

(19)



SUOMI - FINLAND
(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN
FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI/EP4200443 T3**
(12) **EUROOPPAPATENTIN KÄÄNNÖS**
ÖVERSÄTTNING AV EUROPEISKT PATENT
TRANSLATION OF EUROPEAN PATENT SPECIFICATION

- (45) Käännöksen kuulutuspäivä - Kungörelsedag av översättning - Translation available to the public **11.07.2024**
- (97) Eurooppapatentin myöntämispäivä - Meddelandedatum för det europeiska patentet - Date of grant of European patent **10.04.2024**
- (51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassificering - International patent classification
C12Q 1/6869 (2018.01)
C12Q 1/6806 (2018.01)
- (96) Eurooppapatenttihakemus - Europeisk patentansökan - European patent application **EP21766455.6**
- (22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **20.08.2021**
- (97) Patenttihakemuksen julkiseksitulospäivä - Patentansökans publiceringsdag - Patent application available to the public **28.06.2023**
- (86) Kansainvälinen hakemus - Internationell ansökan - International application **20.08.2021 PCT/EP2021073203**
- (30) Etuoikeus - Prioritet - Priority
21.08.2020 GB GB202013141

(73) Haltija - Innehavare - Holder
1• University College Cardiff Consultants Ltd , 30-36 Newport Road , Cardiff CF24 0DE , (GB)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor
1• REED, Simon , Cowbridge CF71 7SD , (GB)
2• DOBBS, Felix , Cambridge CB1 3FD , (GB)
3• VAN EIJK, Patrick , Cardiff CF14 3PN , (GB)

(74) Asiamies - Ombud - Agent
Papula Oy , P.O.Box 981 , 00101 Helsinki , (FI)

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention
MENETELMÄ KAKSOISJUOSTEEN KATKOSTEN ERISTÄMISEKSI
A METHOD FOR THE ISOLATION OF DOUBLE-STRAND BREAKS

PATENTTIVAATIMUKSET

1. Menetelmä näytteen valmistelemiseksi DNA:n kaksoisjuosteen katkosten (double-strand break, DSB) tunnistamiseksi nukleiinihaponäytteessä, jossa valmistelu käsittää DSB-assosioituneiden nukleiinihappojen muokkaamisen siten, että ne ovat:

(i) sopivia sitoutumaan substraattiin, joka käsittää ensimmäisen immobilisoidun alukkeen, ja
(ii) sopivia monistamiseen, jossa monistaminen käsittää mainitun ensimmäisen immobilisoidun alukkeen ja toisen alukkeen käytön; menetelmän käsittäessä:

a) järjestetään näyte, joka käsittää joukon nukleiinihappoja;

b) altistetaan nukleiinihappojen joukko ensimmäiselle adaptorille olosuhteissa, jotka edistävät liigaatiota, jossa ensimmäinen adaptor käsittää oligonukleotidin, joka kykenee tulemaan ligatoiduksi DSB:n juosteen 3'-päähän ja joka käsittää sekvenssin, joka kykenee sitoutumaan ensimmäiseen immobilisoituun alukkeeseen hybridisaatiolla;

c) fragmentoidaan nukleiinihappojen joukko; ja

d) altistetaan nukleiinihappojen joukko toiselle adaptorille olosuhteissa, jotka edistävät liigaatiota, jossa toinen adaptor käsittää oligonukleotidin, joka kykenee tulemaan ligatoiduksi juosteen 5'-päähän fragmentaation aikaansaamassa katkoksesta, mutta joka ei kykene tulemaan ligatoiduksi ensimmäiseen adaptorin, ja joka ei käsitä sekvenssiä, joka kykenee sitoutumaan substraattiin immobilisoituun alukkeeseen hybridisaatiolla, ja joka käsittää sekvenssin, joka on identtinen toisen alukkeen alueen kanssa.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, jossa toinen aluke on immobilisoitu substraattiin.

3. Patenttivaatimuksen 1 tai patenttivaatimuksen 2 mukainen menetelmä, jossa vaihe b) on seuraava:

altistetaan nukleiinihappojen joukko ensimmäiselle adaptoriparille olosuhteissa, jotka edistävät

ligaatiota, jossa ensimmäinen adaptoripari kykenee tulemaan ligatoiduksi ainakin DSB:n juosteen 3'-päähen, ja jossa ensimmäinen adaptoripari käsittää ensimmäisiä ja toisia oligonukleotideja, jotka ovat ainakin osittain
5 komplementaarisia, ja ensimmäinen oligonukleotidi on ligatoitavissa 3'-päähen ja käsittää sekvenssin, joka kykenee sitoutumaan substraattiin immobilisoituun alukkeeseen hybridisaatiolla; ja

jossa vaihe d) on seuraava:

10 altistetaan nukleiinihappojen joukko toiselle adaptoriparille olosuhteissa, jotka edistävät ligatiota, jossa toinen adaptoripari kykenee tulemaan ligatoiduksi ainakin juosteen 5'-päähen fragmentaation aikaansaamassa katkoksesta, mutta ei kykene tulemaan ligatoiduksi ensimmäisen adaptoriparin ensimmäiseen oligonukleotidiin, jossa toinen adaptoripari käsittää ensimmäisiä ja toisia osittain komplementaarisia oligonukleotideja, ja ensimmäinen oligonukleotidi on ligatoitavissa 5'-päähen ja käsittää sekvenssin, joka on identtinen toisen alukkeen alueen kanssa, ja toinen oligonukleotidi ei käsitä sekvenssiä, joka on komplementaarinen mainitulle toisen alukkeen alueen kanssa identtiselle sekvenssille.

4. Jonkin patenttivaatimuksista 1-3 mukainen
25 menetelmä, jossa toinen adaptoripari käsittää:

ensimmäisen oligonukleotidin, joka käsittää sekvenssin CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT (SEQ ID NO: 32) mukaisen sekvenssin, ja toisen oligonukleotidin, joka käsittää sekvenssin, joka ei käsitä sekvenssiä, jossa on
30 enemmän kuin 5, 10, 15 tai 20 emästä, tai ei käsitä kaikkia 24:ää emästä, sekvenssistä ATCTCGTATGCCGTCTTCTGCTTG (SEQ ID NO: 30); tai

ensimmäisen oligonukleotidin, joka käsittää sekvenssin AATGATACGGCGACCACCGA (SEQ ID NO: 34) mukaisen
35 sekvenssin, ja toisen oligonukleotidin, joka käsittää sekvenssin, joka ei käsitä enempää kuin 5, 10 tai 15

emästä, tai ei käsitä kaikkia 20:tä emästä, sekvenssistä TCGGTGGTCGCCGTATCATT (SEQ ID NO: 31).

5. Patenttivaatimuksen 3 tai patenttivaatimuksen 4 mukainen menetelmä, jossa ensimmäisen adaptoriparin ensimmäinen ja/tai toinen oligonukleotidi käsittää 3'- ja/tai 5'-suojapiirteen; ja/tai jossa toisen adaptoriparin ensimmäinen ja/tai toinen oligonukleotidi käsittää 3'- ja/tai 5'-suojapiirteen; jossa valinnaisesti toinen adaptoripari ei kykene tulemaan ligatoiduksi ensimmäiseen adaptoriin johtuen ensimmäisen adaptorin 3'-modifikaation läsnäolosta.

6. Jonkin patenttivaatimuksista 1-5 mukainen menetelmä, jossa toisen adaptorin oligonukleotidi, joka on ligatoitavissa 5'-päähän, käsittää sekvenssin, joka on identtinen immobilisoidun alukkeen 5, 10, 15, 20, 21, 24 tai useamman emäksen kanssa.

7. Jonkin patenttivaatimuksista 1-6 mukainen menetelmä, joka käsittää lisäksi nukleiinihappojen joukon saattamisen kosketuksiin immobilisoituja alukkeita käsittävän substraatin kanssa olosuhteissa, jotka soveltuvat immobilisoitujen alukkeiden hybridisaatioon komplementaarisiin nukleiinihappoihin.

8. Patenttivaatimuksen 7 mukainen menetelmä, joka käsittää lisäksi mahdollisten substraattiin hybridisoituneiden nukleiinihappojen sekvenssitietojen hankkimisen.

9. Jonkin patenttivaatimuksista 1-8 mukainen menetelmä, jossa mainittu nukleiinihappojen joukon käsittävä näyte on gDNA:ta.

10. Jonkin patenttivaatimuksista 1-9 mukainen menetelmä, jossa:

vaiheet suoritetaan järjestyksessä a), b), c) ja sitten d); tai

vaiheet suoritetaan järjestyksessä a), c), d) ja sitten b); jossa näyte altistetaan olosuhteille, jotka kykenevät aiheuttamaan tai joiden epäillä kykenevän aiheuttamaan DSB:n vaiheiden d) ja b) välissä;

jossa valinnaisesti näyte altistetaan olosuhteille, jotka kykenevät aiheuttamaan DSB:n kiinnostuksen kohteena olevassa piirteessä nukleiinihaponäytteessä.

11. Kitti näytteen valmistelemiseksi DSB:ien tunnistamiseksi gDNA-näytteessä, jossa kitti käsittää oligonukleotidipareja, jotka on konfiguroitu sopiviksi toimimaan ensimmäisenä ja toisena adaptorina suoritettaessa jonkin patenttivaatimuksista 1-10 mukaisia menetelmiä, kitin käsittäessä

10 i) ensimmäisen parin oligonukleotideja, joista ensimmäinen käsittää 5'-sitomispiirteän, joka mahdollistaa mainitun oligonukleotidin ligaation kaksoisjuosteisen nukleiinihapon juosteeseen, ja käsittää sekvenssin TCGGTGGTCGCCGTATCATT (SEQ ID NO: 31) mukaisen sekvenssin; ja toisen oligonukleotidin, joka on komplementaarinen mainitulle ensimmäisen parin ensimmäiselle oligonukleotidille; ja jossa jompikumpi tai kumpikin mainituista oligonukleotideista käsittää vastaavasti 3'- ja/tai 5'-suojapiirteän; ja

20 ii) toisen parin oligonukleotideja, joista ensimmäinen ei käsitä sekvenssiä, jossa on enemmän kuin 5, 10, 15 tai 20 emästä, tai ei käsitä kaikkia 24:ää emästä, sekvenssistä ATCTCGTATGCCGTCTTCTGCTTG (SEQ ID NO: 30); ja toisen oligonukleotidin, joka käsittää 3'-sitomispiirteän, joka mahdollistaa mainitun oligonukleotidin ligaation kaksoisjuosteisen nukleiinihapon juosteeseen, ja käsittää sekvenssin CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT (SEQ ID NO: 32) mukaisen sekvenssin; ja jossa jompikumpi tai kumpikin mainituista oligonukleotideista käsittää vastaavasti 3'- ja/tai 5'-suojapiirteän; tai

30 i) ensimmäisen parin oligonukleotideja, joista ensimmäinen käsittää 5'-sitomispiirteän, joka mahdollistaa mainitun oligonukleotidin ligaation kaksoisjuosteisen nukleiinihapon juosteeseen, ja käsittää sekvenssin ATCTCGTATGCCGTCTTCTGCTTG (SEQ ID NO: 30) mukaisen sekvenssin; ja toisen oligonukleotidin, joka on komplementaarinen mainitulle ensimmäisen parin ensimmäiselle

oligonukleotidille; ja jossa jompikumpi tai kumpikin mainituista oligonukleotideista käsittää vastaavasti 3' ja/tai 5'-suojapiirteen; ja

5 ii) toisen parin oligonukleotideja, joista ensimmäinen ei käsitä sekvenssiä, jossa on enemmän kuin 5, 10 tai 15 emästä, tai ei käsitä kaikkia 20:tä emästä, sekvenssistä TCGGTGGTCGCCGTATCATT (SEQ ID NO: 31); ja toisen oligonukleotidin, joka käsittää 3'-sitomispier-
teen, joka mahdollistaa mainitun oligonukleotidin li-
10 gaation kaksoisjuosteisen nukleiinihapon juosteeseen ja käsittää sekvenssin AATGATACGGCGACCACCGA (SEQ ID NO: 34) mukaisen sekvenssin; ja jossa jompikumpi tai kumpikin mainituista oligonukleotideista käsittää vastaavasti 3'- ja/tai 5'-suojapiirteen.

15 12. Patenttivaatimuksen 11 mukainen kitti, jossa:

(a) oligonukleotidien ensimmäisen parin ja/tai toisen parin ensimmäinen oligonukleotidi käsittää hybridisaatiokohdan, johon ensimmäinen sekvenssialuke
20 voi sitoutua; ja/tai

(b) mainitut kohdan i) ja/tai kohdan ii) ensimmäiset ja toiset oligonukleotidit käsittävät myös indeksipiirteen, joka on tietty nukleotidien sekvenssi, joka mahdollistaa poolattujen näytteiden alkuperän mää-
25 rittämisen.

13. Patenttivaatimuksen 12 mukainen kitti, jossa mainittu kitti käsittää lisäksi:

vähintään yhden alukkeen, joka sitoutuu ensimmäiseen ja/tai toiseen hybridisaatiokohtaan sekvenssoin-
30 tia varten; ja/tai
fragmentointiaineita.

14. Kaksoisjuosteadaptori DNA:n kaksoisjuos-
teen katkosten (DSB) tunnistamiseksi nukleiinihap-
ponäytteessä, jossa kaksoisjuosteadaptori on konfigu-
35 roitu sopivaksi toimimaan toisena adaptorina suoritetaessa jonkin patenttivaatimuksista 1-10 mukaisia menetelmiä, kaksoisjuosteadaptorin käsittäessä:

(a) ensimmäisen oligonukleotidijuosteen, joka ei käsitä sekvenssiä, jossa on enemmän kuin 5, 10, 15 tai 20 emästä, tai ei käsitä kaikkia 24:ää emästä, sekvenssistä ATCTCGTATGCCGTCTTCTGCTTG (SEQ ID NO: 30); ja
5 toisen oligonukleotidin, joka käsittää 3'-sitomispierteen, joka mahdollistaa mainitun oligonukleotidin ligaation kaksoisjuosteisen nukleiinihapon juosteeseen ja käsittää sekvenssin CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT (SEQ ID
10 NO: 32) mukaisen sekvenssin; ja jossa jompikumpi tai kumpikin mainituista oligonukleotideista käsittää vastaavasti 3'- ja/tai 5'-suojapiirteen; tai

(b) ensimmäisen oligonukleotidijuosteen, joka ei käsitä sekvenssiä, jossa on enemmän kuin 5, 10 tai 15 emästä, tai ei käsitä kaikkia 20:tä emästä, sekvenssistä TCGGTGGTCGCCGTATCATT (SEQ ID NO: 31); ja toisen
15 oligonukleotidin, joka käsittää 3'-sitomispierteen, joka mahdollistaa mainitun oligonukleotidin ligaation kaksoisjuosteisen nukleiinihapon juosteeseen, ja käsittää sekvenssin AATGATACGGCGACCACCGA (SEQ ID NO: 34) mukaisen sekvenssin; ja jossa jompikumpi tai kumpikin mainituista oligonukleotideista käsittää vastaavasti 3'-
20 ja/tai 5'-suojapiirteen.