



(12) Translation of
European patent specification

(11) NO/EP 3494229 B1

NORWAY

(19) NO
(51) Int Cl.
C12Q 1/6811 (2018.01)
C12N 15/10 (2006.01)
C12N 15/115 (2010.01)
C12Q 1/6897 (2018.01)

Norwegian Industrial Property Office

(45)	Translation Published	2024.03.18
(80)	Date of The European Patent Office Publication of the Granted Patent	2023.10.25
(86)	European Application Nr.	17790843.1
(86)	European Filing Date	2017.08.03
(87)	The European Application's Publication Date	2019.06.12
(30)	Priority	2016.08.03, US, 201662370599 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	Meiragtx UK II Limited, 92 Britannia Walk, London N1 7NQ, Storbritannia
(72)	Inventor	GUO, Xuecui, 1 Bungtown Road, Cold Spring Harbor, NY 11724, USA FENG, Lei, 1207 Neill Avenue, Bronx, NY 10461, USA FORBES, Alexandria, 14 East 10th Street Apt. 2, New York, NY 10003, USA

(54)	Title	HIGH THROUGHPUT CELL-BASED SCREENING FOR APTAMERS
(56)	References Cited:	WO-A1-2016/126747, WO-A1-2016/166303, US-A1- 2015 175 981, US-A1- 2011 111 411, US-A1- 2010 221 821, US-A1- 2010 184 810, US-A1- 2005 197 311, US-A1- 2004 126 882 WANG Z ET AL: "Systematic Identification and Analysis of Exonic Splicing Silencers", CELL, vol. 119, no. 6, 17 December 2004 (2004-12-17), pages 831-845, XP055433250, US ISSN: 0092-8674, DOI: 10.1016/j.cell.2004.11.010 THOMPSON K M ET AL: "Group I aptazymes as genetic regulatory switches", BMC BIOTECHNOLOGY, BIOMED CENTRAL LTD. LONDON, GB, vol. 2, no. 21 Cited December 27, 2002, 4 December 2002 (2002-12-04), pages 1-12, XP002615440, ISSN: 1472-6750 CHEAH M T ET AL: "Control of alternative RNA splicing and gene expression by eukaryotic riboswitches", NATURE, MACMILLAN JOURNALS LTD., ETC, vol. 447, 24 May 2007 (2007-05-24), pages 497-501, XP008119355, ISSN: 0028-0836, DOI: 10.1038/NATURE05769 [retrieved on 2007-04-29] -& CHEAH M T ET AL: "Supplementary Information. Control of alternative RNA splicing and gene expression by eukaryotic riboswitches.", NATURE, vol. 447, no. 7143, 29 April 2007 (2007-04-29), pages 497-500, XP055434005, ISSN: 0028-0836, DOI: 10.1038/nature05769 BOCOBZA S ET AL: "Riboswitch-dependent gene regulation and its evolution in the plant kingdom", GENES AND DEVELOPMENT, COLD SPRING HARBOR LABORATORY PRESS, PLAINVIEW, NY, US, vol. 21, no. 22, 1 November 2007 (2007-11-01), pages 2874-2879, XP002666880, ISSN: 0890-9369, DOI: 10.1101/GAD.443907 WEIGAND J E ET AL: "Tetracycline aptamer-controlled regulation of pre-mRNA splicing in yeast", NUCLEIC ACIDS RESEARCH, INFORMATION RETRIEVAL LTD, GB, vol. 35, no. 12, 1 June 2007 (2007-06-01), pages 4179-4185, XP002615441, ISSN: 0305-1048, DOI: 10.1093/NAR/GKM425 [retrieved on 2007-06-12]

CROFT M T ET AL: "Thiamine biosynthesis in algae is regulated by riboswitches", PROCEEDINGS NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES PNAS, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, US, vol. 104, no. 52, 26 December 2007 (2007-12-26), pages 20770-20775, XP002666883, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/PNAS.0705786105

CULLER S J ET AL: "Reprogramming Cellular Behavior with RNA Controllers Responsive to Endogenous Proteins", SCIENCE, vol. 330, no. 6008, 26 November 2010 (2010-11-26), pages 1251-1255, XP055434110, ISSN: 0036-8075, DOI: 10.1126/science.1192128 -& CULLER S J ET AL: "Supporting Online Material for Reprogramming Cellular Behavior with RNA Controllers Responsive to Endogenous Proteins", SCIENCE, vol. 330, no. 6008, 25 November 2010 (2010-11-25), pages 1251-1255, XP055434107, ISSN: 0036-8075, DOI: 10.1126/science.1192128

KOTULA J W ET AL: "Aptamer-Mediated Delivery of Splice-Switching Oligonucleotides to the Nuclei of Cancer Cells", NUCLEIC ACID THERAPEUTICS, MARY ANN LIEBERT, INC. PUBLISHERS, US, vol. 22, no. 3, 15 June 2012 (2012-06-15), pages 187-195, XP002745322, ISSN: 2159-3337, DOI: 10.1089/NAT.2012.0347

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 valg av en aptamer som binder en ligand i eukaryote celler, omfattende trinnene:

- (a) tilveiebringelse av et bibliotek med aptamerer,
- (b) innføring av elementene i biblioteket av aptamerer i en polynukleotidkassett for den ligandmedierte ekspresjonen av et rapportørgen for å lage et bibliotek av ribobrytere,
- (c) innføring av biblioteket av ribobrytere i eukaryote celler, og
- (d) bringe de eukaryote cellene i kontakt med en ligand, og
- (e) måling av ekspresjon av rapportørgenet,

hvor polynukleotidkassetten omfatter et alternativt spleiset ekson, flankert av et 5'-intron og et 3'-intron, og en ribobryter omfattende (i) en effektorregion omfattende en stamme som inkluderer 5'-spleisestedsekvensen til 3'-intronet og en sekvens komplementær til 5'-spleisestedsekvensen til 3'-intronet, og (ii) en aptamer posisjonert mellom 5'-spleisestedsekvensen til 3'-intronet og den komplementære sekvensen, hvor det alternativt spleisede eksonet omfatter et stoppkodon som er i ramme med rapportørgenet når det alternativt spleisede eksonet spleises inn i rapportørgenet mRNA.

2. Fremgangsmåten ifølge krav 1, hvor biblioteket av aptamerer deles inn i et mindre aptamerbibliotek før det innføres i polynukleotidkassetten omfattende trinnene:

- (a) tilveiebringelse av et randomisert aptamerbibliotek hvor aptamerene i biblioteket omfatter flere 5'- og 3'-konstante regioner og ett eller flere randomiserte nukleotider,
- (b) utførelse av en to-syklus PCR ved anvendelse av det randomiserte aptamerbiblioteket som malen og en første primer og andre primer som er komplementære til 5'- og 3'-konstante regioner,
- (c) isolering av produktene fra to-syklus PCR, og
- (d) PCR-amplifisering av en delmengde av de isolerte produktene fra to-syklus-PCR ved anvendelse av primere komplementære med en delmengde av de unike 5'- og 3'-konstante regionene.

3. Fremgangsmåten ifølge krav 1 eller 2, hvor biblioteket av ribobrytere deles inn i ett eller flere delbiblioteker av ribobrytere før de innføres i de eukaryote cellene, eventuelt, hvor biblioteket av ribobrytere deles inn i delbiblioteker omfattende trinnene:

- (a) innføring av ribobryterbiblioteket i bakterier;

(b) samling av bakteriekloner og ekstrahering av plasmid-DNA for å oppnå plasmiddelbiblioteker av ribobrytere for å generere ett eller flere primære delbiblioteker;

(c) eventuelt generering av sekundære delbiblioteker av ribobrytere fra et primært plasmiddelbibliotek av ribobrytere ved innføring av et primært delbibliotek i bakterier, samling av bakteriekloner og isolering av plasmid-DNA-et.

4. Fremgangsmåte for valg av en ligand som binder en aptamer i en eukaryot celle, omfattende trinnene:

(a) tilveiebringelse av et bibliotek av ligander,

(b) tilveiebringelse av en polynukleotidkasset for den ligandmedierte ekspresjonen av et rapportørgen,

(c) innføring av polynukleotidkassetten i den eukaryote cellen,

(d) bringe individuelle grupper av den eukaryote cellen i kontakt med elementer av biblioteket av ligander, og

(e) måling av ekspresjonen til rapportørgenet,

hvor polynukleotidkassetten omfatter et alternativt spleiset ekson, flankert av et 5'-intron og et 3'-intron, og en ribobryter omfattende (i) effektorregion omfattende en stamme som inkluderer 5'-spleisestedsekvensen til 3'-intronet og en sekvens komplementær til 5'-spleisestedsekvensen til 3'-intronet, og (ii) aptamer posisjonert mellom 5'-spleisestedsekvensen til 3'-intronet og den komplementære sekvensen, hvor det alternativt spleisede eksonet omfatter et stoppkodon som er i ramme med rapportørgenet når det alternativt spleisede eksonet spleises inn i rapportørgenet mRNA.

5. Fremgangsmåten ifølge er hvilket som helst av kravene 1, 3 eller 4, hvor liganden er

(a) lite molekyl; eller

(b) molekyl fremstilt av den eukaryote cellen valgt fra gruppen som består av en metabolitt, nukleinsyre, vitamin, kofaktor, lipid, monosakkarid og andre budbringer.

6. Fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av kravene 1, 3 eller 4, hvor den eukaryote cellen velges fra gruppen som består av en pattedyr-celle, en insekt-celle, en plantecelle og en sopp-celle.

7. Fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av kravene 1, 3 eller 4, hvori rapportørgenet velges fra gruppen som består av

- (a) fluorescerende protein, luciferase, β -galaktosidase og pepperrotperoksidase; eller
- (b) cytokin, et signalmolekyl, et veksthormon, et antistoff, et regulatorisk RNA, et terapeutisk protein eller et peptid.

8. Fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av kravene 1, 3 eller 4, hvori 5'- og 3'-intronene

- (a) avledes fra intron 2 av det humane β -globingenet;
- (b) hver uavhengig fra 50 til 300 nukleotider i lengde; eller
- (c) hver uavhengig fra 125 til 240 nukleotider i lengde.

9. Fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av kravene 1, 3 eller 4, hvori effektorregionstammen er

- (a) 7 til 20 basepar i lengde; eller
- (b) 8 til 11 basepar i lengde.

10. Fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av kravene 1, 3 eller 4, hvori det alternativt spleisede eksonet

- (a) avledes fra gruppen som består av ekson 2 av det humane dihydrofolatreduktasegenet (DHFR), mutant human Wilms tumor 1 ekson 5, mus kalsium/kalmodulinavhengig proteinkinase II deltaekson 16 og SIRT1 ekson 6;
- (b) er et modifisert ekson 2 fra humant DHFR;
- (c) ikke avledes fra et naturlig forekommende ekson; eller
- (d) omfatter én eller flere av gruppen som består av en endret ekson-spleiseforsterker, en endret ekson-spleisedemper, en tilsatt ekson-spleiseforsterker og en tilsatt ekson-spleisedemper.

11. Fremgangsmåten ifølge krav 1 eller 3, hvori aptamerbiblioteket omfatter aptamerer som har ett eller flere randomiserte nukleotider.

12. Fremgangsmåten ifølge krav 2 eller krav 3, hvori den første eller den andre primeren i to-syklus PCR omfatter en markør valgt fra gruppen som består av biotin,

digoksinen (DIG), bromdeoksyridin (BrdU), fluorofor og en kjemisk gruppe anvendt i klikk-kjemi.