



(12) Translation of
European patent specification

(11) NO/EP 3516055 B1

NORWAY

(19) NO
(51) Int Cl.
C12N 15/10 (2006.01)

Norwegian Industrial Property Office

(45)	Translation Published	2022.06.07
(80)	Date of The European Patent Office Publication of the Granted Patent	2021.12.22
(86)	European Application Nr.	17746416.1
(86)	European Filing Date	2017.07.17
(87)	The European Application's Publication Date	2019.07.31
(30)	Priority	2016.09.21, EP, 16189976
(84)	Designated Contracting States:	AL ; AT ; BE ; BG ; CH ; CY ; CZ ; DE ; DK ; EE ; ES ; FI ; FR ; GB ; GR ; HR ; HU ; IE ; IS ; IT ; LI ; LT ; LU ; LV ; MC ; MK ; MT ; NL ; NO ; PL ; PT ; RO ; RS ; SE ; SI ; SK ; SM ; TR
(73)	Proprietor	Technische Universität München, Arcisstr. 21, 80333 München, Tyskland
(72)	Inventor	PRAETORIUS, Florian, Osterwaldstrasse 90A, 80805 Munich, Tyskland DIETZ, Hendrik, Zunftstrasse 43, 85540 Haar, Tyskland
(74)	Agent or Attorney	O3C Konsult AB, Box 6088, 17106 SOLNA, Sverige

(54)	Title	SCALABLE BIOTECHNOLOGICAL PRODUCTION OF DNA SINGLE STRAND MOLECULES OF DEFINED SEQUENCE AND LENGTH
------	-------	---

(56)	References Cited:	ALEXANDRIA N. MARCHI ET AL: "Toward Larger DNA Origami", NANO LETTERS, vol. 14, no. 10, 8 October 2014 (2014-10-08), pages 5740-5747, XP055347699, US ISSN: 1530-6984, DOI: 10.1021/nl502626s cited in the application COSIMO DUCANI ET AL: "Enzymatic production of 'monoclonal stoichiometric' single-stranded DNA oligonucleotides", HHS PUBLIC ACCESS AUTHOR MANUSCRIPT, vol. 10, no. 7, 2 June 2013 (2013-06-02), pages 647-652, XP055347548, GB ISSN: 1548-7091, DOI: 10.1038/nmeth.2503 cited in the application EVI STAHL ET AL: "Facile and Scalable Preparation of Pure and Dense DNA Origami Solutions", ANGEWANDTE CHEMIE INTERNATIONAL EDITION, vol. 53, no. 47, 24 October 2014 (2014-10-24), pages 12735-12740, XP055347555, DE ISSN: 1433-7851, DOI: 10.1002/anie.201405991 THORSTEN L. SCHMIDT ET AL: "Scalable amplification of strand subsets from chip-synthesized oligonucleotide libraries", NATURE COMMUNICATIONS, vol. 6, 16 November 2015 (2015-11-16), page 8634, XP055347700, DOI: 10.1038/ncomms9634 cited in the application GU H ET AL: "Production of single-stranded DNAs by self-cleavage of rolling-circle amplification products", BIOTECHNIQUES RAPID DISPATCHES, INFORMA HEALTHCARE, US, vol. 54, no. 6, 1 June 2013 (2013-06-01), pages 337-343, XP002758881, ISSN: 0736-6205, DOI: 10.2144/000114009 BENJAMIN KICK ET AL: "Efficient Production of Single-Stranded Phage DNA as Scaffolds for DNA Origami", NANO LETTERS, vol. 15, no. 7, 8 July 2015 (2015-07-08), pages 4672-4676, XP055347289, US ISSN: 1530-6984, DOI: 10.1021/acs.nanolett.5b01461 cited in the application
------	-------------------	---

Enclosed is a translation of the patent claims in Norwegian. Please note that as per the Norwegian Patents Acts, section 66i the patent will receive protection in Norway only as far as there is agreement between the translation and the language of the application/patent granted at the EPO. In matters concerning the validity of the patent, language of the application/patent granted at the EPO will be used as the basis for the decision. The patent documents published by the EPO are available through Espacenet (<http://worldwide.espacenet.com>) or via the search engine on our website here: <https://search.patentstyret.no/>

PATENTKRAV

1. Fremgangsmåte for den rekombinante produksjonen av DNA-enkeltstrengmolekyler, omfattende trinnene

(1) å tilveiebringe en pseudogen nukleinsyre, hvori den pseudogene

5 nukleinsyren er en nukleinsyre som omfatter minst én mål-DNA-oligo- eller polynukleotidsekvens og to selvspaltende DNA-sekvenser som flankerer hver mål-DNA-oligo- eller polynukleotidsekvens,

(2) å integrere den pseudogene nukleinsyren til en vektor, transformere bakterieceller med vektoren og produsere et forløper-ssDNA fra vektoren under

10 bakteriekulturførhold, hvori forløper-ssDNA-et omfatter den pseudogene nukleinsyren;

(3) å isolere forløper-ssDNA-et fra bakteriekulturen;

(4) å fordøye forløper-ssDNA-et under reaksjonsforhold der de selvspaltende DNA-sekvensene blir aktive; og

(5) å skille de(t) målenkeltrådede DNA-oligo- eller

15 polynukleotidet/polynukleotidene og å oppnå de(t) målenkeltrådede DNA-oligo- eller polynukleotidet/polynukleotidene.

2. Fremgangsmåten ifølge krav 1 hvori de selvspaltende DNA-sekvensene er selvspaltende desoksyribozymer eller DNAzymer, slik som Zn^{2+} -avhengige DNAzymer, f.eks. I-R3.

20 3. Fremgangsmåten ifølge krav 1 eller 2, hvori den pseudogene nukleinsyren omfatter to, tre, fire eller mer enn ca. 50 mål-DNA-oligonukleotidsekvenser.

4. Fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 3, hvori en mål-DNA-oligo- eller polynukleotidsekvens har en lengde i området fra ca. 20 nukleotider til ca. flere tusen nukleotider.

25 5. Fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 4, hvori bakteriene er valgt fra *E. coli*, særlig K12-avledede *E. coli*-sikkerhetsstammer, slik som DH5alpha, XL-1blue eller JM109.

6. Fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 5, hvori vektoren i trinn (2) er minst ett fagemid, eventuelt omfattende flere komponent(er),

slik som

- en emballasjesekvens,
- 5 - komponent(er) som sikrer forplantning av fagemidet under celledeling,
- en seleksjonsmarkør, vanligvis et antibiotikumresistensgen.

7. Fremgangsmåten ifølge krav 6, hvori videre et hjelperplasmid eller en hjelperfag anvendes som omfatter flere komponent(er), slik som

- gener som koder for proteinene til en bakteriofag, f.eks. M13-bakteriofag
- 10 - komponent(er) som sikrer forplantning av hjelperplasmidet under celledeling,
- en seleksjonsmarkør, vanligvis et antibiotikumresistensgen.

8. Fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av de foregående kravene, hvori vektoren i trinn (2) er minst ett fagemid og amplifiseres inne i bakteriecellene via rullende sirkelamplifikasjon (RCA) som resulterer i fagemid-ssDNA.

- 15 9. Fremgangsmåten ifølge krav 8, hvori fagemid-ssDNA-et pakkes inn i faglignende partikler som fortrinnsvis skilles fra cellene.

10. Fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av kravene 6 til 9, hvori trinn (3) omfatter å ekstrahere de faglignende partiklene fra cellekulturen og ekstrahere fagemid-ssDNA-et fra de faglignende partiklene.

- 20 11. Fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av de foregående kravene, hvori fordøyelsen i trinn (4) utløses av tilsetningen av Zn^{2+} -ioner.

12. Fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av de foregående kravene, hvori å skille de(t) målenkeltrådede DNA-oligo- eller polynukleotidet/polynukleotidene i trinn (5) omfatter

- 25 å skille fra de selvspaltende DNA-sekvensene, slik som DNAzymer, f.eks. via kromatografi.

13. Fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av de foregående kravene, omfattende det ytterligere trinnet (6) å viderebehandle de(t) målenkeltrådede DNA-oligo- eller polynukleotidet/polynukleotidene,

slik som selvmontering og/eller folding til DNA-origamistrukturer,
5 flisbaserte DNA-nanostrukturer eller krystallinske DNA- nanomaterialer,

eller anvendelsen som aptamerer eller DNAzymer for å binde, detektere eller behandle andre molekyler.

14. Fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av de foregående kravene, hvori bakteriekulturen utføres i en bioreaktor, slik som en bioreaktor med omrørt tank.