

(19)



SUOMI - FINLAND
(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN
FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10)

FI/EP2992115 T4

(12)

**MUUTETUSSA MUODOSSA HYVÄKSYTYN EUROOPPAPATENTIN
KÄÄNNÖS
ÖVERSÄTTNING AV EUROPEISKT PATENT I ÄNDRAD FORM
TRANSLATION OF AMENDED EUROPEAN PATENT
SPECIFICATION**

(45)

Käännöksen kuulutuspäivä - Kungörelsedag av översättning -
Translation available to the public

15.05.2025

(97)

Muutetussa muodossa hyväksytyn Eurooppapatentin
myöntämispäivä - Meddelandedatum för det europeiska
patentet i ändrad form - Date of grant of amended European
patent

12.03.2025

(51)

Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassificering -
International patent classification
C12Q 1/68 (2018.01)

(96)

Eurooppapatenttihakemus - Europeisk patentansökan -
European patent application

EP14795452.3

(22)

Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date

30.04.2014

(97)

Patenttihakemuksen julkiseksitulosopäivä - Patentansökans
publiceringsdag - Patent application available to the public

12.03.2025

(86)

Kansainvälinen hakemus - Internationell
ansökan - International application

30.04.2014 PCT/US2014036258

(30)

Etuoikeus - Prioritet - Priority

30.04.2013 US 201361817651 P

28.03.2014 US 201461971974 P

(73)

Haltija - Innehavare - Holder

1• California Institute of Technology , 1200 East California Boulevard M/C 6-32 , Pasadena, CA 91125 , (US)

(72)

Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1• CAI, Long , c/o California Institute of Technology 1200 E. California Blvd MC 127-72 , Pasadena, CA 91125 , (US)

2• LUBECK, Eric , c/o California Institute of Technology 1200 E. California Blvd MC 127-72 , Pasadena, CA 91125 , (US)

3• ZHIYENTAYEV, Timur , c/o California Institute of Technology 1200 E. California Blvd MC 127-72 , Pasadena, CA 91125 , (US)

4• COSKUN, Ahmet , c/o California Institute of Technology 1200 E. California Blvd MC 127-72 , Pasadena, CA 91125 , (US)

5• HE, Ting-Fang , c/o California Institute of Technology 1200 E. California Blvd MC 127-72 , Pasadena, CA 91125 , (US)

6• SOHN, Chang, Ho , c/o California Institute of Technology 1200 E. California Blvd MC 127-72 , Pasadena, CA 91125 , (US)

7• SHAH, Sheel , c/o California Institute of Technology 1200 E. California Blvd MC 127-72 , Pasadena, CA 91125 , (US)

(74)

Asiamies - Ombud - Agent

Murgitroyd & Company , Mannerheimsvägen 12B , 00100 Helsingfors , (FI)

(54)

Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention

Molekyylien limitetty leimaus sekventiaalisella hybridisaatioviivakoodauksella

Multiplexmärkning av molekyler genom streckkodsmärkning med sekventiell hybridisering

MULTIPLEX LABELING OF MOLECULES BY SEQUENTIAL HYBRIDIZATION BARCODING

(56)

Viitejulkaisut - Anförda publikationer - References cited

WO-A2-03/102239; WO-A2-2010/148039; WO-A2-2011/112634; US-A1- 2010 221 708; US-A1- 2012 142 014;

Patenttivaatimukset

1. Menetelmä, joka käsittää seuraavat vaiheet:
 - (a) suoritetaan ensimmäinen kosketusvaihe, joka käsittää sen, että saatetaan
 5 solu, joka käsittää useita transkripteja, kosketukseen ensimmäisen joukon tunnistettavasti leimattujen oligonukleotidien kanssa, joista oligonukleotideista kukin kohdistuu transkriptiin ja on leimattu tunnistettavalla yksiköllä, niin että ensimmäinen joukko käsittää vähintään:
 - (i) ensimmäisen oligonukleotidin, joka kohdistuu ensimmäiseen
 10 transkriptiin solussa ja on leimattu ensimmäisellä tunnistettavalla yksiköllä; ja
 - (ii) toisen oligonukleotidin, joka kohdistuu toiseen transkriptiin solussa ja on leimattu ensimmäisellä tunnistettavalla yksiköllä;
 - (b) kuvataan solu ensimmäisen kosketusvaiheen jälkeen niin, että tunnistetaan
 15 ensimmäisen oligonukleotidijoukon hybridisoituminen niiden kohdesekvenssien kanssa;
 - (c) suoritetaan toinen kosketusvaihe, joka käsittää sen, että saatetaan solu kosketukseen toisen joukon tunnistettavasti leimattuja oligonukleotideja
 20 kanssa, joka toinen joukko sisältää oligonukleotideja, jotka kohdistuvat transkripteihin, joihin ensimmäinen joukko kohdistuu, niin että toinen joukko käsittää vähintään:
 - (i) kolmannen oligonukleotidin, joka on valinnaisesti sekvenssiltään identtinen ensimmäisen oligonukleotidin kanssa, ja joka kohdistuu ensimmäiseen transkriptiin; ja
 - 25 (ii) neljännen oligonukleotidin, joka on valinnaisesti sekvenssiltään identtinen toisen oligonukleotidin kanssa, ja joka kohdistuu toiseen transkriptiin, jolloin toinen joukko eroaa ensimmäisestä joukosta siinä, että vähintään yksi oligonukleotideista, joka on läsnä toisessa joukossa, leimataan eri tunnistettavalla yksiköllä kuin vastaava oligonukleotidi,
 30 joka kohdistuu samaan transkriptiin ensimmäisessä joukossa, niin että toisessa joukossa:
 - (iii) kolmas oligonukleotidi leimataan ensimmäisellä tunnistettavalla yksiköllä, toisella tunnistettavalla yksiköllä tai kolmannella tunnistettavalla yksiköllä; ja
 - 35 (iv) neljäs oligonukleotidi leimataan ensimmäisellä tunnistettavalla yksiköllä, toisella tunnistettavalla yksiköllä, kolmannella tunnistettavalla yksiköllä tai neljännellä tunnistettavalla yksiköllä, jolloin joko kolmas

oligonukleotidi leimataan eri tunnistettavalla yksiköllä kuin ensimmäinen oligonukleotidi, tai neljäs oligonukleotidi leimataan eri tunnistettavalla yksiköllä kuin toinen oligonukleotidi, tai sekä että;

- 5 (d) kuvataan solu toisen kosketusvaiheen jälkeen niin, että tunnistetaan toisen oligonukleotidijoukon hybridisoituminen niiden kohdesekvenssien kanssa; ja
- (e) valinnaisesti toistetaan kosketus- ja kuvausvaiheita käyttämällä joka kerta uutta joukkoa tunnistettavasti leimattuja oligonukleotideja, jotka käsittävät oligonukleotideja, jotka kohdistuvat transkripteihin, joihin ensimmäinen ja toinen joukko kohdistuvat,
- 10 jolloin kukin käytettävä joukko eroaa kaikista muista käytettävistä joukoista, koska siinä on vähintään yksi ero tunnistettavassa yksikössä, joka leimaa samaan transkriptiin kohdistuvat oligonukleotidit,
- jolloin vaiheet (a)–(e) tuottavat yksilöllisen molekyyliivakoodin kuhunkin yksilölliseen transkriptiin solussa.
- 15
2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, joka käsittää N kosketusvaihetta, jolloin N on vähintään kaksi ja jolloin kukin joukko tunnistettavasti leimattuja oligonukleotideja käsittää F tunnistettavaa yksikköä, jolloin F on vähintään kaksi.
- 20 3. Patenttivaatimuksen 2 mukainen menetelmä, jolloin N kosketusvaihetta ovat identtisiä.
4. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, jolloin kukin joukko tunnistettavasti leimattuja oligonukleotideja kohdistuu enintään $(F)^N$ kohdesekvenssiin.
- 25 5. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, joka lisäksi käsittää vaiheen, jossa poistetaan tunnistettavasti leimatut oligonukleotidit kunkin kuvausvaiheen jälkeen.
6. Patenttivaatimuksen 5 mukainen menetelmä, jolloin poistamisvaihe käsittää
- 30 tunnistettavasti leimattujen oligonukleotidien joukon saattamisen kosketukseen deoksiribonukleaasin kanssa, tunnistettavasti leimattujen oligonukleotidien joukon saattamisen kosketukseen ribonukleaasin kanssa, laservalkaisun, juosteen korvaamisen, formamidipesun tai niiden yhdistelmät.
- 35 7. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, jolloin vähintään yksi tunnistettavasti leimattu oligonukleotidi leimataan hybridisaatioketjureaktiolla (HCR).

8. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, jolloin kukin joukko käsittää kaksi tai useita tunnistettavasti leimattuja oligonukleotideja, jotka kohdistuvat samaan transkriptiin.
- 5 9. Patenttivaatimuksen 8 mukainen menetelmä, jolloin tunnistettavasta leimatut oligonukleotidit, jotka kohdistuvat samaan kohdesekvenssiin, leimataan fluoroforilla, joka tuottaa saman värin, tai samalla fluoroforilla.
- 10 10. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, jolloin kolmas oligonukleotidi leimataan eri tunnistettavalla yksiköllä kuin ensimmäinen oligonukleotidi, ja neljäs oligonukleotidi leimataan samalla tunnistettavalla yksiköllä kuin toinen oligonukleotidi; tai kolmas oligonukleotidi leimataan samalla tunnistettavalla yksiköllä kuin ensimmäinen oligonukleotidi, ja neljäs oligonukleotidi leimataan eri tunnistettavalla yksiköllä kuin toinen oligonukleotidi.
- 15 11. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, jolloin kolmas oligonukleotidi leimataan eri tunnistettavalla yksiköllä kuin ensimmäinen oligonukleotidi, ja neljäs oligonukleotidi leimataan eri tunnistettavalla yksiköllä kuin toinen oligonukleotidi.