



(12) Translation of  
European patent specification

(11) NO/EP 2702192 B1

NORWAY

(19) NO  
(51) Int Cl.  
C12Q 1/6806 (2018.01)

### Norwegian Industrial Property Office

---

(21) Translation Published 2019.09.16

(80) Date of The European Patent Office Publication of the Granted Patent 2019.04.03

(86) European Application Nr. 12776509.7

(86) European Filing Date 2012.04.26

(87) The European Application's Publication Date 2014.03.05

(30) Priority 2011.04.26, US, 201113094809

(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 Longhorn Vaccines and Diagnostics, LLC, 2 Bethesda Metro Center, Suite 910, Bethesda, MD 20814, USA

(72) Inventor FISCHER, Gerald, W., 6417 Lynbrook Drive, Bethesda, MD 20817, USA  
DAUM, Luke, T., 318 Larkwood Drive, San Antonio, TX 78209, USA

(74) Agent or Attorney BRYN AARFLOT AS, Stortingsgata 8, 0161 OSLO, Norge

---

(54) Title **COMPOSITIONS AND METHODS FOR DETECTING AND IDENTIFYING NUCLEIC ACID SEQUENCES IN BIOLOGICAL SAMPLES**

(56) References Cited: US-A1- 2008 044 883, US-B2- 7 695 904, US-A1- 2010 209 927, US-A- 5 648 215, US-A1- 2010 151 477, WO-A1-2010/066908, US-A1- 2010 311 739, WO-A1-98/40099, US-A1- 2010 009 343, US-A1- 2003 138 805, US-B2- 7 361 489, US-A1- 2008 064 071, US-A1- 2001 023 065

DAUM L T ET AL: "A clinical specimen collection and transport medium for molecular diagnostic and genomic applications", EPIDEMIOLOGY AND INFECTION, CAMBRIDGE UNIVERSITY PRESS, CAMBRIDGE, GB, vol. 139, no. 11, 16 December 2010 (2010-12-16), pages 1764-1773, XP008165428, ISSN: 0950-2688, DOI: 10.1017/S0950268810002384 [retrieved on 2010-12-16]

PAPAGRIGORAKIS M J ET AL: "DNA examination of ancient dental pulp incriminates typhoid fever as a probable cause of the Plague of Athens", INTERNATIONAL JOURNAL OF INFECTIOUS DISEASES, INTERNATIONAL SOCIETY FOR INFECTIOUS DISEASES, HAMILTON, CA, vol. 10, no. 3, 1 May 2006 (2006-05-01), pages 206-214, XP028032521, ISSN: 1201-9712, DOI: 10.1016/J.IJID.2005.09.001 [retrieved on 2006-05-01]

BUYS ET AL: "Applying AFLPs in Aizoaceae: The Delosperma herbeum complex as a case study", BIOCHEMICAL SYSTEMATICS AND ECOLOGY, PERGAMON PRESS, GB, vol. 36, no.

2, 13 December 2007 (2007-12-13), pages 92-100, XP022389172, ISSN: 0305-1978, DOI: 10.1016/J.BSE.2007.08.003

ANDERSON I C ET AL: "DNA- and RNA-derived assessments of fungal community composition in soil amended with sewage sludge rich in cadmium, copper and zinc", SOIL BIOLOGY AND BIOCHEMISTRY, PERGAMON, OXFORD, GB, vol. 40, no. 9, 1 September 2008 (2008-09-01), pages 2358-2365, XP023906337, ISSN: 0038-0717, DOI: 10.1016/J.SOILBIO.2008.05.015 [retrieved on 2008-06-17]

Luke T. Daum: "A Rapid, Collection-to-Detection PCR System of the Universal Detection of Mycobacterium tuberculosis", , 29 June 2011 (2011-06-29), pages 1-1, XP055167459, Retrieved from the Internet: URL:[http://www.lhnvd.com/000\\_vig\\_user\\_files/site\\_uploaded/54713/ESPIDPrimeStorePoster2011.pdf](http://www.lhnvd.com/000_vig_user_files/site_uploaded/54713/ESPIDPrimeStorePoster2011.pdf) [retrieved on 2015-02-05]

LIAO J ET AL: "Telomerase activity in oral and maxillofacial tumors", ORAL ONCOLOGY, ELSEVIER SCIENCE, OXFORD, GB, vol. 36, no. 4, 1 July 2000 (2000-07-01), pages 347-352, XP004286702, ISSN: 1368-8375, DOI: 10.1016/S1368-8375(00)00013-0

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. PCR-klar sammensetning for detektering av et element av *M. tuberculosis*-komplekset i en biologisk prøve som omfatter som komponenter:

5 en blanding av deoksynukleotidtrifosfater som omfatter vesentlig ekvivalente mengder av dATP, dCTP, dGTP og dTTP, kollektivt til stede i sammensetningen i en konsentrasjon på 0,1 mM til 1 mM;

10 et chelateringsmiddel valgt fra gruppen som består av etylenglykoltetraeddiksyre, hydroksyetyletyldiamintrieddiksyre, dietylentriaminpentaeddiksyre, N,N-bis(karboksymetyl)glysin, etyldiamintetraeddiksyre, vannfritt citrat, natriumcitrat, kalsiumcitrat, ammoniumcitrat, ammoniumbicitrat, sitronsyre, diammoniumcitrat, kaliumcitrat, magnesiumcitrat, jern-ammoniumcitrat, litiumcitrat og en hvilken som helst kombinasjon derav, til stede i sammensetningen i en konsentrasjon på 0,01 mM til 1 mM;

PCR-osmolaritetsmidlet N,N,N-trimetylglysin (betain), til stede i sammensetningen i en konsentrasjon på 1 mM til 1 M;

15 et albumin valgt fra gruppen som består av bovint serumalbumin, humant serumalbumin, geiteserumalbumin, pattedyralbumin og enhver kombinasjon derav, til stede i sammensetningen i en konsentrasjon på 5 ng/ml til 100 ng/ml;

20 minst to salter, den første er et kaliumsalt valgt fra gruppen som består av kaliumklorid og kaliumglutamat og den andre er et magnesiumsalt valgt fra gruppen som består av magnesiumklorid og magnesiumsulfat, kollektivt til stede i sammensetningen i en konsentrasjon på 50 mM til 1 M;

25 og en buffer valgt fra gruppen som består av tris(hydroksymetyl)aminometan (Tris), citrat, 2-(N-morfolino)etansulfonsyre (MES), N,N-bis(2-hydroksyetyl)-2-aminoetansulfonsyre (BES), 1,3-bis(tris(hydroksymetyl)metylamino)propan (Bis-Tris), 4-(2-hydroksyetyl)-1-piperazin-2-etansulfonsyre (HEPES), 3-(N-morfolino)propansulfonsyre (MOPS), N,N-bis(2-hydroksycetyl)glysin (Bicin), N-[tris(hydroksymetyl)metyl]glysin (Tricine), N-2-acetamido-2-iminodieddiksyre (ADA), N-(2-acetamido)-2-aminooktansulfonsyre (ACES), piperazin-1,4-bis(2-etansulfonsyre) (PIPES), bikarbonat, fosfat og enhver kombinasjon derav, til stede i sammensetningen i en konsentrasjon på 1 mM til 1 M og med en pH på 6,5 til 9,0, hvori 30 bufferens pKa er innenfor en enhet av pH-en i sammensetningen ved en omgivelsestemperatur, hvori komponentene kombineres med nukleasefritt vann; og hvori sammensetningen omfatter én eller flere farger;

en varmestabil polymerase til stede i en mengde fra 0,05 U til 1 U; en merket deteksjonsprobe som binder til en PCR-amplifisert nukleinsyresekvens som er spesifikk for

medlemmer av *M. tuberculosis*-komplekset, hvori den merkede deteksjonsproben er en *Mycobacterium*-spesifikk sekvens med 20 til 35 nukleotider i lengde og omfatter sekvensen ifølge SEQ ID NO 4 eller SEQ ID NO 7;

og et par PCR-primere konfigurert til å amplifisere av PCR nukleinsyresekvensen som er spesifikk for medlemmer av *M. tuberculosis*-komplekset, kollektivt til stede i sammensetningen ved en konsentrasjon på 0,5 µm til 50 µm hvori hver PCR-primer er fra 18 til 35 nukleotider i lengde.

2. Sammensetning ifølge krav 1, hvori sammensetningen opprettholder PCR-amplifikasjonsaktivitet etter å ha blitt tint og igjenfrosset ti ganger.

3. Sammensetning ifølge krav 1 eller krav 2, hvori det ene eller flere fargestoffene velges fra gruppen som består av fluorescein, ROX™ og 5-karboksy-X-rodamin.

4. Sammensetning ifølge et hvilket som helst av kravene 1 eller 2, hvori pH-en er fra 6,5 til 7,5; og/eller bufferens pKa er innenfor 0,5 av bufferens pH ved omgivelsestemperatur; fortrinnsvis innenfor 0,2 av bufferens pH ved omgivelsestemperatur.

5. Sammensetning ifølge et hvilket som helst foregående krav, som videre omfatter en kontrollnukleinsyre som tilveiebringer et kvalitativt eller kvantitativt mål for PCR-amplifisering som er til stede i sammensetningen ved en konsentrasjon på 1 fg til 1 ng.

6. Sammensetning ifølge krav 5, hvori kontrollnukleinsyren omfatter sekvensen ifølge SEQ ID NO 8, sekvensen ifølge SEQ ID NO 12 eller sekvensen ifølge SEQ ID NO 21.

7. Sammensetning ifølge et hvilket som helst foregående krav, hvori en primer av paret av PCR-primere omfatter nukleinsyresekvensen ifølge SEQ ID NO 2 eller SEQ ID NO 5, og den andre primeren av paret av PCR-primere omfatter nukleinsyresekvensen ifølge SEQ ID NO 3 eller SEQ ID NO 6.

8. Fremgangsmåte for detektering av et medlem av *M. tuberculosis*-komplekset i en biologisk prøve som omfatter:

å bringe den biologiske prøven i kontakt med sammensetningen ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 6 for å danne en blanding;

å utføre flere termiske sykliseringstrinn på blandingen for å danne et amplifiseringsprodukt som avledes fra nukleinsyren som er spesifikk for et medlem av *M. tuberculosis*-komplekset;

å detektere nærværet eller fraværet av amplifikasjonsproduktet for å bestemme nærvær eller fravær av et medlem av *M. tuberculosis*-komplekset i den biologiske prøven.

9. Fremgangsmåte ifølge krav 8, som videre omfatter å detektere en amplifisert sekvens av en kontrollnukleinsyre og bestemme kvaliteten eller kvantiteten på amplifikasjon som



oppstod fra de flere termiske sykliseringstrinnene.

10. Sett omfattende sammensetningen ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 7, inneholdt i en steril beholder konfigurert for tilsetning av en biologisk prøve og termisk syklisering og instruksjoner for å bestemme nærvær eller fravær av et medlem av *M. tuberculosis*-komplekset fra resultatene av den termiske sykliseringen.
- 5