



(12) Translation of
European patent specification

(11) NO/EP 2705163 B1

NORWAY

(19) NO
(51) Int Cl.
C12Q 1/68 (2006.01)
C12N 15/10 (2006.01)
C12N 15/11 (2006.01)

Norwegian Industrial Property Office

(21)	Translation Published	2018.03.26
(80)	Date of The European Patent Office Publication of the Granted Patent	2017.11.01
(86)	European Application Nr.	12779532.6
(86)	European Filing Date	2012.05.03
(87)	The European Application's Publication Date	2014.03.12
(30)	Priority	2011.05.04, KR, 20110042332 2011.07.12, KR, 20110068888 2011.12.02, WO, PCT/KR11/009317
(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	Seegene, Inc., 8Fl, 9Fl Taewon Bldg. 65-5, Bangi-dong Songpa-gu, Seoul 138-050, KR-Sør-Korea
(72)	Inventor	CHUN, Jong Yoon, Rm 1901 Cheongdam MarkHills 1chaCheongdam-dong 142Gil 21Yeong-dong Dae RoGangnam-gu, Seoul 138-240, KR-Sør-Korea LEE, Young Jo, 112-3501 Park Rio Apt.17 Sincheon-dongSongpa-gu, Seoul 138-240, KR-Sør-Korea
(74)	Agent or Attorney	PLOUGMANN VINGTOFT, Postboks 1003 Sentrum, 0104 OSLO, Norge

(54)	Title	DETECTION OF TARGET NUCLEIC ACID SEQUENCES BY PO CLEAVAGE AND HYBRIDIZATION
(56)	References Cited:	EP-A1- 2 256 216, EP-A2- 1 564 306, WO-A1-2008/083261, EP-A1- 2 060 637, US-A1- 2005 221 315, US-A1- 2008 131 890, EP-A1- 1 777 298, WO-A2-00/63437

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 detektering av en målnukleinsyresekvens fra et DNA eller en blanding av nukleinsyrer ved hjelp av en POCH ("PO Cleavage and Hybridization")-analyse på et fast substrat, omfattende:
 - (a) hybridisering av målnukleinsyresekvensen med et oppstrøms oligonukleotid og et probe-oligonukleotid (PO); hvor det oppstrøms oligonukleotidet omfatter en hybridiserende nukleotidsekvens som er komplementær til målnukleinsyresekvensen; PO omfatter en måldel som omfatter en hybridiserende nukleotidsekvens som er komplementær til målnukleinsyresekvensen; PO har et enkelt-merke; det oppstrøms oligonukleotidet befinner seg oppstrøms for PO; det oppstrøms oligonukleotidet eller dets utvidede steng induserer spalting av PO ved et enzym som har en 5'-nukleaseaktivitet;
 - (b) å bringe resultatet fra trinnet (a) i kontakt med enzymet som har 5'-nukleaseaktiviteten under betingelser for spalting av PO; hvor PO hybridiseres med målnukleinsyresekvensen, PO spaltes av enzymet som har 5'-nukleaseaktiviteten for å fremstille et enkelt-merke inneholdende fragment;
 - (c) utførelse av en hybridiseringsreaksjon ved å bringe resultatet av trinn (b) i kontakt med et innfangende oligonukleotid (CO) som er immobilisert på det faste substratet; hvor CO omfatter en nukleotidsekvens som er hybridiserbar med PO; hvor hybridiseringsreaksjonen utføres under betingelser slik at det enkelt-merke inneholdende fragmentet ikke hybridiseres med CO, og et uspaltet PO hybridiseres med CO for å danne et uspaltet PO/CO-dupleks; og
 - (d) deteksjon av forekomst av spaltingen av PO ved å måle et signal fra enkelt-merket på det faste substratet; hvorved forekomsten av PO-spaltingen indikerer tilstedeværelsen av målnukleinsyresekvensen.

2. Fremgangsmåte ifølge krav 1, hvor nukleotidsekvensen som er hybridiserbar med PO i CO, omfatter en nukleotidsekvens som er hybridiserbar med måldelen av PO.

5

3. Fremgangsmåte ifølge krav 1, hvor PO er et 3'-merket PO som i sin 3'-del ytterligere omfatter en merkingsdel som har en nukleotidsekvens som ikke er komplementær til målnukleinsyresekvensen eller et 5'-merket PO som i sin 5'-del ytterligere omfatter en merkingsdel som har en nukleotidsekvens som ikke
10 er komplementær til målnukleinsyresekvensen, og nukleotidsekvensen som er hybridiserbar med PO i CO omfatter en nukleotidsekvens som er hybridiserbar med merkingsdelen av PO.

4. Fremgangsmåte ifølge krav 3, hvor enkelt-merket er posisjonert slik at
15 enkelt-merket ikke forblir på et fragment som inneholder en merkingsdel, hvilket fragment frigjøres ved spalting av PO.

5. Fremgangsmåte ifølge krav 1, hvor PO er et 3'-merket PO som i sin 3'-del ytterligere omfatter en merkingsdel som har en nukleotidsekvens som ikke er
20 komplementær til målnukleinsyresekvensen eller et 5'-merket PO som i sin 5'-del ytterligere omfatter en merkingsdel som har en nukleotidsekvens som ikke er komplementær til målnukleinsyresekvensen, og nukleotidsekvensen som er hybridiserbar med PO i CO omfatter en nukleotidsekvens som er hybridiserbar med en del av merkingsdelen og en del av måldelen av PO.

25

6. Fremgangsmåte ifølge krav 1, hvor PO og/eller CO er blokkert ved sin 3'-ende for å stanse dens forlengelse.

7. Fremgangsmåte ifølge krav 1, hvor det oppstrøms oligonukleotidet har en

delvis overlappende sekvens med måldelen av PO.

8. Fremgangsmåte ifølge krav 1, hvor enzymet som har 5'-nukleaseaktiviteten er en termostabil DNA-polymerase som har en 5'-nukleaseaktivitet eller FEN-nuklease.

9. Fremgangsmåte ifølge krav 1, hvor fremgangsmåten videre omfatter å gjenta trinnene (a)-(b), (a)-(c) eller (a)-(d) med denaturering mellom repeterende sykluser.

10

10. Fremgangsmåte ifølge krav 1, hvor trinnene (a)-(d) utføres i en reaksjonsbeholder eller i atskilte reaksjonsbeholdere.

11. Fremgangsmåte ifølge krav 1, hvor målnukleinsyresekvensen omfatter minst to typer målnukleinsyresekvenser.

12. Fremgangsmåte ifølge krav 1, hvor målnukleinsyresekvensen omfatter en nukleotidvariasjon.

13. Fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av kravene 1-12, hvor fremgangsmåten utføres i nærvær av en nedstrøms primer.

14. Fremgangsmåte for detektering av en målnukleinsyresekvens fra et DNA eller en blanding av nukleinsyrer ved hjelp av en POCH ("PO Cleavage and Hybridization")-analyse på et fast substrat, omfattende:

(a) hybridisering av målnukleinsyresekvensen med et oppstrøms oligonukleotid og et probe-oligonukleotid (PO); hvor det oppstrøms oligonukleotidet omfatter en hybridiserende nukleotidsekvens som er komplementær til målnukleinsyresekvensen; PO omfatter en måldel som

omfatter en hybridiserende nukleotidsekvens som er komplementær til målnukleinsyresekvensen; PO har et interaktiv dobbelt-merke omfattende et donormolekyl og et akseptormolekyl; det oppstrøms oligonukleotidet befinner seg oppstrøms for PO; det oppstrøms oligonukleotidet eller dets

5 utvidede streng induserer spalting av PO ved et enzym som har en 5'-nukleaseaktivitet;

(b) å bringe resultatet fra trinnet (a) i kontakt med enzymet som har 5'-nukleaseaktiviteten under betingelser for spalting av PO; hvor PO hybridiseres med målnukleinsyresekvensen, PO spaltes av enzymet som

10 har 5'-nukleaseaktiviteten for å separere det interaktive dobbelt-merket, hvorved et donorholdig fragment og et akseptorholdig fragment frembringes;

(c) utførelse av en hybridiseringsreaksjon ved å bringe resultatet av trinn (b) i kontakt med et innfangende oligonukleotid (CO) som er immobilisert

15 på det faste substratet; hvor CO omfatter en nukleotidsekvens som er hybridiserbar med PO; hvor hybridiseringsreaksjonen utføres under betingelser slik at minst ett av det donorholdige fragmentet og det akseptorholdige fragmentet ikke hybridiseres med CO, og et uspaltet PO hybridiseres med CO for å danne et uspaltet PO/CO-dupleks; hvor et signal

20 fra det uspaltede PO/CO-duplekset er differensiert fra et signal som er tilveiebrakt på det tidspunkt da minst ett av det donorholdige fragmentet og det akseptorholdige fragmentet ikke hybridiseres med CO; og

(d) deteksjon av forekomst av spaltingen av PO ved å måle et signal fra det interaktive dobbelt-merket på det faste substratet; hvorved

25 forekomsten av PO-spaltingen indikerer tilstedeværelsen av målnukleinsyresekvensen.

15. Fremgangsmåte ifølge krav 14, hvor nukleotidsekvensen som er hybridiserbar med PO i CO, omfatter en nukleotidsekvens som er hybridiserbar

med måldelen av PO, og det interaktive dobbelt-merket er lokalisert i den utstrekning at et signal fra donormolekylet stanses av akseptormolekylet når det uspalte PO/CO-duplekset dannes, hvor trinnet (d) utføres ved å detektere et signal fra akseptormolekylet.

5

16. Fremgangsmåte ifølge krav 14, hvor PO er en 3'-merket PO som i sin 3'-del ytterligere omfatter en merkingsdel som har en nukleotidsekvens som ikke er komplementær til målnukleinsyresekvensen eller en 5'-merket PO som i sin 5'-del ytterligere omfatter en merkingsdel som har en nukleotidsekvens som er ikke-komplementær til målnukleinsyresekvensen; og nukleotidsekvensen som er hybridiserbar med PO i CO, omfatter en nukleotidsekvens som er hybridiserbar med merkingsdelen av PO, og det interaktive dobbelt-merket er lokalisert i den grad at et signal fra donormolekylet stanses av akseptormolekylet når det uspalte PO/CO-duplekset dannes, hvori trinnet (d) utføres ved å detektere et signal fra akseptormolekylet.

17. Fremgangsmåte ifølge krav 14, hvor nukleotidsekvensen som er hybridiserbar med PO i CO, omfatter en nukleotidsekvens som er hybridiserbar med måldelen av PO, og hybridiseringsreaksjonen i trinn (c) utføres under betingelser som er slik at det donorholdige fragmentet ikke hybridiseres med CO; hvor det interaktive dobbelt-merket er lokalisert i den utstrekning at et signal fra donormolekylet ikke stanses av akseptormolekylet når det uspalte PO/CO-duplekset dannes, og trinnet (d) utføres ved å detektere et signal fra donormolekylet.

25

18. Fremgangsmåte ifølge krav 14, hvor PO er en 3'-merket PO som i sin 3'-del videre omfatter en merkingsdel som har en nukleotidsekvens som ikke er komplementær til målnukleinsyresekvensen eller en 5'-merket PO som i sin 5'-del ytterligere omfatter en merkingsdel som har en nukleotidsekvens som

er ikke-komplementær til målnukleinsyresekvensen; nukleotidsekvensen som er hybridiserbar med PO i CO, omfatter en nukleotidsekvens som er hybridiserbar med merkingsdelen av PO; det donorholdige fragmentet omfatter merkingsdelen som er hybridiserbar med CO, og i

- 5 hybridiseringsreaksjonen i trinn (c) hybridiseres det donorholdige fragmentet med CO; hvor det interaktive dobbelt-merket er lokalisert i den grad at et signal fra donormolekylet stanses av akseptormolekylet når det uspalte PO/CO-duplekset dannes og trinnet (d) utføres ved å detektere et signal fra donormolekylet.

10

19. Fremgangsmåte ifølge krav 14, hvor PO er et 3'-merket PO som i sin 3'-del ytterligere omfatter en merkingsdel som har en nukleotidsekvens som ikke er komplementær til målnukleinsyresekvensen eller et 5'-merket PO som i sin 5'-del ytterligere omfatter en merkingsdel som har en nukleotidsekvens som
- 15 ikke er komplementær til målnukleinsyresekvensen, og nukleotidsekvensen som er hybridiserbar med PO i CO omfatter en nukleotidsekvens som er hybridiserbar med en del av merkingsdelen og en del av måldelen av PO.

20. Fremgangsmåte ifølge krav 14, hvor fremgangsmåten videre omfatter å
- 20 gjenta trinnene (a)-(b), (a)-(c) eller (a)-(d) med denaturering mellom repeterende sykluser.

21. Fremgangsmåte ifølge krav 14, hvor trinnene (a)-(d) utføres i en reaksjonsbeholder eller i atskilte reaksjonsbeholdere.

25

22. Fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av kravene 14-21, hvor fremgangsmåten utføres i nærvær av en nedstrøms primer.

23. Fremgangsmåte for detektering av en målnukleinsyresekvens fra et DNA

eller en blanding av nukleinsyrer ved hjelp av en POCH ("PO Cleavage and Hybridization")-analyse på et fast substrat, omfattende:

- (a) hybridisering av målnukleinsyresekvensen med et oppstrøms oligonukleotid og et probe-oligonukleotid (PO); hvor det oppstrøms oligonukleotidet omfatter en hybridiserende nukleotidsekvens som er komplementær til målnukleinsyresekvensen; PO omfatter en måldel som omfatter en hybridiserende nukleotidsekvens som er komplementær til målnukleinsyresekvensen; det oppstrøms oligonukleotidet befinner seg oppstrøms for PO; det oppstrøms oligonukleotidet eller dets utvidede streng induserer spalting av PO ved et enzym som har en 5'-nukleaseaktivitet;
- (b) å bringe resultatet fra trinnet (a) i kontakt med enzymet som har 5'-nukleaseaktiviteten under betingelser for spalting av PO; hvor PO hybridiseres med målnukleinsyresekvensen, PO spaltes av enzymet som har 5'-nukleaseaktiviteten for å fremstille et spaltet fragment;
- (c) utførelse av en hybridiseringsreaksjon i nærvær av et interkaleringsmiddel ved å bringe resultatet av trinn (b) i kontakt med et innfangende oligonukleotid (CO) som er immobilisert på det faste substratet; hvor CO omfatter en nukleotidsekvens som er hybridiserbar med PO; hvor hybridiseringsreaksjonen utføres under betingelser slik at det spaltede fragment ikke hybridiseres med CO, og et uspaltet PO hybridiseres med CO for å danne et uspaltet PO/CO-dupleks; og
- (d) detektering av forekomst av spaltingen av PO ved å måle et signal fra interkaleringsmiddelet på det faste substratet; hvorved forekomsten av PO-spaltingen indikerer tilstedeværelsen av målnukleinsyresekvensen.

24. Fremgangsmåte ifølge krav 23, hvor nukleotidsekvensen som er hybridiserbar med PO i CO, omfatter en nukleotidsekvens som er hybridiserbar med måldelen av PO.

25. Fremgangsmåte ifølge krav 23, hvor fremgangsmåten videre omfatter å gjenta trinnene (a)-(b), (a)-(c) eller (a)-(d) med denaturering mellom repeterende sykluser.

5

26. Fremgangsmåte ifølge krav 23, hvor trinnene (a)-(d) utføres i en reaksjonsbeholder eller i atskilte reaksjonsbeholdere.

27. Fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av kravene 23-26, hvor
10 fremgangsmåten utføres i nærvær av en nedstrøms primer.

28. Fremgangsmåte for detektering av en målnukleinsyresekvens fra et DNA eller en blanding av nukleinsyrer ved hjelp av en POCH ("PO Cleavage and Hybridization")-analyse på et fast substrat, omfattende:

- 15 (a) hybridisering av målnukleinsyresekvensen med et probe-oligonukleotid (PO); hvor PO-et omfatter en måldel som omfatter en hybridiserende nukleotidsekvens som er komplementær til målnukleinsyresekvensen; PO har et enkelt-merke;
- (b) å bringe resultatet fra trinnet (a) i kontakt med et enzym som har 5'-
20 nukleaseaktiviteten under betingelser for spalting av PO; hvor PO hybridiseres med målnukleinsyresekvensen, PO spaltes av enzymet som har 5'-nukleaseaktiviteten for å fremstille et enkelt-merke inneholdende fragment;
- (c) utførelse av en hybridiseringsreaksjon ved å bringe resultatet av trinn
25 (b) i kontakt med et innfangende oligonukleotid (CO) som er immobilisert på det faste substratet; hvor CO omfatter en nukleotidsekvens som er hybridiserbar med PO; hvor hybridiseringsreaksjonen utføres under betingelser slik at det enkelt-merke inneholdende fragmentet ikke hybridiseres med CO, og et uspaltet PO hybridiseres med CO for å danne et

uspaltet PO/CO-dupleks; og

(d) deteksjon av forekomst av spaltingen av PO ved å måle et signal fra enkelt-merket på det faste substratet; hvorved forekomsten av PO-spaltingen indikerer tilstedeværelsen av målnukleinsyresekvensen.

5

29. Fremgangsmåte for detektering av en målnukleinsyresekvens fra et DNA eller en blanding av nukleinsyrer ved hjelp av en POCH ("PO Cleavage and Hybridization")-analyse på et fast substrat, omfattende:

- (a) hybridisering av målnukleinsyresekvensen med et probe-oligonukleotid (PO); hvor PO-et omfatter en måldel som omfatter en hybridiserende nukleotidsekvens som er komplementær til målnukleinsyresekvensen; PO har et interaktiv dobbelt-merke som omfatter et donormolekyl og et akseptormolekyl;
- (b) å bringe resultatet fra trinnet (a) i kontakt med et enzym som har 5'-nukleaseaktiviteten under betingelser for spalting av PO; hvor PO hybridiseres med målnukleinsyresekvensen, PO spaltes av enzymet som har 5'-nukleaseaktiviteten for å separere det interaktive dobbelt-merket, hvorved et donorholdig fragment og et akseptorholdig fragment frembringes;
- (c) utførelse av en hybridiseringsreaksjon ved å bringe resultatet av trinn (b) i kontakt med et innfangende oligonukleotid (CO) som er immobilisert på det faste substratet; hvor CO omfatter en nukleotidsekvens som er hybridiserbar med PO; hvor hybridiseringsreaksjonen utføres under betingelser slik at minst ett av det donorholdige fragmentet og det akseptorholdige fragmentet ikke hybridiseres med CO, og et uspaltet PO hybridiseres med CO for å danne et uspaltet PO/CO-dupleks; hvor et signal fra det uspaltede PO/CO-duplekset er differensiert fra et signal som er tilveiebrakt på det tidspunkt da minst ett av det donorholdige fragmentet og det akseptorholdige fragmentet ikke hybridiseres med CO; og
- 10
- 15
- 20
- 25

(d) deteksjon av forekomst av spaltingen av PO ved å måle et signal fra det interaktive dobbelt-merket på det faste substratet; hvorved forekomsten av PO-spaltingen indikerer tilstedeværelsen av målnukleinsyresekvensen.

5

30. Fremgangsmåte for detektering av en målnukleinsyresekvens fra et DNA eller en blanding av nukleinsyrer ved hjelp av en POCH ("PO Cleavage and Hybridization")-analyse på et fast substrat, omfattende:

- (a) hybridisering av målnukleinsyresekvensen med et probe-oligonukleotid (PO); hvor PO-et omfatter en måldel som omfatter en hybridiserende nukleotidsekvens som er komplementær til målnukleinsyresekvensen; 10
- (b) å bringe resultatet fra trinnet (a) i kontakt med et enzym som har 5'-nukleaseaktiviteten under betingelser for spalting av PO; hvor PO hybridiseres med målnukleinsyresekvensen, PO spaltes av enzymet som har 5'-nukleaseaktiviteten for å fremstille et spaltet fragment; 15
- (c) utførelse av en hybridiseringsreaksjon i nærvær av et interkaleringsmiddel ved å bringe resultatet av trinn (b) i kontakt med et innfangende oligonukleotid (CO) som er immobilisert på det faste substratet; hvor CO omfatter en nukleotidsekvens som er hybridiserbar med PO; hvor hybridiseringsreaksjonen utføres under betingelser slik at 20
- det spaltede fragment ikke hybridiseres med CO, og et uspaltet PO hybridiseres med CO for å danne et uspaltet PO/CO-dupleks; og
- (d) detektering av forekomst av spaltingen av PO ved å måle et signal fra interkaleringsmiddelet på det faste substratet; hvorved forekomsten av PO-spaltingen indikerer tilstedeværelsen av målnukleinsyresekvensen. 25

31. Anvendelse av et kit i henhold til en fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av kravene 1-27, hvor kittet omfatter:

- (a) et probe-oligonukleotid (PO) omfattende en måldel som omfatter en

hybridiserende nukleotidsekvens som er komplementær til
målnukleinsyresekvensen;

(b) et oppstrøms oligonukleotid som omfatter en hybridiserende
nukleotidsekvens som er komplementær til målnukleinsyresekvensen; hvor
5 det oppstrøms oligonukleotidet befinner seg oppstrøms for PO; det
oppstrøms oligonukleotidet eller dets utvidede steng induserer spalting av
PO-et ved et enzym som har en 5'-nukleaseaktivitet; og

(c) et innfangende oligonukleotid (CO) som er immobilisert på det faste
substratet; hvor CO består av en nukleotidsekvens som er hybridiserbar
10 med PO, hvorved en PO som ikke er spaltet av enzymet som har 5'-
nukleaseaktiviteten, hybridiseres med CO for å danne et uspaltet PO/CO-
dupleks.

32. Anvendelse ifølge krav 31, hvor PO har et enkelt-merke eller et interaktiv
15 dobbelt-merke.

33. Anvendelse ifølge krav 31, hvor PO er et 3'-merket PO som i sin 3'-del
ytterligere omfatter en merkingsdel som har en nukleotidsekvens som ikke er
komplementær til målnukleinsyresekvensen eller et 5'-merket PO som i sin 5'-
20 del ytterligere omfatter en merkingsdel som har en nukleotidsekvens som ikke
er komplementær til målnukleinsyresekvensen, og nukleotidsekvensen som er
hybridiserbar med PO i CO omfatter en nukleotidsekvens som er hybridiserbar
med merkingsdelen av PO.

25 34. Anvendelse ifølge krav 31, hvor PO er et 3'-merket PO som i sin 3'-del
ytterligere omfatter en merkingsdel som har en nukleotidsekvens som ikke er
komplementær til målnukleinsyresekvensen eller et 5'-merket PO som i sin 5'-
del ytterligere omfatter en merkingsdel som har en nukleotidsekvens som ikke
er komplementær til målnukleinsyresekvensen, og nukleotidsekvensen som er

hybridiserbar med PO i CO omfatter en nukleotidsekvens som er hybridiserbar med en del av merkingsdelen og en del av måldelen av PO.

35. Anvendelse ifølge krav 31, hvor kittet videre omfatter et enzym som har en 5'-nukleaseaktivitet.

36. Anvendelse ifølge krav 31, hvor det oppstrøms oligonukleotidet har en delvis overlappende sekvens med måldelen av PO.