

(19)



SUOMI - FINLAND
(FI)

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

- (10) **FI/EP3899037 T3**
- (12) **EUROOPPAPATENTIN KÄÄNNÖS**
ÖVERSÄTTNING AV EUROPEISKT PATENT
TRANSLATION OF EUROPEAN PATENT SPECIFICATION
- (45) Käännöksen kuulutuspäivä - Kungörelsedag av översättning - **21.11.2023**
Translation available to the public
- (97) Eurooppapatentin myöntämispäivä - Meddelandedatum för
det europeiska patentet - Date of grant of European patent **18.10.2023**
- (51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassificering -
International patent classification
C12Q 1/6844 (2018.01)
- (96) Eurooppapatenttihakemus - Europeisk patentansökan - **EP19842471.5**
European patent application
- (22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **18.12.2019**
- (97) Patenttihakemuksen julkiseksitilopäivä - Patentansökans
publiceringsdag - Patent application available to the public **27.10.2021**
- (86) Kansainvälinen hakemus - Internationell
ansökan - International application **18.12.2019 PCT/US2019067233**
- (30) Etuoikeus - Prioritet - Priority
19.12.2018 US US201862782279 P

- (73) Haltija - Innehavare - Holder
1• Illumina, Inc., 5200 Illumina Way, San Diego, CA 92122, (US)
- (72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor
1• FISHER, Jeffrey S., 5200 Illumina Way, San Diego, California 92122, (US)
2• GUO, Minghao, 5200 Illumina Way, San Diego, California 92122, (US)
- (74) Asiamies - Ombud - Agent
Novagraaf International SA, Chemin de l'Echo, 3, 1213 Onex, (CH)
- (54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention
MENETELMIÄ POLYNUKLEOTIDIKLUSTERIN KLONAALISUUSPRIORITEETIN PARANTAMISEKSI
METHODS FOR IMPROVING POLYNUCLEOTIDE CLUSTER CLONALITY PRIORITY

MENETELMIÄ POLYNUKLEOTIDIKLUSTERIN KLONAALISUUSPRIORITEETIN PARANTAMISEKSI

PATENTTIVAATIMUKSET

1. Menetelmä nukleiinihappojen monistamiseksi, jolloin menetelmä käsittää
5 seuraavat:
- (a) saadaan aikaan monistusreagenssi, joka käsittää
- (i) ryhmän monistuskohtia,
jolloin monistuskohdat käsittävät kaksi sieppausnukleiinihappojen populaatiota, joista populaatioista kumpikin käsittää sieppaussekvenssin,
10 jolloin ensimmäinen populaatio käsittää ensimmäisen sieppaussekvenssin ja toinen populaatio käsittää toisen sieppaussekvenssin, ja
- (ii) liuksen, joka käsittää useita erilaisia muokattuja kaksijuosteisia kohdenukleiinihappoja,
jolloin erilaiset muokatut kohdenukleiinihapot käsittävät 3'-päässä
15 ensimmäisen yleisen sieppaussitoutumissekvenssin, jolla on pienempi affiniteetti ensimmäistä sieppaussekvenssiä kohtaan kuin ensimmäisellä yleisellä sieppaussitoutumissekvenssillä, joka on 100-prosenttisesti komplementaarinen ensimmäiselle sieppaussekvenssille; ja
- (b) saatetaan monistusreagenssi reagoimaan niin, että muodostuu useita
20 monistuskohtia, joista jokainen käsittää amplikonien klonaalisen populaation liuksen yksittäisestä kohdenukleiinihaposta, jolloin valinnaisesti reagoimaan saattaminen käsittää seuraavat:
- (i) tuotetaan ensimmäinen amplikoni yksittäisestä kohdenukleiinihaposta, joka kuljetetaan kuhunkin monistuskohdista, ja
- 25 (ii) tuotetaan myöhemmät amplikonit yksittäisestä kohdenukleiinihaposta, joka kuljetetaan kuhunkin monistuskohtaan, tai ensimmäisestä amplikonista,

jolloin keskimääräinen nopeus, jolla myöhemmät amplikonit muodostetaan monistuskohdissa, on pienempi kuin keskimääräinen nopeus, jolla ensimmäinen amplikoni muodostetaan monistuskohdissa.

2. Menetelmä nukleiinihapposekvenssien määrittämiseksi, jolloin menetelmä
5 käsittää sellaisen sekvensointimenettelyn suorittamisen, joka havaitsee nähtävästi klonaalisen amplikonipopulaation kussakin ryhmän useista amplikonikohdista, jolloin ryhmä saadaan aikaan prosessilla, joka käsittää seuraavat:

(a) saadaan aikaan monistusreagenssi, joka käsittää

(i) useita monistuskohtia,

10 jolloin monistuskohdat käsittävät kaksi sieppausnukleiinihappojen populaatiota, joista populaatioista kumpikin käsittää sieppaussekvenssin,

jolloin ensimmäinen populaatio käsittää ensimmäisen sieppaussekvenssin ja toinen populaatio käsittää toisen sieppaussekvenssin, ja

(ii) liuksen, joka käsittää useita erilaisia muokattuja kohdenukleiinihappoja,

15 jolloin erilaiset muokatut kohdenukleiinihapot käsittävät 3'-päässä ensimmäisen yleisen sieppausitoutumissekvenssin, jolla on pienempi affiniteetti ensimmäistä sieppaussekvenssiä kohtaan kuin ensimmäisellä yleisellä sieppausitoutumissekvenssillä, joka on 100-prosenttisesti komplementaarinen ensimmäiselle sieppaussekvenssille; ja

20 (b) saatetaan monistusreagenssi reagoimaan.

3. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen menetelmä, jossa erilaisten muokattujen kohdenukleiinihappojen lukumäärä liuksessa ylittää monistuskohtien lukumäärän ryhmässä,

25 jolloin erilaisilla muokatuilla kohdenukleiinihappoilla on nesteyhteys useisiin monistuskohtiin ja

jolloin jokainen monistuskohta käsittää kapasiteetin useille nukleiinihappoille useiden eri nukleiinihappojen joukosta.

4. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, jossa reagoimaan saattaminen käsittää samanaikaisesti

(i) erilaisten muokattujen kohdenukleiinihappojen kuljettamisen monistuskohtiin keskimääräisellä kuljetusnopeudella ja

5 (ii) monistuskohdissa olevien kohdenukleiinihappojen monistamisen keskimääräisellä monistusnopeudella, jolloin keskimääräinen monistusnopeus on pienempi kuin keskimääräinen kuljetusnopeus.

5. Patenttivaatimuksen 2 mukainen menetelmä, jossa liuoksessa olevia useita erilaisia muokattuja kohdenukleiinihappoja on pitoisuudella, joka johtaa samanaikaisesti

10

(i) erilaisten muokattujen kohdenukleiinihappojen kuljettamiseen liuoksesta monistuskohtiin ja

(ii) monistuskohdissa olevien kohdenukleiinihappojen monistamiseen monistusnopeudella, jotta saadaan tuotettua ryhmä amplikonikohtia, joista

15

jokainen käsittää nähtävästi klonaalisen amplikonipopulaation.

6. Jommankumman patenttivaatimuksen 1–2 mukainen menetelmä, jossa ensimmäisen yleisen sieppaussitoutumissequenssin komplementaarisuus ensimmäisen sieppaussequenssin suhteen on alle 100 %; jolloin valinnaisesti

a) ensimmäinen yleinen sieppaussitoutumissequenssi käsittää 1, 2 tai 3

20

nukleotidiä, jotka eivät ole komplementaarisia ensimmäiselle sieppaussequenssille; tai

b) erilaiset muokatut kohdenukleiinihapot käsittävät ensimmäisten yleisten sieppaussitoutumissequenssien heterogeenisen populaation, jolloin

heterogeeninen populaatio käsittää yksittäisiä ensimmäisiä yleisiä

25

sieppaussitoutumissequenssejä, joissa on (i) 1, 2 tai 3 nukleotidiä, jotka eivät ole komplementaarisia ensimmäiselle sieppaussequenssille, tai (ii) jotka ovat 100-prosenttisesti komplementaarisia ensimmäiselle sieppaussequenssille, jolloin valinnaisesti

jolloin heterogeenisen populaation jäseniä, jotka ovat 100-prosenttisesti komplementaarisia ensimmäisen sieppaussekvenssin kanssa, on suurempana määränä kuin heterogeenisen populaation muita jäseniä, jolloin lisäksi valinnaisesti

5 heterogeeninen populaatio käsittää lisäksi yksittäisiä ensimmäisiä yleisiä sieppausitoutumissekvenssejä, joiden (iii) pituus on pienempi kuin ensimmäisen sieppaussekvenssin pituus.

7. Jommankumman patenttivaatimuksen 1–2 mukainen menetelmä, jossa ensimmäisen yleisen sieppausitoutumissekvenssin pituus on pienempi kuin
10 ensimmäisen sieppaussekvenssin pituus, jolloin valinnaisesti ensimmäisen yleisen sieppausitoutumissekvenssin pituus on 1–12 nukleotidiä pienempi kuin ensimmäisen sieppaussekvenssin pituus.

8. Patenttivaatimuksen 7 mukainen menetelmä, jossa erilaiset muokatut kohdenukleiinihapot käsittävät ensimmäisten yleisten
15 sieppausitoutumissekvenssien heterogeenisen populaation, jolloin heterogeeninen populaatio käsittää yksittäisiä ensimmäisiä yleisiä sieppausitoutumissekvenssejä, joiden pituus on 1–12 nukleotidiä pienempi kuin ensimmäisen sieppaussekvenssin pituus.

9. Patenttivaatimuksen 6 mukainen menetelmä, jossa heterogeenisen
20 populaation yksittäiset jäsenet, joiden pituus on pienempi kuin ensimmäisen sieppaussekvenssin pituus, käsittävät 1, 2 tai 3 nukleotidiä, jotka eivät ole komplementaarisia ensimmäisen sieppaussekvenssin sekvenssille kanssa tai jotka ovat 100-prosenttisesti komplementaarisia ensimmäisen sieppaussekvenssin sekvenssille.

25 10. Jommankumman patenttivaatimuksen 1–2 mukainen menetelmä, jossa erilaiset muokatut kohdenukleiinihapot käsittävät 5'-päässä toisen yleisen sieppausitoutumissekvenssin, jolla on komplementti, jolla on vähäisempi affiniteetti toista sieppaussekvenssiä kohtaan kuin toisella yleisellä sieppausitoutumissekvenssillä, jolla on komplementti, joka on 100-prosenttisesti
30 komplementaarinen toiselle sieppaussekvenssille, jolloin valinnaisesti

toisen yleisen sieppaussitoutumissequenssin komplementti on alle 100-prosenttisesti komplementaarinen toiselle sieppaussequenssille, jolloin lisäksi valinnaisesti

5 a) toisen yleisen sieppaussitoutumissequenssin komplementti käsittää 1, 2 tai 3 nukleotidiä, jotka eivät ole komplementaarisia toiselle sieppaussequenssille; tai

b) erilaiset muokatut kohdenukleiinihapot käsittävät toisten yleisten sieppaussitoutumissequenssien heterogeenisen populaation, jolloin heterogeeninen populaatio käsittää yksittäisiä toisia yleisiä sieppaussitoutumissequenssejä, jotka käsittävät komplementin, jossa on (i) 1, 2 tai 10 3 nukleotidiä, jotka eivät ole komplementaarisia toiselle sieppaussequenssille, tai (ii) joka on 100-prosenttisesti komplementaarinen ensimmäiselle sieppaussequenssille, jolloin valinnaisesti

heterogeenisen populaation jäseniä, jotka käsittävät komplementin, joka on 100-prosenttisesti komplementaarinen toiselle sieppaussequenssille, on 15 suurempana määränä kuin heterogeenisen populaation muita jäseniä, jolloin lisäksi valinnaisesti

heterogeeninen populaatio käsittää lisäksi yksittäisiä toisia yleisiä sieppaussitoutumissequenssejä, joiden (iii) pituus on pienempi kuin toisen sieppaussequenssin pituus.

20 11. Jommankumman patenttivaatimuksen 1–2 mukainen menetelmä, jossa toisen yleisen sieppaussitoutumissequenssin pituus on pienempi kuin toisen sieppaussequenssin pituus, jolloin valinnaisesti

toisen yleisen sieppaussitoutumissequenssin pituus on 1–12 nukleotidiä pienempi kuin toisen sieppaussequenssin pituus, jolloin lisäksi valinnaisesti

25 erilaiset muokatut kohdenukleiinihapot käsittävät toisten yleisten sieppaussitoutumissequenssien heterogeenisen populaation, jolloin heterogeeninen populaatio käsittää yksittäisiä toisia yleisiä sieppaussitoutumissequenssejä, joiden pituus on 1–12 nukleotidiä pienempi kuin toisen sieppaussequenssin pituus.

12. Jommankumman patenttivaatimuksen 1–2 mukainen menetelmä, jossa monistuskohtien ryhmä käsittää ryhmän ominaispiirteitä pinnalla, jolloin valinnaisesti

kunkin ominaispiirteen alue on suurempi kuin monistuskohtiin
5 kuljetettavien kohdenukleiinihappojen poissuljetun tilavuuden halkaisija, jolloin valinnaisesti

ominaispiirteet eivät ole vierekkäisiä ja ne erottavat toisistaan pinnan välialueet, joista sieppausaineet puuttuvat.

13. Koostumus, joka käsittää ryhmän monistuskohtia ja vähintään yhden
10 kohdenukleiinihapon sitoutuneena monistuskohtaan,

jolloin monistuskohdat käsittävät kaksi sieppausnukleiinihappojen populaatiota, joista populaatioista kumpikin käsittää sieppaussekvenssin,

jolloin ensimmäinen populaatio käsittää ensimmäisen sieppaussekvenssin ja toinen populaatio käsittää toisen sieppaussekvenssin,

15 jolloin kohdenukleiinihappo käsittää 3'-päässä ensimmäisen yleisen sieppausstitoutumissekvenssin, jolla on pienempi affiniteetti ensimmäistä sieppaussekvenssiä kohtaan kuin ensimmäisellä yleisellä sieppausstitoutumissekvenssillä, joka on 100-prosenttisesti komplementaarinen ensimmäiselle sieppaussekvenssille,

20 jolloin kohdenukleiinihapon yleinen sieppausstitoutumissekvenssi hybridisoituu ensimmäiseen sieppaussekvenssiin.

14. Patenttivaatimuksen 13 mukainen koostumus, jossa

- a) ensimmäisen yleinen sieppausstitoutumissekvenssin komplementaarisuus ensimmäiselle sieppaussekvenssille on alle 100 % tai
- 25 b) ensimmäinen yleinen sieppausstitoutumissekvenssi käsittää 1, 2 tai 3 nukleotidiä, jotka eivät ole komplementaarisia ensimmäiselle sieppaussekvenssille; tai

c) vähintään 30 % ryhmän monistuskohdista on vähintään yhden kohdenukleinihapon varaama, jolloin valinnaisesti

ensimmäinen yleinen sieppausitoutumissekvenssi käsittää heterogeenisen populaation, jolloin heterogeeninen populaatio käsittää yksittäisiä ensimmäisiä yleisiä sieppausitoutumissekvenssejä, joissa on (i) 1, 2 tai 3
5 nukleotidiä, jotka eivät ole komplementaarisia ensimmäiselle sieppaussekvenssille, tai (ii) jotka ovat 100-prosenttisesti komplementaarisia ensimmäiselle sieppaussekvenssille, ja jolloin heterogeenisen populaation jäsenet ovat sitoutuneet eri monistuskohtiin, jolloin lisäksi valinnaisesti

10 heterogeenisen populaation jäseniä, jotka ovat 100-prosenttisesti komplementaarisia ensimmäiselle sieppaussekvenssille, on suurempaa määränä kuin heterogeenisen populaation muita jäseniä.

15. Patenttivaatimuksen 13 mukainen koostumus, jossa toisen yleisen sieppausitoutumissekvenssin pituus on pienempi kuin toisen sieppaussekvenssin
15 pituus, jolloin valinnaisesti toisen yleisen sieppausitoutumissekvenssin pituus on 1–12 nukleotidiä pienempi kuin toisen sieppaussekvenssin pituus, jolloin lisäksi valinnaisesti

koostumus käsittää useita erilaisia kohdenukleinihappoja, jolloin eri kohdenukleinihapot käsittävät ensimmäisten yleisten
20 sieppausitoutumissekvenssien heterogeenisen populaation, jolloin heterogeeninen populaatio käsittää yksittäisiä ensimmäisiä yleisiä sieppausitoutumissekvenssejä, joiden pituus on 1–12 nukleotidiä pienempi kuin ensimmäisen sieppaussekvenssin pituus.

16. Patenttivaatimuksen 13 mukainen koostumus, jossa heterogeeninen
25 populaatio käsittää lisäksi yksittäisiä ensimmäisiä yleisiä sieppausitoutumissekvenssejä, joiden (iii) pituus on pienempi kuin ensimmäisen sieppaussekvenssin pituus, jolloin valinnaisesti

a) yksittäiset ensimmäiset yleiset sieppausitoutumissekvenssit käsittävät lyhennetyin pituuden, joka on 1–12 nukleotidiä pienempi kuin ensimmäisen
30 sieppaussekvenssin pituus, tai

b) heterogeenisen populaation yksittäiset jäsenet, joilla on lyhennetty pituus, käsittävät 1, 2 tai 3 nukleotidiä, jotka eivät ole komplementaarisia ensimmäisen sieppaussekvenssin sekvenssille kanssa tai jotka ovat 100-prosenttisesti komplementaarisia ensimmäisen sieppaussekvenssin sekvenssille.

5 17. Patenttivaatimuksen 13 mukainen koostumus, jolloin koostumus käsittää useita erilaisia kohdenukleiinihappoja, jolloin eri kohdenukleiinihapot käsittävät 5'-päässä toisen yleisen sieppaussitoutumissekvenssin, jolla on komplementti, jolla on vähäisempi affiniteetti toista sieppaussekvenssiä kohtaan kuin toisella yleisellä sieppaussitoutumissekvenssillä, jolla on komplementti, joka on 100-prosenttisesti
10 komplementaarinen toiselle sieppaussekvenssille, jolloin valinnaisesti

toisen yleisen sieppaussitoutumissekvenssin komplementti on alle 100-prosenttisesti komplementaarinen toiselle sieppaussekvenssille,

jolloin lisäksi valinnaisesti

a) toisen yleisen sieppaussitoutumissekvenssin komplementti käsittää 1, 2 tai
15 3 nukleotidiä, jotka eivät ole komplementaarisia toiselle sieppaussekvenssille; tai

b) koostumus käsittää useita erilaisia kohdenukleiinihappoja, jolloin eri kohdenukleiinihapot käsittävät toisten yleisten sieppaussitoutumissekvenssien heterogeenisen populaation, jolloin heterogeeninen populaatio käsittää yksittäisiä toisia yleisiä sieppaussitoutumissekvenssejä, jotka käsittävät komplementin, jossa
20 on

(i) 1, 2 tai 3 nukleotidiä, jotka eivät ole komplementaarisia toiselle sieppaussekvenssille, tai

(ii) jotka ovat 100-prosenttisesti komplementaarisia toiselle sieppaussekvenssille, tai

25 c) jolloin heterogeenisen populaation jäseniä, jotka käsittävät komplementin, joka on 100-prosenttisesti komplementaarinen toiselle sieppaussekvenssille, on suurempana määränä kuin heterogeenisen populaation muita jäseniä.

18. Patenttivaatimuksen 13 mukainen koostumus, jossa kohdenukleinihappo käsittää 5'-päässä toisen yleisen sieppaussitoutumissequenssin, jonka pituus on pienempi kuin toisen sieppaussequenssin pituus, jolloin valinnaisesti

5 a) toisen yleisen sieppaussitoutumissequenssin pituus on 1–12 nukleotidiä pienempi kuin toisen sieppaussequenssin pituus tai

10 b) koostumus käsittää useita erilaisia kohdenukleinihappoja, jolloin eri kohdenukleinihapot käsittävät toisten yleisten sieppaussitoutumissequenssien heterogeenisen populaation, jolloin heterogeeninen populaatio käsittää yksittäisiä toisia yleisiä sieppaussitoutumissequenssejä, joiden pituus on 1–12 nukleotidiä
10 pienempi kuin toisen sieppaussequenssin pituus.

19. Patenttivaatimuksen 17 mukainen koostumus, jossa heterogeeninen populaatio käsittää lisäksi yksittäisiä toisia yleisiä sieppaussitoutumissequenssejä, joiden (iii) pituus on pienempi kuin toisen sieppaussequenssin pituus.

15 20. Patenttivaatimuksen 19 mukainen koostumus, jossa yksittäisten toisten yleisten sieppaussitoutumissequenssien pituus on 1–12 nukleotidiä pienempi kuin toisen sieppaussequenssin pituus, jolloin valinnaisesti

20 heterogeenisen populaation yksittäiset jäsenet, joiden pituus on pienempi kuin toisen sieppaussequenssin pituus, käsittävät 1, 2 tai 3 nukleotidiä, jotka eivät ole komplementaarisia toisen sieppaussequenssin sequenssille tai jotka ovat 100-prosenttisesti komplementaarisia toisen sieppaussequenssin sequenssille.
