



(12) Translation of
European patent specification

(11) NO/EP 3635136 B1

NORWAY

(19) NO
(51) Int Cl.
C12Q 1/6806 (2018.01)

Norwegian Industrial Property Office

(45)	Translation Published	2022.02.07
(80)	Date of The European Patent Office Publication of the Granted Patent	2021.10.20
(86)	European Application Nr.	18734381.9
(86)	European Filing Date	2018.06.05
(87)	The European Application's Publication Date	2020.04.15
(30)	Priority	2017.06.07, US, 201762516324 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	Oregon Health & Science University, 3181 S.W. Sam Jackson Park Road, Portland, Oregon 97239, USA Illumina, Inc., 5200 Illumina Way, San Diego, CA 92122, USA
(72)	Inventor	ADEY, Andrew C., 3181 S.W. Sam Jackson Park Rd., Portland, OR 97239, USA MULQUEEN, Ryan, 3181 S.W. Sam Jackson Park Rd., Portland, OR 97239, USA STEEMERS, Frank J., 5200 Illumina Way, San Diego, CA 92122, USA POKHOLOK, Dmitry K., 5200 Illumina Way, San Diego, CA 92122, USA NORBERG, Steven, 5200 Illumina Way, San Diego, CA 92122, USA
(74)	Agent or Attorney	ZACCO NORWAY AS, Postboks 488, 0213 OSLO, Norge

(54)	Title	SINGLE CELL WHOLE GENOME LIBRARIES FOR METHYLATION SEQUENCING
(56)	References Cited:	SARAH A VITAK ET AL: "Sequencing thousands of single-cell genomes with combinatorial indexing", NATURE METHODS, vol. 14, no. 3, 30 January 2017 (2017-01-30), pages 302-308, XP055416420, New York ISSN: 1548-7091, DOI: 10.1038/nmeth.4154 SÉBASTIEN A SMALLWOOD ET AL: "Single-cell genome-wide bisulfite sequencing for assessing epigenetic heterogeneity", NATURE METHODS, vol. 11, no. 8, 1 August 2014 (2014- 08-01) , pages 817-820, XP055503729, New York ISSN: 1548-7091, DOI: 10.1038/nmeth.3035

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/>

EP3635136

1

Patentkrav

1. En fremgangsmåte for å fremstille et sekvenseringsbibliotek for å bestemme metyleringsstatusen av nukleinsyrer fra en flerhet av enkeltceller, hvor fremgangsmåten omfatter:

5

(a) å tilveiebringeisolerte kjerner fra en flerhet av celler;

(b) å underkaste de isolerte kjernene for en kjemisk behandling for å generere nukleosom-utarmede kjerner, mens integriteten av de isolerte kjernene opprettholdes;

10

(c) å distribuere undersett av de nukleosom-utarmede kjernene inn i en første flerhet av rom som omfatter et transposom-kompleks, hvor transposom-komplekset i hvert rom omfatter en første indekssekvens som er forskjellig fra første indekssekvenser i de andre rommene;

15

(d) å fragmentere nukleinsyrer i undersettene av nukleosom-utarmede kjerner inn i en flerhet av nukleinsyrefragmenter og å inkorporere den første indekssekvensens inn i minst én tråd av nukleinsyrefragmentene for å generere indekserte kjerner;

(e) å kombinere de indekserte kjernene for å generere sammenslåtte indekserte kjerner;

20

(f) å distribuere undersett av de sammenslåtte indekserte kjernene inn i en andre flerhet av rom og å underkaste de indekserte kjernene for bisulfitt-behandling for å generere bisulfitt-behandlede nukleinsyrefragmenter;

25

(g) å amplifisere de bisulfitt-behandlede nukleinsyrefragmentene i hvert rom ved lineær amplifisering med en flerhet av primere som omfatter en universell nukleotidsekvens ved 5'-enden og en tilfeldig nukleotidsekvens ved 3'-enden for å generere amplifiserte fragment-adapter molekyler;

(h) å inkorporere en andre indekssekvens inn i de amplifiserte fragment-adapter molekylerne for å generere dual-indeks fragment-adapter

EP3635136

2

molekyler, hvor den andre indekssekvensen i hvert rom er forskjellig fra andre indekssekvenser i de andre rommene; og

5 (i) å kombinere de dual-indeks fragment-adapter molekylerne, for derved å produsere et sekvenseringsbibliotek for å bestemme metyleringsstatusen av nukleinsyrer fra flerheten av enkeltceller, eventuelt hvor distribusjonen i trinn (c) og (f) blir utført ved fluorescensaktivert kjernesortering.

10 **2.** Fremgangsmåten ifølge krav 1, hvor bisulfitt-behandlingen konverterer umetylerte cytosinrester av CpG dinukleotider til uracilrester og etterlater 5-metylcytosinrester uendret, eller hvor den lineære amplifiseringen av de bisulfitt-behandlede nukleinsyrefragmentene omfatter 1 til 10 sykluser, eller hvor den universelle nukleotidsekvensen ved 5'-enden av primerne i trinn (g) omfatter en andre sekvenseringsprimersekvens, eller hvor den tilfeldige nukleotidsekvensen ved 3'-enden av primerne i trinn (g) består av 9 tilfeldige nukleotider.

15 **3.** En fremgangsmåte for å fremstille et sekvenseringsbibliotek for å bestemme metyleringsstatusen til nukleinsyrer fra en flerhet av enkeltceller, hvor fremgangsmåten omfatter:

20 (a) å tilveiebringe isolerte kjerner fra en flerhet av celler;

(b) å underkaste de isolerte kjernene for en kjemisk behandling for å generere nukleosom-utarmede kjerner, mens integriteten av de isolerte kjernene opprettholdes;

25 (c) å distribuere undersett av de nukleosom-utarmede kjernene inn i en første flerhet av rom som omfatter et transposom-kompleks, hvor transposom-komplekset i hvert rom omfatter en første indekssekvens som er forskjellig fra første indekssekvenser i de andre rommene;

(d) å fragmentere nukleinsyrer i undersettene av nukleosom-utarmede kjerner inn i en flerhet av nukleinsyrefragmenter og å inkorporere den første indekssekvensens inn i minst én tråd av nukleinsyrefragmentene for

30 å generere indekserte kjerner;

(e) å kombinere de indekserte kjernene for å generere sammenslåtte indekserte kjerner;

5 (f) å distribuere undersett av de sammenslåtte indekserte kjernene inn i en andre flerhet av rom og å underkaste de indekserte kjernene for bisulfitt-behandling for å generere bisulfitt-behandlede nukleinsyre-fragmenter;

(g) å ligere bisulfitt-behandlede nukleinsyrefragmenter i hvert rom til en universell adapter for å generere ligerte fragment-adapter molekyler;

10 (h) å inkorporere en andre indekssekvens inn i de ligerte fragment-adapter molekylerne for å generere dual-indeks fragment-adapter molekyler, hvor den andre indekssekvensen i hvert rom er forskjellig fra andre indekssekvenser i de andre rommene; og

15 (i) å kombinere de dual-indeks fragment-adapter molekylerne, for derved å produsere et sekvenseringsbibliotek for å bestemme metyleringsstatusen av nukleinsyrer fra flerheten av enkeltceller, eventuelt hvor distribusjonen i trinn (c) og (f) blir utført ved fluorescensaktivert kjernesortering.

20 **4.** Fremgangsmåten ifølge krav 1 eller krav 3, hvor den kjemiske behandlingen omfatter en behandling med et kaotropt middel som er i stand til å forstyrre nukleinsyre-protein-interaksjoner, eventuelt hvor det kaotrope midlet omfatter litiumdijodsalisylat, eller hvor den kjemiske behandlingen omfatter en behandling med en detergent som er i stand til å forstyrre nukleinsyre-protein-interaksjoner, eventuelt hvor detergenten omfatter natriumdodecylsulfat (SDS), videre eventuelt hvor cellene er behandlet med et kryssbindingsmiddel før trinn (a),
25 videre eventuelt hvor kryssbindingsmidlet er formaldehyd.

5. Fremgangsmåten ifølge krav 1 eller krav 3, hvor undersettene av de nukleosom-utarmede kjernene omfatter omtrent samme antall av kjerner, eventuelt hvor undersettene av de nukleosom-utarmede kjernene omfatter fra 1
30 til rundt 2000 kjerner.

EP3635136

4

5 **6.** Fremgangsmåten ifølge krav 1 eller krav 3, hvor den første flerheten av rom er en multi-brønns plate, eventuelt hvor multi-brønns platen er en 96-brønns plate eller en 384-brønns plate, eller hvor den andre flerheten av rom er en multi-brønns plate, eventuelt hvor multi-brønns platen er en 96-brønns plate eller en 384-brønns plate.

10 **7.** Fremgangsmåten ifølge krav 1 eller krav 3, hvor undersettene av de sammenslåtte indekserte kjernene omfatter omtrent samme antall av kjerner, eventuelt hvor undersettene av de sammenslåtte indekserte kjernene omfatter fra 1 til rundt 25 kjerner, eller hvor undersettene av de sammenslåtte indekserte kjernene inkluderer minst 10 ganger færre kjerner enn undersettene av de nukleosom-utarmede kjernene, eventuelt hvor undersettene av de sammenslåtte indekserte kjernene inkluderer minst 100 ganger færre kjerner enn undersettene av de nukleosom-utarmede kjernene.

15 **8.** Fremgangsmåten ifølge krav 1 eller krav 3, hvor hvert av transposom-kompleksene omfatter transposaser og transposoner, hvor hvert av transposonene omfatter en overført tråd, eventuelt hvor den overførte tråden ikke omfatter en cytosinrest, videre eventuelt hvor den overførte tråden omfatter den første indekssekvensen, videre eventuelt hvor den overførte tråden videre omfatter en første universell sekvens og en første sekvenseringsprimersekvens.

20 **9.** Fremgangsmåten ifølge krav 3, hvor bisulfitt-behandlingen konverterer umetylerte cytosinrester av CpG dinukleotider til uracilrester og etterlater 5-metylcytosinrester uendret.

25 **10.** Fremgangsmåten ifølge krav 3, som videre omfatter å tilsette ett eller flere nukleotider til 3'-endene av de bisulfitt-behandlede nukleinsyrefragmentene for å skape et 3'-overheng før ligeringen av den universelle adapteren, eventuelt hvor tilsettingen av ett eller flere nukleotider blir utført ved å anvende en terminal transferase, videre eventuelt hvor den universelle adapteren omfatter et overheng som er reverst komplementært til 3'-overhengen i de bisulfitt-behandlede nukleinsyrefragmentene.

11. Fremgangsmåten ifølge krav 1 eller krav 3, hvor inkorporeringen av den andre indekssekvensen i trinn (h) omfatter å kontakte de dual-indeks fragment-adapter molekylerne i hvert rom med en første universell primer og en andre universell primer, hvor hver omfatter en indekssekvens, og å utføre en eksponentiell amplifikasjonsreaksjon, eventuelt hvor indekssekvensen av den første universelle primeren er det reverse komplementet til indekssekvensen av den andre universelle primeren, eller hvor indekssekvensen av den første universelle primeren er forskjellig fra det reverse komplementet til indekssekvensen av den andre universelle primeren.

12. Fremgangsmåten ifølge krav 1 eller krav 11, hvor den første universelle primeren videre omfatter en første innfangingssekvens og en første ankersekvens komplementær til en universell sekvens ved 3'-enden av de dual-indeks fragment-adapter molekylerne, eventuelt hvor den første innfangingssekvensen omfatter P5-primersekvensen, eller hvor den andre universelle primeren videre omfatter en andre innfangingssekvens og en andre ankersekvens komplementær til en universell sekvens ved 5'-enden av de dual-indeks fragment-adapter molekylerne, eventuelt hvor den andre innfangingssekvensen omfatter det reverse komplementet til P7-primersekvensen.

13. Fremgangsmåten ifølge krav 1 eller krav 11, hvor den eksponentielle amplifikasjons reaksjon omfatter en polymerasekjedereaksjon (PCR), eventuelt hvor PCR-en omfatter 15 til 30 sykluser.

14. Fremgangsmåten ifølge krav 1 eller krav 3, som videre omfatter en anrikning av målnukleinsyrer ved å anvende en flerhet av innfangingsoligonukleotider som har spesifisitet for målnukleinsyrene, eventuelt hvor innfangingsoligonukleotidene er immobilisert på en overflate av et fast substrat, eller hvor innfangingsoligonukleotidene omfatter et første medlem av et universelt bindingspar, og hvor et andre medlem av bindingsparet er immobilisert på en overflate av et fast substrat.

EP3635136

6

5 **15.** Fremgangsmåten ifølge krav 1 eller krav 3, som videre omfatter seleksjon av de dual-indeks fragment-adapter molekylene som faller innenfor et forhåndsbestemt størrelsesområde, eller som videre omfatter sekvensering av de dual-indeks fragment-adapter molekylene for å bestemme metyleringsstatusen til nukleinsyrer fra flerheten av enkeltceller.

16. Fremgangsmåten ifølge krav 15 som avhengig av krav 1, som videre omfatter:

10 å tilveiebringe en overflate som omfatter en flerhet av amplifikasjonsseter, hvor amplifikasjonssetene omfatter minst to populasjoner av festede enkelt trådede nukleinsyrer som har en fri 3'-ende, og

15 å kontakte overflaten som omfatter amplifikasjonsseter med sekvenseringsbiblioteket under betingelser egnet til å produsere en flerhet av amplifikasjonsseter som hver omfatter en klonal populasjon av amplikoner fra et individuelt dual-indeks fragment-adapter molekyl, eventuelt hvor antallet av de dual-indeks fragment-adapter molekylene overskrider antallet av amplifikasjonsseter, hvor de dual-indeks fragment-adapter molekylene har fluidtilgang til amplifikasjonssetene, og hvor hver av amplifikasjonssetene omfatter en kapasitet for flere dual-indeks fragment-adapter molekyler i sekvenseringsbiblioteket,

20

25 eller hvor det å kontakte omfatter simultant (i) å transportere de dual-indeks fragment-adapter molekylene til amplifikasjonssetene med en gjennomsnittlig transporthastighet, og (ii) å amplifisere de dual-indeks fragment-adapter molekylene som er ved amplifikasjonssetene med en gjennomsnittlig amplifikasjonshastighet, hvor den gjennomsnittlige amplifikasjonshastigheten overstiger den gjennomsnittlige transport-hastigheten.

30 **17.** Fremgangsmåten ifølge krav 15 som avhengig av krav 3, som videre omfatter:

å tilveiebringe en overflate som omfatter en flerhet av amplifikasjonsseter, hvor amplifikasjonssetene omfatter minst to populasjoner av festede enkelt trådede nukleinsyrer som har en fri 3'-ende, og

5 å kontakte overflaten som omfatter amplifikasjonsseter med sekvenseringsbiblioteket under betingelser egnet til å produsere en flerhet av amplifikasjonsseter som hver omfatter en klonal populasjon av amplikoner fra et individuelt dual-indeks fragment-adapter molekyl, eventuelt hvor antallet av de dual-indeks fragment-adapter molekylene overskrider antallet av amplifikasjonsseter, hvor de dual-indeks fragment-adapter molekylene har fluidtilgang til amplifikasjonssetene, og hvor hver 10 av amplifikasjonssetene omfatter en kapasitet for flere dual-indeks fragment-adapter molekyler i sekvenseringsbiblioteket, eller hvor det å kontakte omfatter simultant (i) å transportere de dual-indeks fragment-adapter molekylene til amplifikasjonssetene med en gjennomsnittlig 15 transporthastighet, og (ii) å amplifisere de dual-indeks fragment-adapter molekylene som er ved amplifikasjonssetene med en gjennomsnittlig amplifikasjonshastighet, hvor den gjennomsnittlige amplifikasjons-hastigheten overstiger den gjennomsnittlige transporthastigheten.