



(12) Translation of
European patent specification

(11) NO/EP 3464637 B1

NORWAY

(19) NO
(51) Int Cl.
C12Q 1/68 (2018.01)
C12Q 1/6883 (2018.01)

Norwegian Industrial Property Office

(45)	Translation Published	2021.10.11
(80)	Date of The European Patent Office Publication of the Granted Patent	2021.06.23
(86)	European Application Nr.	17805833.5
(86)	European Filing Date	2017.05.30
(87)	The European Application's Publication Date	2019.04.10
(30)	Priority	2016.05.30, US, 201662343050 P
(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	The Chinese University Of Hong Kong, Office of Research and Knowledge Transfer Services Room 301 Pi Ch'iu Building Shatin New Territories, Hong Kong 999077, Kina
(72)	Inventor	LO, Yuk-Ming Dennis, 4th Floor 7 King Tak StreetHomantin, KowloonHong Kong 999077, Kina CHIU, Rossa Wai Kwun, House 31 Double Haven52 Ma Lok PathShatin, New TerritoriesHong Kong 999077, Kina CHAN, Kwan Chee, Flat C 15th Floor Block 5 Peak One Mei Tin RoadShatin, New TerritoriesHong Kong 999077, Kina SUN, Kun, Room 503Li Ka Shing Medical Sciences BuildingPrince of Wales HospitalShatin, Hong Kong, Kina
(74)	Agent or Attorney	ZACCO NORWAY AS, Postboks 488, 0213 OSLO, Norge

(54)	Title	DETECTING HEMATOLOGICAL DISORDERS USING CELL-FREE DNA IN BLOOD
(56)	References Cited:	WO-A1-2014/043763 WO-A1-2016/008451 US-A1- 2011 028 333 US-A1- 2009 176 655 US-A1- 2014 080 715

CHISAKO IRIYAMA ET AL: "Using peripheral blood circulating DNAs to detect CpG global methylation status and genetic mutations in patients with myelodysplastic syndrome", BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, vol. 419, no. 4, 20 February 2012 (2012-02-20), pages 662-669, XP028475114, ISSN: 0006-291X, DOI: 10.1016/J.BBRC.2012.02.071 [retrieved on 2012-02-20]

KUN SUN ET AL: "Plasma DNA tissue mapping by genome-wide methylation sequencing for noninvasive prenatal, cancer, and transplantation assessments", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES (PNAS), vol. 112, no. 40, 6 October 2015 (2015-10-06), pages E5503-E5512, XP055374200, US ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/pnas.1508736112

MARIE KORABECNA ET AL: "Methylation Status of Immune Response Genes Promoters in Cell-Free DNA Differs in Hemodialyzed Patients with Diabetic Nephropathy According to the Intensity of Anemia Therapy", BLOOD PURIFICATION., vol. 36, no. 3-4, 20 December 2013 (2013-12-20), pages 280-286, XP055636477, CH ISSN: 0253-5068, DOI: 10.1159/000356094

SUN, KUN ET AL.: 'Plasma DNA tissue mapping by genome-wide methylation sequencing for noninvasive prenatal, cancer, and transplantation assessments' PNAS 21 September 2015, XP055374200

LUI, Y.Y.N. ET AL.: 'Predominant Hematopoietic Origin of Cell -free DNA in Plasma and Serum after Sex-mismatched Bone Marrow Transplantation' CLINICAL CHEMISTRY vol. 48, 31 March 2002, pages 421 - 427, XP055443838

CHAN, K.C.A. ET AL.: 'Noninvasive detection of cancer-associated genomewide hypomethylation and copy number aberrations by plasma DNA bisulfite sequencing' PNAS vol. 110, no. 47, 19 November 2013, pages 18761 - 18768, XP055181312

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/>

3464637

Patentkrav

1. Fremgangsmåte for å analysere en blodprøve fra et pattedyr, idet fremgangsmåten omfatter:

- 5 å oppnå en cellefri blanding av blodprøven, idet den cellefrie blanding innbefatter cellefritt DNA fra en flerhet av cellelinjer;
- å bringe DNA-fragmenter i den cellefrie blanding i kontakt med et assay som svarer til én eller flere differensielt metylerte regioner, idet hver av den ene eller de flere differensielt metylerte regioner er spesifikk for en bestemt hematologisk cellelinje ved å være hypometylert eller hypermetylert relativt
- 10 til andre cellelinjer, hvor den bestemte hematologiske cellelinje er røde blodceller;
- å påvise et første antall metylerte eller umetylerte DNA-fragmenter i den cellefrie blanding på den ene eller de flere differensielt metylerte regioner basert på fra assayet oppnådde signaler;
- 15 å bestemme et metyleringsnivå under anvendelse av det første antall; og
- å sammenligne metyleringsnivået med én eller flere cut-off-verdier som del av å bestemme en klassifikasjon av en hematologisk lidelse hos pattedyret, hvor den hematologiske lidelse er anemi.

20 **2.** Fremgangsmåte ifølge krav 1, som videre omfatter:

- å bestemme et totalt antall DNA-fragmenter i den cellefrie blanding på den ene eller de flere differensielt metylerte regioner; og
- å bestemme metyleringsnivået under anvendelse av det første antall og det samlede antall.

25

3. Fremgangsmåte ifølge krav 1 eller 2, som videre omfatter:

 å bestemme et volum av den cellefrie blanding, hvor metyleringsnivået bestemmes under anvendelse av det første antall og volumet av den cellefrie blanding.

30 **4.** Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av de foregående krav, hvor å oppnå den cellefrie blanding innbefatter:

3464637

å atskille den cellefrie blanding fra blodprøven, idet den cellefrie blanding omfatter plasma eller serum.

- 5. Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av de foregående krav, som videre**
- 5 omfatter å identifisere den ene eller de flere differensielt metylerte regioner ved:
- å oppnå metyleringsindekser av en flerhet av steder for hver av flerheten av cellelinjer, innbefattende den bestemte hematologiske cellelinje og de andre cellelinjer;
 - på hvert sted av flerheten av steder, å sammenligne metyleringsindeksene
 - 10 av flerheten av cellelinjer;
 - å identifisere ett eller flere steder av flerheten av steder som har en metyleringsindeks i den bestemte hematologiske cellelinje, som er under/over en første metyleringsterskelverdi, og metyleringsindekser i hver av de andre cellelinjer som er over/under en andre metyleringsterskelverdi;
 - 15 og
 - å identifisere en differensielt metylert region som inneholder det ene eller de flere steder.
- 6. Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av de foregående krav, som videre**
- 20 omfatter å bestemme den ene eller de flere cut-off-verdier, innbefattende:
- å oppnå en flerhet av prøver, hvor hver prøve er kjent for å ha en bestemt klassifikasjon av den hematologiske lidelse, idet flerheten av prøver har minst to klassifikasjoner av den hematologiske lidelse;
 - å bestemme et metyleringsnivå av den ene eller de flere differensielt
 - 25 metylerte regioner for hver av flerheten av prøver;
 - å identifisere et første sett prøver som har en første klassifikasjon av den hematologiske lidelse;
 - å identifisere et andre sett prøver som har en andre klassifikasjon av den hematologiske lidelse, idet det første sett prøver kollektivt har et statistisk
 - 30 høyere metyleringsnivå enn det andre sett prøver; og
 - å bestemme en cut-off-verdi som skiller mellom det første sett prøver og det andre sett prøver innenfor en spesifisert spesifisitet og sensitivitet.

3464637

7. Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av de foregående krav, som videre omfatter:

- 5 å bestemme at den hematologiske lidelse foreligger basert på å sammenligne metyleringsnivået med den ene eller de flere cut-off-verdier; og
 å gjennomføre en benmargsbiopsi som reaksjon på bestemmelse av at den hematologiske lidelse foreligger.

8. Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av de foregående krav, hvor den ene eller de flere differensielt metylerte regioner omfatter CpG-steder.

10

9. Fremgangsmåte ifølge krav 8, hvor en første region av den ene eller de flere differensielt metylerte regioner omfatter en flerhet av CpG-steder som er innenfor 100 bp av hverandre, og hvor flerheten av CpG-steder alle er hypometylerte eller hypermetylerte.

15

10. Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av de foregående krav, som videre omfatter:

- å måle et hemoglobinnivå av blodprøven;
 å sammenligne hemoglobinnivået med en hemoglobinterskelverdi; og
20 å bestemme klassifikasjonen av den hematologiske lidelse ytterligere basert på sammenligningen av hemoglobinnivået med hemoglobinterskelnivået.

11. Fremgangsmåte ifølge krav 10, hvor bestemmelse av klassifikasjonen av anemi skiller mellom økt erytropoietisk aktivitet fra β -talassemi, mellomliggende erytropoietisk aktivitet fra jernmangelanemi, og redusert erytropoietisk aktivitet fra aplastisk anemi eller kronisk nyresvikt.

12. Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av de foregående krav, hvor klassifikasjonen av den hematologiske lidelse svarer til økt erytropoietisk aktivitet, mellomliggende erytropoietisk aktivitet eller redusert erytropoietisk aktivitet.

30

13. Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av de foregående krav, hvor minst én av den ene eller de flere differensielt metylerte regioner er i FECH-genet, i

3464637

kromosom 12 på genomkoordinater 48227688 – 48227701 i humant referansegenom hg19, eller i kromosom 12 på genomkoordinater 48228144 – 48228154 i det humane referansegenom hg19.

- 5 **14.** Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av de foregående krav, hvor den ene eller de flere differensielt metylerte regioner er hypometylerte.
- 15.** Datamaskinprogram som omfatter en flerhet av instruksjoner som kan utføres på et datamaskinsystem, som når således utført, styrer datamaskinsystemet til å
- 10 analysere en blodprøve av et pattedyr ved å gjennomføre:
- påvisning av et første antall metylerte eller umetylerte DNA-fragmenter i en cellefri blanding av blodprøven på én eller flere differensielt metylerte regioner basert på signaler oppnådd fra et assay, idet hver av den ene eller de flere differensielt metylerte regioner er spesifikk for en bestemt
- 15 hematologisk cellelinje ved at de er hypometylert eller hypermetylert relativt til andre cellelinjer, hvor den bestemte hematologiske cellelinje er røde blodceller;
- bestemmelse av et metyleringsnivå under anvendelse av det første antall; og sammenligning av metyleringsnivået med én eller flere cut-off-verdier som
- 20 del av å bestemme en klassifikasjon av en hematologisk lidelse hos pattedyret, hvor den hematologiske lidelse er anemi.