



(12) Translation of
European patent specification

(11) NO/EP 3885447 B1

NORWAY

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

Norwegian Industrial Property Office

(45)	Translation Published	2024.05.21
(80)	Date of The European Patent Office Publication of the Granted Patent	2024.01.10
(86)	European Application Nr.	21163406.8
(86)	European Filing Date	2017.05.30
(87)	The European Application's Publication Date	2021.09.29
(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
(62)	Divided application	EP3464637, 2017.05.30
(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, Office of Research and Knowledge Transfer Services Rm 301, Pi Ch'iu Building The Chinese University of Hong Kong, Shatin, New Territories Hong Kong SAR (China), Kina CHIU, Rossa Wai Kwun, Office of Research and Knowledge Transfer Services Rm 301, Pi Ch'iu Building The Chinese University of Hong Kong, Shatin, New Territories Hong Kong SAR (China), Kina CHAN, Kwan Chee, Office of Research and Knowledge Transfer Services Rm 301, Pi Ch'iu Building The Chinese University of Hong Kong, Shatin, New Territories Hong Kong SAR (China), Kina SUN, Kun, Office of Research and Knowledge Transfer Services Rm 301, Pi Ch'iu Building The Chinese University of Hong Kong, Shatin, New Territories Hong Kong SAR (China), 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-A1-2016/008451 WO-A1-2014/043763 US-A1- 2009 176 655 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
------	----------------------	---

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
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]

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. Dataimplementert fremgangsmåte for å måle en mengde av celler av en bestemt cellelinje i en biologisk prøve, idet fremgangsmåten omfatter:

5 å påvise et første antall av metylerte eller umetylerte DNA-fragmenter i en
cellefri blanding av det biologiske prøve på én eller flere differensielt
metylerte regioner basert på signaler som er oppnådd fra et assay, idet den
cellefri blanding innbefatter DNA fra en flerhet av cellelinjer, hvor hver av den
ene eller de flere differensielt metylerte regioner er spesifikk for den bestemte
cellelinje, ved å være hypometylert eller hypermetylert relativt til øvrige
10 cellelinjer;
å bestemme et første metyleringsnivå under anvendelse av det første antall;
å oppnå ett eller flere kalibreringsdatapunkter, hvor hvert
kalibreringsdatapunkt spesifiserer (1) en mengde celler av den bestemte
cellelinje, og (2) et kalibreringsmetyleringsnivå, og hvor det ene eller de flere
15 kalibreringsdatapunkter bestemmes fra en flerhet av kalibreringsprøver;
å sammenligne det første metyleringsnivå med et
kalibreringsmetyleringsnivå av i det minste ett kalibreringsdatapunkt; og
å anslå mengden av celler av den bestemte cellelinje i den biologiske prøve
basert på sammenligningen.

20

2. Fremgangsmåte ifølge krav 1, hvor den biologiske prøve er en blodprøve, og hvor den bestemte cellelinje er en bestemt hematologisk cellelinje.

25 **3.** Fremgangsmåte ifølge krav 2, hvor den bestemte hematologiske cellelinje er røde blodceller.

4. Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av de foregående krav, hvor i det minste én av den ene eller de flere differensielt metylerte regioner er i FECH-genet, i kromosom 12 på genomkoordinater 48227688 – 48227701 i humant referansegenom hg19, eller i kromosom 12 på genomkoordinater 48228144 –
30 48228154 i det humane referansegenom hg19.

- 5.** Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av de foregående krav, hvor den ene eller de flere differensielt metylerte regioner omfatter CpG-steder.
- 6.** Fremgangsmåte ifølge krav 5, 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.
- 7.** Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av de foregående krav, som videre omfatter å identifisere én av 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 cellelinje og de øvrige cellelinjer; på hvert sted av flerheten av steder, å sammenligne metyleringsindeksene av flerheten av cellelinjer;
 - å identifisere ett eller flere steder av flerheten av steder som har en metyleringsindeks i den bestemte cellelinje som er under/over en første metyleringsterskelverdi, og metyleringsindekser i hver av de øvrige cellelinjer som er over/under en andre metyleringsterskelverdi; og
 - å identifisere den ene av den ene eller de flere differensielt metylerte regioner som inneholder det ene eller de flere steder.
- 8.** Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av de foregående krav, 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 det første metyleringsnivå under anvendelse av det første antall og det samlede antall.
- 9.** Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av de foregående krav, som videre omfatter:
- å bestemme et volum av den cellefrie blanding; og

å bestemme det første metyleringsnivå under anvendelse av det første antall og volumet av den cellefri blanding.

5 **10.** Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av de foregående krav, hvor det ene eller de flere kalibreringsdatapunkter er en flerhet av kalibreringsdatapunkter, og hvor flerheten av kalibreringsdatapunkter danner en kalibreringskurve.

10 **11.** Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av de foregående krav, som videre omfatter å bestemme det ene eller de flere kalibreringsdatapunkter, innbefattende:
10 å oppnå flerheten av kalibreringsprøver;
 for hver kalibreringsprøve av flerheten av kalibreringsprøver:
 å måle mengden av celler av den bestemte cellelinje i kalibreringsprøven;
 å bestemme et respektivt antall metylerte eller umetylerte DNA-fragmenter i den cellefrie blanding på den ene eller de flere differensielt metylerte regioner
15 basert på signaler oppnådd fra det på kalibreringsprøven anvendte assay; og
 å bestemme et respektivt kalibreringsmetyleringsnivå under anvendelse av det respektive antall.

20 **12.** Fremgangsmåte ifølge krav 11, som videre omfatter å tilpasse en kalibreringsfunksjon til de respektive kalibreringsmetyleringsnivåer og de målte mengder av celler, hvor kalibreringsfunksjonen innbefatter det ene eller de flere kalibreringsdatapunkter.

25 **13.** Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av de foregående krav, hvor å sammenligne det første metyleringsnivå med kalibreringsmetyleringsnivået av i det minste ett kalibreringsdatapunkt innbefatter å legge inn det første metyleringsnivå i en kalibreringsfunksjon.

30 **14.** Computerprogram omfattende en flerhet av instruksjoner som kan utføres av et computersystem, som når således utført styrer computersystemet til å gjennomføre fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av de foregående krav.