



(12) Translation of
European patent specification

(11) NO/EP 3981884 B1

NORWAY

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

Norwegian Industrial Property Office

(45)	Translation Published	2023.10.23
(80)	Date of The European Patent Office Publication of the Granted Patent	2023.08.09
(86)	European Application Nr.	21203166.0
(86)	European Filing Date	2018.06.05
(87)	The European Application's Publication Date	2022.04.13
(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
(62)	Divided application	EP3635136, 2018.06.05
(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, Portland, Oregon 97239, USA MULQUEEN, Ryan, Portland, Oregon 97239, USA STEEMERS, Frank J., San Diego, California 92122, USA POKHOLOK, Dmitry K., San Diego, California 92122, USA NORBERG, Steven, San Diego, California 92122, USA
(74)	Agent or Attorney	Novagraaf Brevets, Bâtiment O2, 2 rue Sarah Bernhardt CS90017, 92665 ASNIÈRES-SUR-SEINE CEDEX, Frankrike

(54)	Title	SINGLE CELL WHOLE GENOME LIBRARIES FOR METHYLATION SEQUENCING
(56)	References Cited:	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 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 D. A. CUSANOVICH ET AL: "Multiplex single-cell profiling of chromatin accessibility by combinatorial cellular indexing", SCIENCE, vol. 348, no. 6237, 21 May 2015 (2015-05-21), pages 910-914, XP055416774, US ISSN: 0036-8075, DOI: 10.1126/science.aab1601

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 fremstille et sekvenseringsbibliotek for å bestemme metyleringsstatusen til nukleinsyrer fra en flerhet av enkeltceller, idet fremgangsmåten omfatter å:

- 5 (a) tilveiebringe isolerte cellekjerner fra en flerhet av celler;
- (b) utsette de isolerte kjernene for en kjemisk behandling for å generere nukleosom-tomme kjerner, og samtidig opprettholde integriteten til de isolerte kjernene;
- (c) fordele undersett av de nukleosom-tomme kjernene i en første flerhet av
10 kammere som omfatter et transposomkompleks, hvor transposomkomplekset i hvert kammer omfatter en første indekssekvens som er forskjellig fra første indekssekvenser i de andre kammerne;
- (d) fragmentere nukleinsyrer i undersettene av nukleosom-tomme kjerner til en flerhet av nukleinsyrefragmenter og inkorporere de første indekssekvensene i
15 minst én tråd av nukleinsyrefragmentene for å generere indekserte kjerner;
- (e) kombinere de indekserte kjernene for å generere sammenslåtte indekserte kjerner;
- (f) fordele undersett av de sammenslåtte indekserte kjernene i en andre flerhet av kammere og utsette de indekserte kjernene for behandling for å
20 identifisere metylerte nukleotider og for å generere behandlede nukleinsyrefragmenter, valgfritt hvor behandlingen omfatter bisulfitt eller hydrazin;
- (g) amplifisere de behandlede nukleinsyrefragmentene i hvert kammer ved lineær amplifisering med en flerhet av primere som omfatter en universell nukleotidsekvens i 5'-enden og en tilfeldig nukleotidsekvens i 3'-enden for å
25 generere amplifiserte fragment-adaptermolekyler;
- (h) inkorporere en andre indekssekvens i de amplifiserte fragment-adaptermolekylene for å generere fragment-adaptermolekyler med dobbelindeks,

hvor den andre indekssekvensen i hvert kammer er forskjellig fra andre indekssekvenser i de andre kammerne; og

- (i) kombinere fragment-adaptermolekylene med dobbelindeks, og derved fremstille et sekvenseringsbibliotek for å bestemme metyleringsstatusen til nukleinsyrer fra flerheten av enkeltceller, valgfritt hvor fordelingen i trinn (c) og (f) utføres ved fluorescensaktivert kjernesortering.

2. Fremgangsmåten ifølge krav 1, hvor behandlingen identifiserer metylerte CpG-dinukleotidsekvenser, eller hvor den lineære amplifiseringen av de behandlede nukleinsyrefragmentene omfatter 1 til 10 sykluser, eller hvor den universelle nukleotidsekvensen i 5'-enden av primerne i trinn (g) omfatter en andre sekvenseringsprimersekvens, eller hvor den tilfeldige nukleotidsekvensen i 3'-enden av primerne i trinn (g) består av 9 tilfeldige nukleotider.

3. Fremgangsmåte for å fremstille et sekvenseringsbibliotek for å bestemme metyleringsstatusen til nukleinsyrer fra en flerhet av enkeltceller, idet fremgangsmåten omfatter å:

- (a) tilveiebringe isolerte cellekjerner fra en flerhet av celler;
- (b) utsette de isolerte kjernene for en kjemisk behandling for å generere nukleosom-tomme kjerner, og samtidig opprettholde integriteten til de isolerte kjernene;
- 20 (c) fordele undersett av de nukleosom-tomme kjernene i en første flerhet av kammer som omfatter et transposomkompleks, hvor transposomkomplekset i hvert kammer omfatter en første indekssekvens som er forskjellig fra første indekssekvenser i de andre kammerne;
- (d) fragmentere nukleinsyrer i undersettene av nukleosom-tomme kjerner til 25 en flerhet av nukleinsyrefragmenter og inkorporere de første indekssekvensene i minst én tråd av nukleinsyrefragmentene for å generere indekserte kjerner;
- (e) kombinere de indekserte kjernene for å generere sammenslåtte indekserte kjerner;

- (f) fordele undersett av de sammenslåtte indekserte kjernene i en andre flerhet av kammere og utsette de indekserte kjernene for behandling for å identifisere metylerte nukleotider og for å generere behandlede nukleinsyrefragmenter, valgfritt hvor behandlingen omfatter bisulfitt eller hydrazin;
- 5 (g) ligere de behandlede nukleinsyrefragmentene i hvert kammer til en universell adapter for å generere ligerte fragment-adaptermolekyler;
- (h) inkorporere en andre indekssekvens i de ligerte fragment-adaptermolekylene for å generere fragment-adaptermolekyler med dobbelindeks, hvor den andre indekssekvensen i hvert kammer er forskjellig fra andre
- 10 indekssekvenser i de andre kammerne; og
- (i) kombinere fragment-adaptermolekylene med dobbelindeks, og derved fremstille et sekvenseringsbibliotek for å bestemme metyleringsstatusen til nukleinsyrer fra flerheten av enkeltceller, valgfritt hvor fordelingen i trinn (c) og (f) utføres ved fluorescensaktivert kjernesortering.
- 15 4. Fremgangsmåten ifølge krav 1 eller krav 3, hvor den kjemiske behandlingen omfatter en behandling med et kaotropisk middel som er i stand til å forstyrre nukleinsyre-protein-interaksjoner, valgfritt hvor det kaotropiske middelet omfatter litiumdijodsalisylat, eller hvor den kjemiske behandlingen omfatter en behandling med et vaskemiddel som er i stand til å forstyrre nukleinsyre-protein-
- 20 interaksjoner, valgfritt hvor vaskemiddelet omfatter natriumdodecylsulfat (SDS), ytterligere valgfritt hvor cellene behandles med et kryssbindende middel før trinn (a), ytterligere valgfritt hvor det kryssbindende middelet er formaldehyd
5. Fremgangsmåten ifølge krav 1 eller krav 3, hvor undersettene av nukleosom-tomme kjerner omfatter omtrent like antall kjerner, valgfritt hvor
- 25 undersettene av nukleosom-tomme kjerner omfatter fra 1 til ca. 2000 kjerner.
6. Fremgangsmåten ifølge krav 1 eller krav 3, hvor den første flerheten av kammere er en flerbrønnsplate, valgfritt hvor flerbrønnsplaten er en 96-brønnsplate eller en 384-brønnsplate, eller hvor den andre flerheten av kammere er en flerbrønnsplate, valgfritt hvor flerbrønnsplaten er en 96-brønnsplate eller en
- 30 384-brønnsplate.

7. Fremgangsmåten ifølge krav 1 eller krav 3, hvor undersettene av de sammenslåtte indekserte kjernene omfatter omtrent like antall kjerner, valgfritt hvor undersettene av de sammenslåtte indekserte kjernene omfatter fra 1 til ca. 25 kjerner, eller hvor undersettene av de sammenslåtte indekserte kjernene omfatter
5 minst 10 ganger færre kjerner enn undersettene av de nukleosom-tomme kjernene, valgfritt hvor undersettene av de sammenslåtte indekserte kjernene omfatter minst 100 ganger færre kjerner enn undersettene av de nukleosom-tomme kjernene.

8. Fremgangsmåten ifølge krav 1 eller krav 3, hvor hvert av transposomkompleksene omfatter transposaser og transposoner, idet hvert av
10 transposonene omfatter en overført tråd, valgfritt hvor den overførte tråden ikke omfatter en cytosinrest, ytterligere valgfritt hvor den overførte tråden omfatter den første indekssekvensen, ytterligere valgfritt hvor den overførte tråden videre omfatter en første universell sekvens og en første sekvenseringsprimersekvens.

9. Fremgangsmåten ifølge krav 3, hvor behandlingen identifiserer metylerte
15 CpG-dinukleotidsekvenser.

10. Fremgangsmåten ifølge krav 3, videre omfattende å tilsette én eller flere nukleotider til 3'-endene av de behandlede nukleinsyrefragmentene for å skape et 3'-overheng før ligeringen av den universelle adapteren, valgfritt hvor tilsetningen av én eller flere nukleotider utføres ved hjelp av en terminal transferase, ytterligere
20 valgfritt hvor den universelle adapteren omfatter et overheng som er omvendt komplementært til 3'-overhenget i de behandlede nukleinsyrefragmentene.

11. Fremgangsmåten ifølge krav 1 eller krav 3, hvor inkorporeringen av den andre indekssekvensen i trinn (h) omfatter å bringe fragment-adaptermolekylene med dobbelindeks i hvert kammer i kontakt med en første universell primer og en
25 andre universell primer, som hver omfatter en indekssekvens, og å utføre en eksponentiell amplifiseringsreaksjon, valgfritt hvor indekssekvensen til den første universelle primeren er det omvendte komplementet til indekssekvensen til den andre universelle primeren, eller hvor indekssekvensen til den første universelle primeren er forskjellig fra det omvendte komplementet til indekssekvensen til den
30 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 som er komplementær til en universell sekvens i 3'-enden av fragment-adaptermolekylene med dobbelindeks, valgfritt hvor den første innfangingssekvensen omfatter P5-primersekvensen, eller hvor den andre universelle primeren videre omfatter en andre innfangingssekvens og en andre ankersekvens som er komplementær til en universell sekvens i 5'-enden av fragment-adaptermolekylene med dobbelindeks, valgfritt hvor den andre innfangingssekvensen omfatter det omvendte komplementet til P7-primersekvensen.
13. Fremgangsmåten ifølge krav 1 eller krav 11, hvor den eksponentielle amplifiseringsreaksjonen omfatter en polymerasekjedereaksjon (PCR), valgfritt hvor PCR-en omfatter 15 til 30 sykluser.
14. Fremgangsmåten ifølge krav 1 eller krav 3, som videre omfatter en anrikning av målnukleinsyrer ved bruk av en flerhet av innfangingsoligonukleotider som har spesifisitet for målnukleinsyrene, valgfritt 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.
15. Fremgangsmåten ifølge krav 1 eller krav 3, som videre omfatter valg av fragment-adaptermolekylene med dobbelindeks som faller innenfor et forhåndsbestemt størrelsesområde, eller videre omfatter sekvensering av fragment-adaptermolekylene med dobbelindeks for å bestemme metyleringsstatusen til nukleinsyrer fra flerheten av enkeltceller.
16. Fremgangsmåten ifølge krav 15, videre omfattende:
- å tilveiebringe en overflate som omfatter en flerhet av amplifiseringssteder, hvor amplifiseringsstedene omfatter minst to populasjoner av festede enkelttrådede nukleinsyrer som har en fri 3'-ende, og
- å bringe overflaten omfattende amplifiseringssteder i kontakt med sekvenseringsbiblioteket under betingelser som er egnet til å produsere en flerhet av

amplifiseringssteder som hvert omfatter en klonal populasjon av amplikoner fra et individuelt fragment-adaptermolekyl med dobbelindeks, valgfritt hvor antallet fragment-adaptermolekyler med dobbelindeks overstiger antallet amplifiseringssteder, hvor fragment-adaptermolekylene med dobbelindeks har fluidisk tilgang til

5 amplifiseringsstedene, og hvor hvert av amplifiseringsstedene omfatter en kapasitet for flere fragment-adaptermolekyler med dobbelindeks i sekvenseringsbiblioteket,

eller hvor å bringe i kontakt omfatter samtidig (i) transport av fragment-adaptermolekylene med dobbelindeks til amplifiseringsstedene ved en gjennomsnittlig transporthastighet, og (ii) amplifisering av fragment-adaptermolekylene med dobbelindeks som er på amplifiseringsstedene ved en
10 gjennomsnittlig amplifiseringshastighet, hvor den gjennomsnittlige amplifiseringshastigheten overstiger den gjennomsnittlige transporthastigheten.

17. Sammensetning som omfatter undersett av nukleosom-tomme kjerner som omfatter nukleinsyrefragmenter som omfatter en første indekssekvens, og
15 behandlet for å identifisere metylerte nukleotider, hvor den første indekssekvensen er forskjellig for hvert av undersettene av nukleosom-tomme kjerner.

18. Sammensetningen ifølge krav 17, hvor nukleinsyrefragmentene omfatter metyleringsstatusavhengig kjemisk modifisering av CpG-sekvenser.

19. Sammensetningen ifølge krav 17, hvor nukleinsyrefragmentene videre
20 omfatter en universell sekvens og/eller en første sekvenseringsprimersekvens.

20. Sammensetningen ifølge hvilket som helst av kravene 17–19, hvor den første indeksen, den universelle sekvensen og/eller den første sekvenseringsprimersekvensen er cytosin-tom.

21. Sammensetningen ifølge krav 17, videre omfattende transposomkomplekser.

25 22. Sekvenseringsbiblioteket fremstilt ved fremgangsmåten ifølge krav 1 eller krav 3.
