

(19)



SUOMI - FINLAND
(FI)

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

(10)

FI/EP3969618 T3

(12)

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

(45)

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

18.10.2023

(97)

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

13.09.2023

(51)

Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassificering -
International patent classification
C12Q 1/6869 (2018 . 01)

(96)

Eurooppapatenttihakemus - Europeisk patentansökan -
European patent application

EP21712731.5

(22)

Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date

09.03.2021

(97)

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

23.03.2022

(86)

Kansainvälinen hakemus - Internationell
ansökan - International application

09.03.2021 PCT/EP2021055939

(30)

Etuoikeus - Prioritet - Priority

09.03.2020 US US202062987035 P

(73)

Haltija - Innehavare - Holder

1• Illumina, Inc., 5200 Illumina Way , San Diego, CA 92122 , (US)

(72)

Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1• PEACE, Jared , c/o Illumina, Inc. 5200 Illumina Way , San Diego, California 92122 , (US)

2• BOJANOVIC MACHADO, Klara , c/o Illumina, Inc. 5200 Illumina Way , San Diego, California 92122 , (US)

3• MCINERNEY, Peter , c/o Illumina, Inc. 5200 Illumina Way , San Diego, California 92122 , (US)

4• BOUTELL, Jonathan, Mark , c/o Illumina , Cambridge Limited 19 Granta Park, Great Abington Cambridge CB21 6DF , (GB)

(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 POLYNUKLEOTIDIEN SEKVENSOINTIIN

METHODS FOR SEQUENCING POLYNUCLEOTIDES

MENETELMIÄ POLYNUKLEOTIDIEN SEKVENSOINTIIN

PATENTTIVAATIMUKSET

1. Menetelmä juosteen uudelleensynteesipidentysreaktion suorittamiseksi parittaisen sekvenssoinnin aikana, jossa juosteen
- 5 uudelleensynteesipidentysreaktio suoritetaan ensimmäisen sekvenssointiluvun ja toisen sekvenssointiluvun välissä, ja jolloin mainittu juosteen uudelleensynteesipidentysreaktio pidentää yhtä tai useampaa immobilisoitua aluketta ensimmäisen templaattijuosteen kopioimiseksi toisen immobilisoidun templaattijuosteen muodostamiseksi; **tunnettu siitä, että** juosteen
- 10 uudelleensynteesipidentysreaktio suoritetaan käyttämällä ei-lämpöstabiliia juosteen syrjäytyspolymeraasia alle 55 °C:n lämpötilassa, jolloin mainitut ensimmäiset templaattijuosteet ovat klusteri, ja jolloin samaa ei-lämpöstabiliia juosteen syrjäytyspolymeraasia käytetään alkuperäisen klusterin muodostamisen ja juosteen uudelleensynteesipidentysreaktion aikana.
- 15 2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, jossa ei-lämpöstabiiliin polymeerasin optimaalinen inkubointilämpötila ja/tai optimaalinen aktiivisuuslämpötila on alle 55 °C, edullisesti alle 50 °C, alle 45 °C, alle 40 °C, alle 39 °C, tasan tai alle 38 °C, noin 38 °C tai noin 37 °C; erityisen edullisesti noin 38 °C.
- 20 3. Jonkin edellisen patenttivaatimuksen mukainen menetelmä, jossa pidentysreaktio suoritetaan lämpötilassa, joka on alle 55 °C, edullisesti alle 50 °C, edullisesti alle 40 °C, edullisesti 38 °C +/-2 °C, edullisesti 38 °C +/-1 °C, edullisesti 38 °C.
4. Jonkin edellisen patenttivaatimuksen mukainen menetelmä, jossa ei-
- 25 lämpöstabiili polymeerasi on Bsu, phi29, Klenow tai DNA-polymeerasi I (E. coli), edullisesti Bsu tai sen toiminnallinen fragmentti.
5. Jonkin edellisen patenttivaatimuksen mukainen menetelmä, jossa juosteen uudelleensynteesipidentysreaktio toistetaan useiden pidentämis- ja denaturaatiosyklien kautta, jolloin menetelmä käsittää edullisesti 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8,

9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 tai useampia syklejä; edullisesti 2–5 sykliä, 2–4 sykliä, 3–5 sykliä, 3 sykliä tai 4 sykliä; edullisimmin 3 sykliä.

6. Jonkin edellisen patenttivaatimuksen mukainen menetelmä, jossa jokainen sykli voi kestää 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20 tai 30 minuuttia, jolloin edullisesti menetelmä käsittää seuraavat pidennys- ja denaturointisyklit: 3 x 5 min; 3 x 30 min; 12 x 2 min; 6 x 4 min; 2 x 12 min tai 3 x 5 min; edullisesti 12 x 2 min.

7. Jonkin edellisen patenttivaatimuksen mukainen menetelmä, jossa denaturointi suoritetaan olennaisesti pidennysreaktion lämpötilassa, jolloin edullisesti denaturointi suoritetaan käyttämällä happamia nukleiinihappodenaturointiaineita, kuten etikkahappo, HCl tai typpihappo; emäksisiä nukleiinihappodenaturointiaineita, kuten NaOH; tai muita nukleiinihappodenaturointiaineita, kuten DMSO, formamidi, betaiini, guanidiini, natriumsalisylaatti, propyleeniglykoli tai urea; edullisesti formamidi ja NaOH, erityisen edullisesti formamidi.

8. Jonkin edellisen patenttivaatimuksen mukainen menetelmä, jossa juosteen uudelleensynteesipidennysreaktio suoritetaan alhaisemmassa lämpötilassa kuin sekvensointilukuvaiheet.

9. Jonkin edellisen patenttivaatimuksen mukainen menetelmä, jossa mainittu klusteri generoitiin alun perin siltavahvistuksen avulla.

10. Jonkin edellisen patenttivaatimuksen mukainen menetelmä, jossa ainakin yksi immobilisoiduista alukkeista blokataan 3'-päästä ja blokki poistetaan ennen juosteen uudelleensynteesipidennysreaktiota, jolloin edullisesti blokki on fosfaattiryhmä ja sitä käsitellään fosfataasilla blokin poistamiseksi.

11. Jonkin edellisen patenttivaatimuksen mukainen menetelmä, joka käsittää lisäksi vaiheen, jossa käsitellään restriktioentsyymillä ennen juosteen uudelleensynteesipidennysreaktiota immobilisoidun alukkeen lyhentämiseksi ja vapaan 3'-hydroksyylin vapauttamiseksi pidentämistä varten.

12. Jonkin edellisen patenttivaatimuksen mukainen menetelmä, jossa immobilisoitua aluketta pidennetään ennen juosteen

uudelleensynteesipidennysreaktiota, jolloin edullisesti immobilisoitua aluketta pidennetään hybridisoimalla immobilisoimaton komplementaarinen sekvenssi 5'-ulokkeen kanssa, ja immobilisoitua aluketta pidennetään ulokkeen kopioimiseksi.

13. Menetelmä kaksijuosteisen kohteena olevan polynukleotidin ensimmäisen ja toisen alueen sekvensoimiseksi pareittain, jolloin mainitut ensimmäinen ja toinen alue ovat samassa kaksijuosteisessa kohdepolynukleotidissa, jolloin mainittu parittainen sekvensointi sisältää missä tahansa patenttivaatimuksista 1–12 esitetyt vaiheet.

14. Patenttivaatimuksen 13 mukaisen menetelmän käyttö sekvensointi-informaation kahden linkitetyn tai parillisen luennan saamiseksi kustakin kaksijuosteisesta templaatista klusteroidussa ryhmässä.

15. Menetelmä sekvensointireaktion datan laadun parantamiseksi, joka menetelmä käsittää jonkin patenttivaatimuksista 1–12 mukaisen pidennysreaktion suorittamisen.