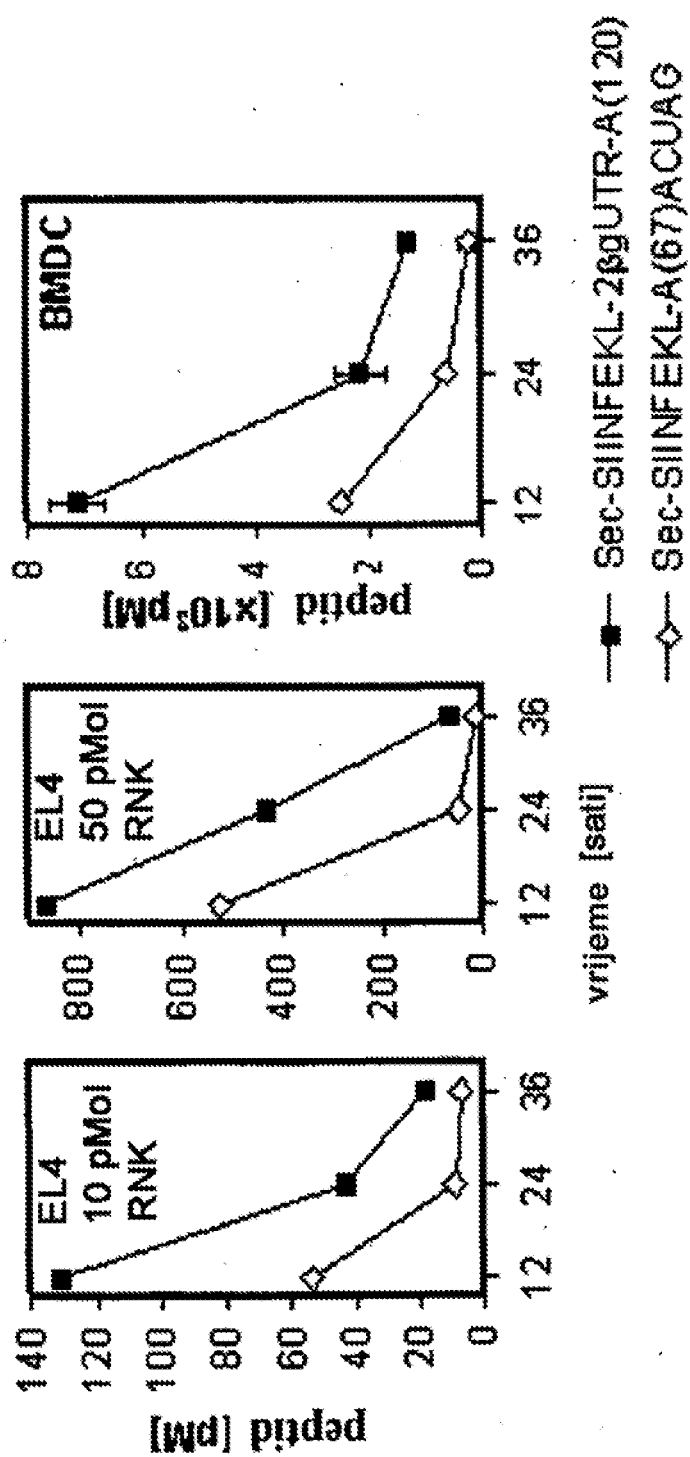
Slika 7.



Slika 8.



Slika 9.



Slika 10.

