

(19)



SUOMI - FINLAND
(FI)

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

(10)

FI/EP3981884 T3

(12)

**EUROOPPAPATENTIN KÄÄNNÖS
ÖVERSÄTTNING AV EUROPEISKT PATENT
TRANSLATION OF EUROPEAN PATENT SPECIFICATION**

(45)

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

21.09.2023

(97)

Eurooppapatentin myöntämispäivä - Meddelandedatum för
det europeiska patentet - Date of grant of European patent

09.08.2023

(51)

Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassificering -
International patent classification
C12Q 1/6806 (2018 . 01)

(96)

Eurooppapatenttihakemus - Europeisk patentansökan -
European patent application

EP21203166.0

(22)

Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date

05.06.2018

(97)

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

13.04.2022

(30)

Etuoikeus - Prioritet - Priority

07.06.2017 US US201762516324 P

(73)

Haltija - Innehavare - Holder

1• Oregon Health & Science University , 3181 S.W. Sam Jackson Park Road , Portland, Oregon 97239 , (US)
2• Illumina, Inc. , 5200 Illumina Way , San Diego, CA 92122 , (US)

(72)

Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1• ADEY, Andrew C , Portland, Oregon 97239 , (US)
2• MULQUEEN, Ryan , Portland, Oregon 97239 , (US)
3• STEEMERS, Frank J. , San Diego, California 92122 , (US)
4• POKHOLOK, Dmitry K. , San Diego, California 92122 , (US)
5• NORBERG, Steven , 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

YKSITTÄISSOLUJEN KOKOGENOMIKIRJASTOJA METYLAATIOSEKVENSOINTIA VARTEN
SINGLE CELL WHOLE GENOME LIBRARIES FOR METHYLATION SEQUENCING

YKSITTÄISSOLUJEN KOKOGENOMIKIRJASTOJA METYLAATIOSEKVENSOINTIA VARTEN

PATENTTIVAATIMUKSET

1. Menetelmä sekvensointikirjaston valmistamiseksi useista yksittäissoluista
5 peräisin olevien nukleiinihappojen metylaatiotilan määrittämiseksi, joka menetelmä käsittää sen, että:
 - (a) aikaansaadaan useista soluista peräisin olevia eristettyjä tumia;
 - (b) altistetaan eristetyt tumat kemialliselle käsittelylle nukleosomidepletoitujen tumien luomiseksi, samalla kun säilytetään eristettyjen tumien eheys;
 - 10 (c) jaetaan nukleosomidepletoitujen tumien alijoukkoja ensimmäisiin useisiin lokeroihin, jotka käsittävät transposomikompleksin, jolloin kussakin lokerossa oleva transposomikompleksi käsittää ensimmäisen indeksisekvenssin, joka poikkeaa muissa lokeroissa olevista ensimmäisistä indeksisekvensseistä;
 - (d) fragmentoidaan nukleosomidepletoitujen tumien alijoukoissa olevia
15 nukleiinihappoja useiksi nukleiinihappofragmenteiksi ja sisällytetään ensimmäiset indeksisekvenssit vähintään yhteen nukleiinihappofragmenttien juosteeseen indeksoitujen tumien luomiseksi;
 - (e) yhdistetään indeksoidut tumat poolattujen indeksoitujen tumien luomiseksi;
 - (f) jaetaan poolattujen indeksoitujen tumien alijoukkoja toisiin useisiin
20 lokeroihin ja altistetaan indeksoidut tumat käsittelylle metyloitujen nukleotidien tunnistamiseksi ja käsiteltyjen nukleiinihappofragmenttien luomiseksi, jolloin valinnaisesti käsittely käsittää bisulfiittia tai hydratsiinia;
 - (g) amplifioidaan kussakin lokerossa olevat käsitellyt nukleiinihappofragmentit lineaarisella amplifikaatiolla useiden alukkeiden avulla, jotka käsittävät
25 universaalin nukleotidisekvenssin 5'-päässä ja satunnaisen nukleotidisekvenssin 3'-päässä, amplifioitujen fragmentti-adapterimolekyylien luomiseksi;
 - (h) sisällytetään toinen indeksisekvenssi amplifioituihin fragmentti-adapterimolekyyliin kaksoisindeksi-fragmentti-adapterimolekyylien luomiseksi,

jolloin kussakin lokerossa oleva toinen indeksisekvenssi poikkeaa muissa lokeroissa olevista toisista indeksisekvensseistä; ja

- (i) yhdistetään kaksoisindeksi-fragmentti-adapterimolekyylit tuottaen näin sekvensointikirjasto useista yksittäissoluista peräisin olevien nukleiinihappojen metylaatiotilan määrittämiseksi, jolloin valinnaisesti vaiheissa (c) ja (f) jakaminen 5 suoritetaan fluoresenssiaktivoidulla tumalajittelulla.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, jolloin käsittely tunnistaa metyloituja CpG-dinukleotidisekvenssejä tai jolloin käsiteltyjen nukleiinihappofragmenttien lineaarinen amplifikaatio käsittää 1–10 sykliä tai jolloin 10 vaiheessa (g) alukkeiden 5'-päässä oleva universaali nukleotidisekvenssi käsittää toisen sekvensointialukesekvenssin tai jolloin vaiheessa (g) alukkeiden 3'-päässä oleva satunnainen nukleotidisekvenssi koostuu 9 satunnaisesta nukleotidista.

3. Menetelmä sekvensointikirjaston valmistamiseksi useista yksittäissoluista peräisin olevien nukleiinihappojen metylaatiotilan määrittämiseksi, joka menetelmä 15 käsittää sen, että:

- (a) aikaansaadaan useista soluista peräisin olevia eristettyjä tumia;
- (b) altistetaan eristetyt tumat kemialliselle käsittelylle nukleosomidepletoitujen tumien luomiseksi, samalla kun säilytetään eristettyjen tumien eheys;
- (c) jaetaan nukleosomidepletoitujen tumien alijoukkoja ensimmäisiin useisiin 20 lokeroihin, jotka käsittävät transposomikompleksin, jolloin kussakin lokerossa oleva transposomikompleksi käsittää ensimmäisen indeksisekvenssin, joka poikkeaa muissa lokeroissa olevista ensimmäisistä indeksisekvensseistä;
- (d) fragmentoidaan nukleosomidepletoitujen tumien alijoukoissa olevia nukleiinihappoja useiksi nukleiinihappofragmenteiksi ja sisällytetään ensimmäiset 25 indeksisekvenssit vähintään yhteen nukleiinihappofragmenttien juosteeseen indeksoitujen tumien luomiseksi;
- (e) yhdistetään indeksoidut tumat poolattujen indeksoitujen tumien luomiseksi;

(f) jaetaan poolattujen indeksoitujen tumien alijoukkoja toisiin useisiin lokeroihin ja altistetaan indeksoidut tumat käsittelylle metyloitujen nukleotidien tunnistamiseksi ja käsiteltyjen nukleiinihappofragmenttien luomiseksi, jolloin valinnaisesti käsittely käsittää bisulfiittia tai hydratsiinia;

5 (g) ligatoidaan kussakin lokerossa olevat käsitellyt nukleiinihappofragmentit universaaliin adapteriin ligatoitujen fragmentti-adapterimolekyylien luomiseksi;

(h) sisällytetään toinen indeksisekvenssi ligatoituihin fragmentti-adapterimolekyyleihin kaksoisindeksi-fragmentti-adapterimolekyylien luomiseksi, jolloin kussakin lokerossa oleva toinen indeksisekvenssi poikkeaa muissa

10 lokerossa olevista toisista indeksisekvensseistä; ja

(i) yhdistetään kaksoisindeksi-fragmentti-adapterimolekyylit tuottaen näin sekvensointikirjasto useista yksittäissoluista peräisin olevien nukleiinihappojen metylaatiotilan määrittämiseksi, jolloin valinnaisesti vaiheissa (c) ja (f) jakaminen suoritetaan fluoresenssiaktivoidulla tumalajittelulla.

15 4. Patenttivaatimuksen 1 tai patenttivaatimuksen 3 mukainen menetelmä, jolloin kemiallinen käsittely käsittää käsittelyn kaotrooppisella aineella, joka kykenee keskeyttämään nukleiinihappo-proteiinivuorovaikutuksia, jolloin valinnaisesti kaotrooppinen aine käsittää litiumdijodisalisylaattia, tai jolloin kemiallinen käsittely käsittää käsittelyn pesuaineella, joka kykenee keskeyttämään
20 nukleiinihappo-proteiinivuorovaikutuksia, jolloin valinnaisesti pesuaine käsittää natriumdodekyylisulfaattia (SDS), jolloin lisäksi valinnaisesti solut käsitellään silloitteella ennen vaihetta (a), jolloin lisäksi valinnaisesti silloite on formaldehydi.

5. Patenttivaatimuksen 1 tai patenttivaatimuksen 3 mukainen menetelmä, jolloin nukleosomidepletoitujen tumien alijoukot käsittävät suunnilleen yhtä suuria
25 lukumääriä tumia, jolloin valinnaisesti nukleosomidepletoitujen tumien alijoukot käsittävät 1–noin 2 000 tumaa.

6. Patenttivaatimuksen 1 tai patenttivaatimuksen 3 mukainen menetelmä, jolloin ensimmäiset useat lokerot ovat monikuoppalevy, jolloin valinnaisesti monikuoppalevy on 96-kuoppalevy tai 384-kuoppalevy, tai jolloin toiset useat

lokerot ovat monikuoppalevy, jolloin valinnaisesti monikuoppalevy on 96-kuoppalevy tai 384-kuoppalevy.

7. Patenttivaatimuksen 1 tai patenttivaatimuksen 3 mukainen menetelmä, jolloin poolattujen indeksoitujen tumien alijoukot käsittävät suunnilleen yhtä suuria lukumääriä tumia, jolloin valinnaisesti poolattujen indeksoitujen tumien alijoukot käsittävät 1–noin 25 tumaa, tai jolloin poolattujen indeksoitujen tumien alijoukot sisältävät vähintään 10 kertaa vähemmän tumia kuin nukleosomidepletoitujen tumien alijoukot, jolloin valinnaisesti poolattujen indeksoitujen tumien alijoukot sisältävät vähintään 100 kertaa vähemmän tumia kuin nukleosomidepletoitujen tumien alijoukot.

8. Patenttivaatimuksen 1 tai patenttivaatimuksen 3 mukainen menetelmä, jolloin kukin transposomikomplekseista käsittää transposaaseja ja transposoneja, joista transposoneista kukin käsittää siirretyn juosteen, jolloin valinnaisesti siirretty juoste ei käsitä sytosiinitähdettä, jolloin lisäksi valinnaisesti siirretty juoste käsittää ensimmäisen indeksisekvenssin, jolloin lisäksi valinnaisesti siirretty juoste käsittää lisäksi ensimmäisen universaalin sekvenssin ja ensimmäisen sekvensiointialukesekvenssin.

9. Patenttivaatimuksen 3 mukainen menetelmä, jolloin käsittely tunnistaa metyloituja CpG-dinukleotidisekvenssejä.

10. Patenttivaatimuksen 3 mukainen menetelmä, joka käsittää lisäksi sen, että lisätään yksi tai useampi nukleotidi käsiteltyjen nukleiinihappofragmenttien 3'-päihin 3'-ulokkeen muodostamiseksi ennen universaalin adapterin ligaatiota, jolloin valinnaisesti yhden tai useamman nukleotidin lisääminen suoritetaan käyttäen terminaalitransferraasia, jolloin lisäksi valinnaisesti universaali adapteri käsittää ulokkeen, joka on käänteiskomplementaarinen käsitellyissä nukleiinihappofragmenteissa olevalle 3'-ulokkeelle.

11. Patenttivaatimuksen 1 tai patenttivaatimuksen 3 mukainen menetelmä, jolloin toisen indeksisekvenssin sisällyttäminen vaiheessa (h) käsittää sen, että saatetaan kussakin lokerossa olevat kaksoisindeksi-fragmentti-adapterimolekyylit kosketuksiin ensimmäisen universaalin alukkeen ja toisen universaalin alukkeen kanssa, joista kukin käsittää indeksisekvenssin, ja suoritetaan eksponentiaalinen

amplifikaatioreaktio, jolloin valinnaisesti ensimmäisen universaalin alukkeen indeksisekvenssi on toisen universaalin alukkeen indeksisekvenssin käänteiskomplementti tai jolloin ensimmäisen universaalin alukkeen indeksisekvenssi poikkeaa toisen universaalin alukkeen indeksisekvenssin käänteiskomplementista.

- 5 12. Patenttivaatimuksen 1 tai patenttivaatimuksen 11 mukainen menetelmä, jolloin ensimmäinen universaali aluke käsittää lisäksi ensimmäisen sieppaussekvenssin ja ensimmäisen ankkurisekvenssin, joka on komplementaarinen kaksoisindeksi-fragmentti-adapterimolekyylien 3'-päässä olevalle universaalille sekvenssille, jolloin valinnaisesti ensimmäinen
- 10 sieppaussekvenssi käsittää P5-alukesekvenssin, tai jolloin toinen universaali aluke käsittää lisäksi toisen sieppaussekvenssin ja toisen ankkurisekvenssin, joka on komplementaarinen kaksoisindeksi-fragmentti-adapterimolekyylien 5'-päässä olevalle universaalille sekvenssille, jolloin valinnaisesti toinen sieppaussekvenssi käsittää P7-alukesekvenssin käänteiskomplementin.
- 15 13. Patenttivaatimuksen 1 tai patenttivaatimuksen 11 mukainen menetelmä, jolloin eksponentiaalinen amplifikaatioreaktio käsittää polymeerasiketjureaktion (PCR), jolloin valinnaisesti PCR käsittää 15–30 sykliä.
14. Patenttivaatimuksen 1 tai patenttivaatimuksen 3 mukainen menetelmä, joka käsittää lisäksi kohdenukleiinihappojen rikastamisen käyttäen useita
- 20 sieppausoligonukleotideja, joilla on spesifisyys kohdenukleiinihapoille, jolloin valinnaisesti sieppausoligonukleotidit on immobilisoitu kiinteään substraatin pinnalle tai jolloin sieppausoligonukleotidit käsittävät universaalin sitoutumisparin ensimmäisen jäsenen ja jolloin sitoutumisparin toinen jäsen on immobilisoitu kiinteään substraatin pinnalle.
- 25 15. Patenttivaatimuksen 1 tai patenttivaatimuksen 3 mukainen menetelmä, joka käsittää lisäksi kaksoisindeksi-fragmentti-adapterimolekyylien valinnan, jotka kuuluvat esimääritettyyn kokoalueeseen, tai joka käsittää lisäksi kaksoisindeksi-fragmentti-adapterimolekyylien sekvensoinnin useista yksittäissoluista peräisin olevien nukleiinihappojen metylaatiotilan määrittämiseksi.
- 30 16. Patenttivaatimuksen 15 mukainen menetelmä, joka käsittää lisäksi sen, että:

aikaansaadaan pinta, joka käsittää useita amplifikaatiokohtia, jolloin amplifikaatiokohdat käsittävät vähintään kaksi kiinnitettyjen yksijuosteisten nukleiinihappojen populaatiota, joilla on vapaa 3'-pää, ja

saatetaan amplifikaatiokohtia käsittävä pinta kosketuksiin

- 5 sekvensointikirjaston kanssa olosuhteissa, jotka soveltuvat tuottamaan useita amplifikaatiokohtia, joista kukin käsittää yksittäisestä kaksoisindeksi-fragmentti-adapterimolekyylistä peräisin olevien amplikonien klonaalisen populaation, jolloin valinnaisesti kaksoisindeksi-fragmentti-adapterimolekyylien lukumäärä ylittää amplifikaatiokohtien lukumäärän, jolloin kaksoisindeksi-fragmentti-adapterimolekyyilleillä on fluidiyhteys amplifikaatiokohtiin ja jolloin kukin
- 10 amplifikaatiokohdista käsittää kapasiteettia lukuisille sekvensointikirjastossa oleville kaksoisindeksi-fragmentti-adapterimolekyyille,

- tai jolloin kosketuksiin saattaminen käsittää samanaikaisesti sen, että (i) kuljetetaan kaksoisindeksi-fragmentti-adapterimolekyylit amplifikaatiokohtiin
- 15 keskimääräisellä kuljetusnopeudella ja (ii) amplifioidaan amplifikaatiokohdissa olevat kaksoisindeksi-fragmentti-adapterimolekyylit keskimääräisellä amplifikaationopeudella, jolloin keskimääräinen amplifikaationopeus ylittää keskimääräisen kuljetusnopeuden.

17. Koostumus, joka käsittää nukleosomidepletoitujen tumien alijoukkoja, jotka
- 20 käsittävät ensimmäisen indeksisekvenssin käsittäviä nukleiinihappofragmentteja ja jotka on käsitelty metyloitujen nukleotidien tunnistamiseksi, jolloin ensimmäinen indeksisekvenssi poikkeaa nukleosomidepletoitujen tumien aliryhmistä kunkin osalta.

18. Patenttivaatimuksen 17 mukainen koostumus, jolloin
- 25 nukleiinihappofragmentit käsittävät CpG-sekvenssien metylaatiotilasta riippuvaisen kemiallisen modifikaation.

19. Patenttivaatimuksen 17 mukainen koostumus, jolloin nukleiinihappofragmentit käsittävät lisäksi universaalin sekvenssin ja/tai ensimmäisen sekvensointialukesekvenssin.

20. Jonkin patenttivaatimuksista 17–19 mukainen koostumus, jolloin ensimmäinen indeksi, universaali sekvenssi ja/tai ensimmäinen sekvensointialukesekvenssi on sytosiinidepletoitu.
21. Patenttivaatimuksen 17 mukainen koostumus, joka käsittää lisäksi
5 transposomikomplekseja.
22. Sekvensointikirjasto, joka on tuotettu patenttivaatimuksen 1 tai patenttivaatimuksen 3 mukaisella menetelmällä.
-