



(12) Translation of
European patent specification

(11) NO/EP 3810774 B1

NORWAY

(19) NO

(51) Int Cl.

C12N 15/10 (2006.01)

C12Q 1/6813 (2018.01)

C12Q 1/6844 (2018.01)

C12Q 1/6806 (2018.01)

C12Q 1/6816 (2018.01)

C12Q 1/6869 (2018.01)

Norwegian Industrial Property Office

(45)	Translation Published	2024.01.22
(80)	Date of The European Patent Office Publication of the Granted Patent	2023.09.13
(86)	European Application Nr.	19814056.8
(86)	European Filing Date	2019.06.04
(87)	The European Application's Publication Date	2021.04.28
(30)	Priority	2018.06.04, US, 201862680259 P 2019.03.21, US, 201962821678 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 University of Washington, 4545 Roosevelt Way NE, Suite 400, Seattle, WA 98105, USA
(72)	Inventor	STEEMERS, Frank J., 5200 Illumina Way, San Diego, CA 92122, USA SHENDURE, Jay, 4545 Roosevelt Way NE, Suite 400, Seattle, WA 98105, USA CAO, Junyue, 4545 Roosevelt Way NE, Suite 400, Seattle, WA 98105, USA TOME, Jacob, 4545 Roosevelt Way, NE, Suite 400, Seattle, WA 98105, USA GASPERINI, Molly, 4545 Roosevelt Way, NE, Suite 400, Seattle, WA 98105, USA
(74)	Agent or Attorney	Murgitroyd & Company, Mannerheimvägen 12 B, 5tr, 00100 HELSINGFORS, Finland

(54)	Title	METHODS OF MAKING HIGH-THROUGHPUT SINGLE-CELL TRANSCRIPTOME LIBRARIES
(56)	References Cited:	WO-A1-2015/200609 WO-A1-2018/125982 WO-A2-2016/130704 US-A1- 2003 082 584 US-A1- 2018 023 119 RAPOLAS ZILIONIS ET AL: "Single-cell barcoding and sequencing using droplet microfluidics", NATURE PROTOCOLS, vol. 12, no. 1, 8 December 2016 (2016-12-08), pages 44-73, XP055532179, GB ISSN: 1754-2189, DOI: 10.1038/nprot.2016.154 ALLON M. KLEIN ET AL: "Droplet Barcoding for Single-Cell Transcriptomics Applied to Embryonic Stem Cells", CELL, vol. 161, no. 5, 1 May 2015 (2015-05-01), pages 1187-1201, XP055731640, Amsterdam NL ISSN: 0092-8674, DOI: 10.1016/j.cell.2015.04.044 Patrone G. ET AL: "Nuclear Run-On Assay Using Biotin Labeling, Magnetic Bead Capture and Analysis by Fluorescence-Based RT-PCR", BioTechniques, 1 November 2000 (2000-11-01), pages 1012-1017, XP055913071, DOI: 10.2144/00295st02 Retrieved from the Internet: URL:https://www.future-science.com/doi/epd/f/10.2144/00295st02 [retrieved on 2022-04-14]

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 fremstilling av et sekvenseringsbibliotek omfattende nukleinsyrer fra en flerhet av enkeltcellekjerner eller enkeltceller, idet fremgangsmåten omfatter:
 - 5 (a) å tilveiebringe en flerhet av cellekjerner eller celler i en første flerhet av seksjoner, hvor hver seksjon omfatter en delmengde av cellekjerner eller celler;
 - (b) å merke ny-syntetisert RNA i delmengdene av celler eller cellekjerner oppnådd fra cellene;
 - 10 (c) å prosessere RNA-molekyler i hver delmengde av cellekjerner eller celler for å generere indekserte cellekjerner eller celler, hvor prosesseringen omfatter å tilføye til RNA-nukleinsyrene som er til stede i hver delmengde av cellekjerner eller celler, en første seksjonsspesifikk indekssekvens for å resultere i indekserte nukleinsyrer som er til stede i indekserte cellekjerner eller celler,
 - 15 (d) hvor prosesseringen omfatter ligasjon, primerforlengelse, hybridisering eller amplifikasjon; og
 - (d) å kombinere de indekserte cellekjerner eller celler for å generere sammenslåtte indekserte cellekjerner eller celler.
- 20 2. Fremgangsmåte ifølge krav 1, hvor prosesseringen omfatter:
å bringe delmengder med revers transkriptase i kontakt med en primer som annealer til RNA-nukleinsyrer, hvilket resulterer i dobbeltstrengede nukleinsyrer som omfatter primeren og den tilsvarende DNA-nukleotidsekvens av RNA-molekylene.
- 25 3. Fremgangsmåte ifølge krav 2, hvor primeren omfatter en poly-T-nukleotidsekvens som annealer til en mRNA poly(A)-hale.
4. Fremgangsmåte ifølge krav 3, hvor prosesseringen videre omfatter å bringe delmengder i kontakt med en andre primer, hvor den andre primer omfatter en sekvens
30 som annealer til en forutbestemt DNA-nukleinsyre; og valgfritt
hvor den andre primer omfatter en seksjonsspesifikk indeks.
5. Fremgangsmåte ifølge krav 2, hvor primeren omfatter en sekvens som annealer til en forutbestemt RNA-nukleinsyre, hvor fremgangsmåten omfatter primere i forskjellige
35 seksjoner som annealer til forskjellige nukleotider av den samme forutbestemte RNA-nukleinsyre.
6. Fremgangsmåte ifølge krav 1, hvor prosesseringen for å tilføye den første

- seksjonsspesifikke indekssekvens omfatter en totrinnsprosess av å tilføye en nukleinssekvens som omfatter en universalsekvens, til RNA-nukleinsyrene for å resultere i nukleinsyrer som omfatter universalsekvensen, og deretter å tilføye den første seksjonsspesifikke indekssekvens til nukleinsyrene som omfatter universalsekvensen.
- 5
7. Fremgangsmåte ifølge krav 1, hvor allerede eksisterende RNA-nukleinsyrer og ny-syntetiserte RNA-nukleinsyrer merkes med den samme indeks i den samme seksjon.
 - 10 8. Fremgangsmåte ifølge krav 1, hvor merkingen omfatter å inkubere flerheten av cellekjerne eller celler i en sammensetning som omfatter et nukleotidmerke, hvor nukleotidmerket inkorporeres i det ny-syntetiserte RNA.
 - 15 9. Fremgangsmåte ifølge krav 1, som videre omfatter å eksponere delmengder av cellekjerne eller celler for en forutbestemt tilstand før merkingen, hvor den forutbestemte tilstand fortrinnsvis omfatter eksponering for et middel som omfatter et protein, et ikke-ribosomalt protein, et polyketid, et organisk molekyl, et uorganisk molekyl, et RNA- eller RNAi-molekyl, et karbohydrat, et glykoprotein, en nukleinsyre eller en kombinasjon derav; men mest foretrukket omfatter middelet et terapeutisk medikament.
 - 20 10. Fremgangsmåte ifølge krav 9, hvor den forutbestemte tilstand av to eller flere seksjoner er forskjellig når fremgangsmåten omfatter å eksponere delmengder av cellekjerne eller celler for en forutbestemt tilstand før merkingen.
 - 25 11. Fremgangsmåte ifølge krav 1, som videre omfatter:
å fordele delmengder av de sammenslåtte indekserte cellekjerne eller celler på en andre flerhet av seksjoner, og å tilføye til indekserte nukleinsyrer som er til stede i delmengder av cellekjerne eller celler, en andre indekssekvens for å generere dobbelt indekserte cellekjerne eller celler omfattende dobbelt indekserte nukleinsyrefragmenter, hvor tilføysen omfatter ligasjon, primerforlengelse, hybridisering, amplifikasjon eller transposisjon;
å kombinere de dobbelt indekserte cellekjerne eller celler for å generere sammenslåtte dobbelt indekserte cellekjerne eller celler.
 - 30 12. Fremgangsmåte ifølge krav 11, som videre omfatter:
å fordele delmengder av de sammenslåtte dobbelt indekserte cellekjerne eller celler på en tredje flerhet av seksjoner, og å tilføye til indekserte nukleinsyrer som er til stede i
 - 35

- delmengder av cellekjerner eller celler, en tredje indekssekvens for å generere trippelt indekserte cellekjerner eller celler omfattende trippelt indekserte nukleinsyrefragmenter, hvor tilføyelsen omfatter ligasjon, hybridisering, primerforlengelse, amplifikasjon eller transposisjon;
- 5 å kombinere de trippelt indekserte cellekjerner eller celler for å generere sammenslåtte trippelt indekserte cellekjerner eller celler.
13. Fremgangsmåte ifølge krav 1, hvor tilføyelsen omfatter ligasjon av den første seksjonsspesifikke indekssekvens, videre omfattende å tilføye en andre indekssekvens
- 10 for å generere dobbelt indekserte cellekjerner eller celler omfattende dobbelt indekserte nukleinsyrefragmenter, hvor tilføyelsen omfatter transposisjon.
14. Fremgangsmåte ifølge krav 11, hvor tilføyelsen omfatter ligasjon av den andre seksjonsspesifikke indekssekvens, videre omfattende å tilføye en tredje indekssekvens
- 15 for å generere dobbelt indekserte cellekjerner eller celler omfattende trippelt indekserte nukleinsyrefragmenter, hvor tilføyelsen omfatter transposisjon.
15. Fremgangsmåte ifølge krav 1, som videre omfatter å oppnå de indekserte nukleinsyrer fra de sammenslåtte indekserte cellekjerner eller celler, idet det derved produseres et
- 20 sekvenseringsbibliotek fra flerheten av cellekjerner eller celler.
16. Fremgangsmåte ifølge krav 11, som videre omfatter å oppnå de dobbelt indekserte nukleinsyrer fra de sammenslåtte dobbelt indekserte cellekjerner eller celler, idet det derved produseres et sekvenseringsbibliotek fra flerheten av cellekjerner eller celler.
- 25 17. Fremgangsmåte ifølge krav 12, som videre omfatter å oppnå de trippelt indekserte nukleinsyrer fra de sammenslåtte trippelt indekserte cellekjerner eller celler, idet det derved produseres et sekvenseringsbibliotek fra flerheten av cellekjerner eller celler.
- 30 18. Fremgangsmåte ifølge krav 2, hvor primeren omfatter en sekvens som annealer til en forutbestemt RNA-nukleinsyre, og fortrinnsvis hvor den forutbestemte RNA-nukleinsyre er et mRNA.
19. Fremgangsmåte ifølge krav 2, hvor primeren omfatter en template-switch-primer.
- 35 20. Fremgangsmåte ifølge krav 8, hvor nukleotidmerket omfatter en nukleotidanalogue, et haptenmerket nukleotid, et mutagent nukleotid eller et nukleotid som kan modifiseres ved en kjemisk reaksjon.

21. Fremgangsmåte ifølge krav 8, hvor mer enn ett nukleotidmerke inkorporeres i det nysyntetiserte RNA, og forholdet av nukleotidmerke eller -merker fortrinnsvis er forskjellig for forskjellige seksjoner eller tidspunkter.
- 5 22. Fremgangsmåte ifølge krav 9, hvor eksponeringen og merkingen finner sted på samme tid eller eksponeringen finner sted før merkingen.