



(12) Translation of
European patent specification

(11) NO/EP 3581662 B1

NORWAY

(19) NO

(51) Int Cl.

C12Q 1/6806 (2018.01)

C12N 15/10 (2006.01)

C12Q 1/686 (2018.01)

C12Q 1/689 (2018.01)

Norwegian Industrial Property Office

(45)	Translation Published	2022.08.29
(80)	Date of The European Patent Office Publication of the Granted Patent	2022.06.15
(86)	European Application Nr.	19166149.5
(86)	European Filing Date	2012.04.26
(87)	The European Application's Publication Date	2019.12.18
(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
(62)	Divided application	EP2702192, 2012.04.26
(73)	Proprietor	Longhorn Vaccines and Diagnostics, LLC, 2 Bethesda Metro Center, Suite 910, Bethesda, MD 20814, USA
(72)	Inventor	FISCHER, Gerald W, 6417 Lybrook Drive, Bethesda, MD 20817, USA DAUM, Luke T., 318 Larkwood Drive, San Antonio, TX 78209, USA
(74)	Agent or Attorney	Nordic Patent Service A/S, Bredgade 30, 1260 KØBENHAVN K, Danmark

(54)	Title	COMPOSITIONS AND METHODS FOR DETECTING AND IDENTIFYING NUCLEIC ACID SEQUENCES IN BIOLOGICAL SAMPLES
(56)	References Cited:	US-A1- 2010 209 927 US-A1- 2010 151 477 WO-A1-2010/066908 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] 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]

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 deteksjon av en mikroorganisme i en biologisk prøve omfattende som komponenter:

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

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

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

et albumin valgt fra gruppen som består av bovint serumalbumin, humant serumalbumin, geiteserumalbumin, pattedyralbumin og en hvilken som helst 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, samlet til stede i sammensetningen i en konsentrasjon på 50 mM til 1 M;

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-piperazinetansulfonsyre (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-aminoetansulfonsyre (ACES), piperazin-1,4-bis(2-etansulfonsyre) (PIPES), bikarbonat, fosfat og en hvilken som helst kombinasjon derav, 25 til stede i sammensetningen i en konsentrasjon på 1 mM til 1 M og med en pH på 6,5 til 9,0, hvori bufferens pKa er innenfor en enhet av pH-en til 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 deteksjonssonde som spesifikt binder til en PCR-amplifisert nukleinsyresekvens som er spesifikk for mikroorganismen;

og et par av PCR-primere konfigurert til å amplifisere med PCR nukleinsyresekvensen som er spesifikk for mikroorganismen, samlet til stede i sammensetningen i 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 mikroorganismen er en bakterie, et virus, en sopp eller en parasitt.

3. Sammensetning ifølge krav 2, hvori mikroorganismen er et virus, fortrinnsvis hvori viruset er influensavirus, mer foretrukket H1N1, H2N2, H3N3 eller H5N1.

4. Sammensetning ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 3, hvori sammensetningen opprettholder PCR-amplifikasjonsaktivitet etter å ha blitt tint og omfryst ti ganger.

5. Sammensetning ifølge et hvilket som helst foregående krav, hvori det ene eller flere fargestoffene velges fra gruppen som består av fluorescein, ROX™ og 5-karboksy-X-rodamin.

6. Sammensetning ifølge et hvilket som helst foregående krav, 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.

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

8. Fremgangsmåte for deteksjon av en mikroorganisme i en biologisk prøve, omfattende: å bringe den biologiske prøven i kontakt med sammensetningen ifølge et hvilket som helst foregående krav for å danne en blanding;

å utføre flere varmesykliseringstrinn på blandingen for å danne et amplifiseringsprodukt som avledes fra nukleinsyren som er spesifikk for mikroorganismen;

å detektere nærværet eller fraværet av amplifikasjonsproduktet for å bestemme nærværet eller fraværet av et medlem av mikroorganismen i den biologiske prøven.

- 9.** Fremgangsmåte ifølge krav 8, videre omfattende å detektere en amplifisert sekvens av en kontrollnukleinsyre og bestemme kvaliteten eller kvantiteten på amplifikasjon som oppstod fra de flere varmesykluseringstrinnene.
- 5 **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 varmesyklusering og instruksjoner for å bestemme nærværet eller fraværet av mikroorganismen fra resultatene fra varmesykluseringen.