



(19) REPUBLIKA HRVATSKA
DRŽAVNI ZAVOD ZA
INTELEKTUALNO VLASNIŠTVO



(10) Identifikator
dokumenta:

HR P20220722 T1

HR P20220722 T1

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

(51) MKP:

G01N 33/68 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)

(46) Datum objave prijevoda patentnih zahtjeva: 22.07.2022.

(21) Broj predmeta: P20220722T

(22) Datum podnošenja : 17.08.2018.

(86) Broj međunarodne prijave: PCT/EP2018072348
Datum podnošenja međunarodne prijave: 17.08.2018.

(96) Broj europske prijave patenta: EP 18756423.2
Datum podnošenja europske prijave patenta: 17.08.2018.

(87) Broj međunarodne objave: WO 2019034783
Datum međunarodne objave: 21.02.2019.

(97) Broj objave europske prijave patenta: EP 3669193 A1
Datum objave europske prijave patenta: 24.06.2020.

(97) Broj objave europskog patenta: EP 3669193 B1
Datum objave europskog patenta: 06.04.2022.

(31) Broj prve prijave: 17186948

(32) Datum podnošenja prve prijave: 18.08.2017.

(33) Država ili organizacija podnošenja prve prijave: EP

(73) Nositelj patenta:

**European Molecular Biology Laboratory, Meyerhofstrasse 1, 69117
Heidelberg, DE**

(72) Izumitelji:

**Joel Ignazio Perez-Perri, Görresstrasse 4, 69126 Heidelberg, DE
Matthias W. Hentze, Jettaweg 4/3, 69118 Heidelberg, DE
Birgit Rogell, R7 24, 68161 Mannheim, DE**

(74) Zastupnik:

Odvjetničko društvo Vukmir i suradnici, 10000 Zagreb, HR

(54) Naziv izuma:

POBOLJŠANO HVATANJE RNK INTERAKTOMA (ERIC)

HR P20220722 T1

PATENTNI ZAHTEJEVI

1. Postupak detekcije proteina koji vežu RNK (RBP) u stanici, tkivu ili organizmu, koji se sastoji od:
 - a) kovalentno umrežavanje sadržaja stanica, tkiva ili organizama koji sadrže RBP-ove pomoću prikladnog zračenja za proizvodnju biološkog materijala koji sadrži umrežene ribonukleotidne komplekse;
 - b) liziranje navedenog biološkog materijala koji sadrži navedene umrežene ribonukleotidne komplekse;
 - c) dovođenje u kontakt navedenih umreženih ribonukleotidnih kompleksa pod prikladnim uvjetima na temperaturama iznad 15°C, poželjno na oko 37 do 40 °C s najmanje jednim oligonukleotidom koji je komplementaran najmanje jednoj specifičnoj ciljnoj RNK navedenog biološkog materijala, pri čemu navedeni oligonukleotid sadrži najmanje jedan zaključani analog (LNA)-nukleotida nukleinske kiseline u svojoj sekvenci, te pri čemu je navedeni oligonukleotid spojen na prikladnu čvrstu podlogu, kao što je magnetska čestica;
 - c') provođenje strogog prethodnog eluiranja u čistoj vodi na između 40°C do 77°C;
 - d) izoliranje kompleksa koji sadrže navedeni najmanje jedan oligonukleotid korištenjem navedene čvrste podloge;
 - e) enzimsko oslobađanje navedenih RBP-a korištenjem RNK probave iz navedenih izoliranih kompleksa za proizvodnju oslobođenih RBP-a; i
 - f) otkrivanje navedeni oslobođenih RBP-a.
2. Postupak prema patentnom zahtjevu 1, naznačen time što je navedeno zračenje odabrano od UV svjetla, kao što je, na primjer, od oko 254 nm ili oko 365 nm.
3. Postupak prema patentnom zahtjevu 1 ili 2, naznačen time što se navedene stanice liziraju pod uvjetima denaturacije koji, na primjer, uključuju pufer koji sadrži oko 500 mM litijevog klorida i oko 0,5 % litijevog dodecil sulfata.
4. Postupak prema bilo kojem od patentnih zahtjeva 1 do 3, naznačen time što dalje obuhvaća korak smicanja genomske DNK prije izolacije navedenih kompleksa.
5. Postupak prema bilo kojem od patentnih zahtjeva 1 do 4, naznačen time što se navedeno prethodno eluiranje provodi tijekom oko 5 do 10 minuta.
6. Postupak prema bilo kojem od patentnih zahtjeva 1 do 5, naznačen time što se navedeni RBP-ovi oslobađaju probavom s RNazama A i T1.
7. Postupak prema bilo kojem od patentnih zahtjeva 1 do 6, naznačen time što dalje obuhvaća korak centrifugiranja i/ili vakuumske koncentriranja RBP uzoraka.
8. Postupak prema bilo kojem od patentnih zahtjeva 1 do 7, naznačen time što analiza navedenih otpuštenih RBP-a uključuje pripravu pomoću Single-Pot Solid-Phase poboljšane pripreme uzorka (SP3) i/ili kvantitativne masene spektrometrije.
9. Postupak prema bilo kojem od patentnih zahtjeva 1 do 8, naznačen time što navedeni oligonukleotid ima duljinu između 15 do 25 baza, poželjno 20 baza.
10. Postupak prema bilo kojem od patentnih zahtjeva 1 do 9, naznačen time što navedeni oligonukleotid sadrži LNA na svakom drugom položaju navedenog oligomera, kao što je, na primjer, LNA-T.
11. Postupak prema bilo kojem od patentnih zahtjeva 1 do 10, naznačen time što dalje obuhvaća detekciju promjena u RNK-asocijaciji RBP-ova kako je otkriveno, u usporedbi s kontrolnim uzorkom ili uzorkom dobivenim pod različitim eksperimentalnim uvjetima.
12. Upotreba kompleta koji sadrži materijale za provođenje postupka prema bilo kojem od patentnih zahtjeva 1 do 11, uključujući najmanje jedan prikladan oligonukleotid koji je komplementaran najmanje jednoj specifičnoj ciljnoj RNK navedene stanice i sadrži najmanje jedan (LNA)-nukleotid nukleinske kiseline, enzim prikladan za probavu RNK, pufere, reagense, i/ili upute za upotrebu, za otkrivanje proteina koji vežu RNK (RBP) u stanici.