



(12) Translation of
European patent specification

(11) NO/EP 3384046 B1

NORWAY

(19) NO
(51) Int Cl.
C12Q 1/6806 (2018.01)
B01L 3/00 (2006.01)
C12Q 1/6869 (2018.01)
G01N 1/28 (2006.01)
G01N 15/10 (2006.01)
G01N 33/543 (2006.01)

Norwegian Industrial Property Office

(45) Translation Published 2021.09.20

(80) Date of The European Patent Office Publication of the Granted Patent 2021.04.28

(86) European Application Nr. 16816512.4

(86) European Filing Date 2016.11.30

(87) The European Application's Publication Date 2018.10.10

(30) Priority 2015.12.01, US, 201562261786 P
2016.01.21, US, 201662281510 P
2016.03.28, US, 201662314071 P
2016.07.06, US, 201662358968 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

(73) Proprietor Illumina, Inc., 5200 Illumina Way, San Diego, CA 92122, USA

(72) Inventor JAMSHIDI, Arash, 2048 Maryland Street, Redwood City, California 94061, USA
LIN, Yan-you, 4251 Nerissa Circle, Fremont, California 94555, USA
ABSALAN, Farnaz, 626 Poplar Avenue, Redwood City, California 94061, USA
STUART, Sarah, 2400 Skyline Drive, Pacifica, California 94044, USA
CANN, Gordon, 1227 Gordon Street, Redwood City, California 94061, USA
WU, Yir-Shyuan, 825 Cornell Ave, Albany, California 94706, USA
KHURANA, Tarun, 38866 Northern Common, Fremont, California 94536, USA
FISHER, Jeffrey, S., 7855 Via Montebello 4, San Diego, California 92129, USA

(74) Agent or Attorney Murgitroyd & Company, Mannerheimvägen 12 B, 5tr, 00100 HELSINGFORS, Finland

(54) Title **DIGITAL MICROFLUIDIC SYSTEM FOR SINGLE-CELL ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF ANALYTES**

(56) References
Cited: US-A1- 2014 262 787
US-A1- 2015 253 284
US-A1- 2015 141 261

US-A1- 2015 072 900

DAVID M RISSIN ET AL: "Single-molecule enzyme-linked immunosorbent assay detects serum proteins at subfemtomolar concentrations", NATURE BIOTECHNOLOGY, GALE GROUP INC, US, vol. 28, no. 6, 1 June 2010 (2010-06-01), pages 595-599, XP002662812, ISSN: 1087-0156, DOI: 10.1038/NBT.1641 [retrieved on 2010-05-23]

NILSSON J ET AL: "Review of cell and particle trapping in microfluidic systems", ANALYTICA CHIMICA ACTA, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 649, no. 2, 7 September 2009 (2009-09-07), pages 141-157, XP026497473, ISSN: 0003-2670, DOI: 10.1016/J.ACA.2009.07.017 [retrieved on 2009-07-14]

YAMAMURA S AL: "Single-cell microarray for analyzing cellular response", ANALYTICAL CHEMISTRY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, US, vol. 77, no. 24, 12 November 2005 (2005-11-12), pages 8050-8056, XP002407149, ISSN: 0003-2700, DOI: 10.1021/AC0515632

RETTIG JACQUELINE R ET AL: "Large-scale single-cell trapping and imaging using microwell arrays", ANALYTICAL CHEMISTRY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, US, vol. 77, no. 17, 1 September 2005 (2005-09-01), pages 5628-5634, XP002629255, ISSN: 0003-2700, DOI: 10.1021/AC0505977 [retrieved on 2005-07-30]

A. M. THOMPSON ET AL: "Microfluidics for single-cell genetic analysis", LAB ON A CHIP: MINIATURISATION FOR CHEMISTRY, PHYSICS, BIOLOGY, MATERIALS SCIENCE AND BIOENGINEERING, vol. 14, no. 17, 31 March 2014 (2014-03-31), page 3135, XP055344483, GB ISSN: 1473-0197, DOI: 10.1039/C4LC00175C

DINO DI CARLO ET AL: "Dynamic single cell culture array", LAB ON A CHIP: MINIATURISATION FOR CHEMISTRY, PHYSICS, BIOLOGY, MATERIALS SCIENCE AND BIOENGINEERING, vol. 6, no. 11, 1 January 2006 (2006 -01-01), page 1445, XP055344261, GB ISSN: 1473-0197, DOI: 10.1039/b605937f cited in the application

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. Fremgangsmåte for å fange celler av interesse i et digitalt mikrofluidikksystem (1700), idet fremgangsmåten omfatter:
 - 5 (a) å benytte en dråpeaktuator (100, 1705) av det digitale mikrofluidikksystem (1700) til å transportere en prøvedråpe til en mikrobrønninnretning (115), idet mikrobrønninnretningen (115) innbefatter et substrat (225) som har en flerhet av mikrobrønner (235) som åpner seg mot en dråpeoperasjonsoverflate av mikrobrønninnretningen (115), idet prøvedråpen innbefatter celler av interesse
10 som kommer inn i mikrobrønnene (235);
 - (b) å føre fangperler (525) inn i mikrobrønnene (235), hvor fangelementer immobiliseres på fangperlene (525); og
 - (c) å benytte dråpeaktuatoren (100, 1705) til å transportere en
15 cellelysereagensdråpe til mikrobrønninnretningen (115), hvor deler av cellelysereagensdråpen kommer inn i mikrobrønnene (235) og, under en inkubasjonsperiode, bevirker at cellene av interesse frigir analytt som fanges av fangelementene på fangperlene (525).

2. Fremgangsmåte ifølge krav 1, hvor
 - 20 (i) fremgangsmåten videre omfatter å benytte dråpeaktuatoren (100, 1705) til å transportere prøvedråpen bort fra mikrobrønninnretningen (115), mens minst en del av de i mikrobrønnene (235) fangede celler av interesse etterlates;
 - (ii) fremgangsmåten videre omfatter å tillate minst en del av cellene av interesse å avsette seg i mikrobrønnene (235); eller
 - 25 (iii) hvor mikrobrønninnretningens (115) dråpeoperasjonsoverflate innbefatter interstitielle områder mellom mikrobrønner (235), som er hydrofobe, slik at i det vesentlige ingen rest av cellene av interesse eller fangperlene (525) forblir på mikrobrønninnretningens (115) dråpeoperasjonsoverflate.

- 30 3. Fremgangsmåte ifølge krav 1, som videre omfatter å fjerne fangperlene (525) med den derpå fangede analytt fra mikrobrønnene (235), valgfritt hvor fjerneprosedyren innbefatter å posisjonere en magnet (1710, 1715) i nærheten av mikrobrønnene (235) for å danne et magnetfelt som trekker fangperlene (525) fra mikrobrønnene (235).

- 35 4. Fremgangsmåte ifølge krav 1, hvor hver av fangperlene (525) innbefatter en flerhet av fangelementene, valgfritt hvor flerheten av fangelementer innbefatter en fangsekvens og en entydig strekkodesekvens, valgfritt hvor fangsekvensen er én av i) en poly-T-sekvens for å fange det samlede mRNA, eller ii) en flerhet av transkriptspesifikke

fangsekvenser som bruker et panel av gener av interesse som mål.

5. Fremgangsmåte ifølge krav 1, hvor
- 5 (i) fremgangsmåten videre omfatter å benytte et magnetfelt til å bevege fangperlene (525) til og bort fra mikrobrønnene (235);
- (ii) fangperlene (525) er av en slik størrelse at kun én av fangperlene (525) passer inn i én av mikrobrønnene (235);
- (iii) fangperlene (525) avleires i mikrobrønnene (235) ved tyngdekraft; eller
- 10 (iv) fangperlene (525) er magnetiske og avleires i mikrobrønnene (235) under anvendelse av en magnetisk tiltrekning.
6. Digitalt fluidikksystem for å fange celler av interesse, idet systemet omfatter:
- 15 (a) en dråpeaktuator (100, 1705), som innbefatter en dråpeoperasjonsåpning (215), idet dråpeaktuatoren (100, 1705) innbefatter dråpeoperasjonselektroder (220) som er anordnet i nærheten av dråpeoperasjonsåpningen (215);
- (b) en mikrobrønninnretning (115), som innbefatter et substrat (225), idet mikrobrønninnretningen (115) innbefatter mikrobrønner (235) som er tildannet i substratet (225), idet mikrobrønnene (235) åpner seg mot en dråpeoperasjonsoverflate av mikrobrønninnretningen (115), hvor mikrobrønninnretningen (115) er koblet til dråpeaktuatoren (100, 1705) og posisjonert slik at mikrobrønnene (235) vender mot dråpeoperasjonsåpningen (215); og
- 20 (c) en styring (1730), som er konfigurert til å utføre programinstruksjoner for:
- (1) å anvise dråpeaktuatoren (100, 1705) til å transportere en prøvedråpe til en mikrobrønninnretning (115), idet prøvedråpen innbefatter celler av interesse som kommer inn i mikrobrønnene (235);
- 25 (2) å føre fangperler (525) inn i mikrobrønnene (235), hvor fangelementer immobiliseres på fangperlene (525); og
- (3) å anvise dråpeaktuatoren (100, 1705) til å transportere en cellelysereagensdråpe til mikrobrønninnretningen (115), hvor deler av lysereagensdråpen kommer inn i mikrobrønnene (235) og, under en inkubasjonsperiode, bevirker at cellene av interesse frigir analytt som fanges av fangelementene på fangperlene (525).
- 30
- 35 7. System ifølge krav 6, hvor:
- (i) substratet (225) innbefatter et derpå anordnet hydrofobt sjikt (230), idet det hydrofobe sjikt (230) danner dråpeoperasjonsoverflaten;
- (ii) dråpeoperasjonsåpningen (215) er konfigurert til å holde et fyllefluid

innbefattende prøvedråpen som inneholder cellene av interesse; eller

- (iii) mikrobrønnene (235) har en størrelse og et avstandsmål som er dimensjonert til å motta kun en enkelt celle fra cellene av interesse i prøvedråpen, og å motta kun en enkelt av fangperlene (525).

5

8. System ifølge krav 6, hvor:

- (i) mikrobrønnene (235) har en dybde på mellom 30 μm og 50 μm ;
(ii) mikrobrønnene (235) har en diameter på mellom 3 μm og 60 μm ;
(iii) mikrobrønnene (235) er ved hjelp av et avstandsmål anordnet med innbyrdes avstand fra hverandre som ikke er mer enn 80 μm ; eller
(iv) styringen er videre konfigurert til å utføre programinstruksjoner for, under og/eller forut for inkubasjonsperioden, å anvise dråpeaktuatoren (100, 1705) til å transportere et fluid som ikke er blandbart med cellelysereagensdråpen, til mikrobrønninnretningen (115), hvor det ikke-blandbare fluid ikke kommer inn i mikrobrønnene (235) og cellefellene, idet enkelte perler med enkelte celler derved innkapsles med cellelysereagens.

10

15

9. Fremgangsmåte for å fange celler av interesse i et digitalt mikrofluidikksystem (1700), idet fremgangsmåten omfatter:

20

- (a) å benytte en dråpeaktuator (100, 1705) av det digitale mikrofluidikksystem (1700) til å transportere en prøvedråpe til en mikrobrønninnretning (115), idet mikrobrønninnretningen (115) innbefatter et første substrat (225) som har en flerhet av mikrobrønner (235) som åpner seg mot en dråpeoperasjonsoverflate av mikrobrønninnretningen (115), og en flerhet av cellefeller som åpner seg mot mikrobrønninnretningens (115) dråpeoperasjonsoverflate, hvor cellefellene er posisjonert i tett nærhet med og åpne mot mikrobrønnene (235) på det første substrat (225), idet prøvedråpen innbefatter celler av interesse som kommer inn i cellefellene;

25

- (b) å føre fangperler (525) inn i mikrobrønnene (235), hvor fangelementer immobiliseres på fangperlene (525); og

30

- (c) å benytte dråpeaktuatoren (100, 1705) til å transportere en cellelysereagensdråpe til mikrobrønninnretningen (115), hvor deler av cellelysereagensdråpen kommer inn i mikrobrønnene (235) og cellefellene og, under en inkubasjonsperiode, bevirker at cellene av interesse frigir analytt som fanges av fangelementene på fangperlene (525).

35

10. Fremgangsmåte ifølge krav 9, hvor:

- (i) fangperlene (525) er av en slik størrelse at kun én av fangperlene (525) passer

- inn i én av mikrobrønnene (235); og/eller
- (ii) cellefellene er av en slik størrelse at kun én av cellene av interesse passer inn i én av cellefellene.
- 5 11. Fremgangsmåte ifølge krav 9 eller krav 10, som videre omfatter:
- (d) under og/eller forut for inkubasjonsperioden, å benytte dråpeaktuatoren (100, 1705) til å transportere et fluid som ikke er blandbart med cellelysereagensdråpen, til mikrobrønninnretningen (115), hvor det ikke-blandbare fluid ikke kommer inn i mikrobrønnene (235) og cellefellene, idet enkelte perler med enkelte celler derved innkapsles med cellelysereagens.
- 10
12. Fremgangsmåte ifølge krav 9, som videre omfatter å fjerne fangperlene (525) med den derpå fangede analytt fra mikrobrønnene (235); valgfritt hvor fjerneprosedyren innbefatter å posisjonere en magnet i nærheten av mikrobrønnene (235) for å danne et magnetfelt som trekker fangperlene (525) fra mikrobrønnene (235).
- 15
13. Fremgangsmåte ifølge krav 9, hvor:
- (i) fremgangsmåten videre omfatter å benytte et magnetfelt til å bevege fangperlene (525) til og bort fra mikrobrønnene (235); eller
- 20 (ii) hver av fangperlene (525) innbefatter en flerhet av fangelementene, valgfritt hvor flerheten av fangelementer innbefatter en fangsekvens og en entydig strekkodesekvens, hvor fangsekvensen er valgfritt én av i) en poly-T-sekvens for å fange det samlede mRNA, eller ii) en flerhet av transkriptspesifikke fangsekvenser som bruker et panel av gener av interesse som mål.
- 25
14. Digitalt fluidikksystem for å fange celler av interesse, idet systemet omfatter:
- (a) en dråpeaktuator (100, 1705), som innbefatter en dråpeoperasjonsåpning (215), idet dråpeaktuatoren (100, 1705) innbefatter dråpeoperasjonselektroder som er anordnet i nærheten av dråpeoperasjonsåpningen (215);
- 30 (b) mikrobrønninnretning (115), som innbefatter:
- (1) et første substrat (110), idet mikrobrønninnretningen (115) innbefatter mikrobrønner (235) som er tildannet i det første substrat (110), idet mikrobrønnene (235) åpner seg mot en dråpeoperasjonsoverflate av mikrobrønninnretningen (115), hvor mikrobrønninnretningen (115) er koblet til dråpeaktuatoren (100, 1705) og posisjonert slik at mikrobrønnene (235) vender mot dråpeoperasjonsåpningen (215); og
- 35 (2) et andre substrat (1710), idet mikrobrønninnretningen (115) innbefatter cellefeller som er tildannet på det andre substrat (1710), hvor cellefellene er

posisjonert i tett nærhet med og åpne mot mikrobrønnene (235) på det første substrat (110), idet cellefellene åpner seg mot mikrobrønninnretningens (115) dråpeoperasjonsoverflate;

(c) en styring, som er konfigurert til å utføre programinstruksjoner for:

- 5
- (1) å anvise dråpeaktuatoren (100, 1705) til å transportere en prøvedråpe til en mikrobrønninnretning (115), idet prøvedråpen innbefatter celler av interesse som kommer inn i cellefellene;
- (2) å føre fangperler (525) inn i mikrobrønnene (235), hvor fangelementer immobiliseres på fangperlene (525); og
- 10
- (3) å anvise dråpeaktuatoren (100, 1705) til å transportere en cellelysereagensdråpe til mikrobrønninnretningen (115), hvor deler av lysereagensdråpen kommer inn i cellefellene og mikrobrønnene (235) og, under en inkubasjonsperiode, bevirker at cellene av interesse frigir analytt som fanges av fangelementene på fangperlene (525).

15

15. System ifølge krav 14, hvor:

- (i) det første substrat (110) innbefatter et derpå anordnet hydrofobt sjikt (1020), idet det hydrofobe sjikt (1020) danner dråpeoperasjonsoverflaten; eller
- (ii) mikrobrønnene (235) har en størrelse og et avstandsmål som er dimensjonert til
- 20
- å motta kun en enkelt av fangperlene (525).