



(12) Translation of
European patent specification

(11) NO/EP 4153775 B1

NORWAY

(19) NO
(51) Int Cl.
C12Q 1/6806 (2018.01)
C12Q 1/6841 (2018.01)

Norwegian Industrial Property Office

(45)	Translation Published	2024.09.30
(80)	Date of The European Patent Office Publication of the Granted Patent	2024.07.24
(86)	European Application Nr.	21733274.1
(86)	European Filing Date	2021.05.20
(87)	The European Application's Publication Date	2023.03.29
(30)	Priority	2020.05.22, US, 202063029121 P 2020.06.25, US, 202063044028 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	10X Genomics, Inc., 6230 Stoneridge Mall Road, Pleasanton, CA 94588-3260, USA
(72)	Inventor	UYTINGCO, Cedric, Pleasanton, California 94588-3260, USA KATIRAE, Layla, Pleasanton, California 94588-3260, USA PHAM, Kristen, Pleasanton, California 94588-3260, USA
(74)	Agent or Attorney	RWS, Europa House, Chiltern Park, Chiltern Hill, SL99FG CHALFONT ST PETER, Storbritannia

(54)	Title	SIMULTANEOUS SPATIO-TEMPORAL MEASUREMENT OF GENE EXPRESSION AND CELLULAR ACTIVITY
(56)	References Cited:	WO-A1-2016/172362 WO-A1-2018/064640 WO-A1-2019/113457 LIU YANG ET AL: "High-Spatial-Resolution Multi-Omics Atlas Sequencing of Mouse Embryos via Deterministic Barcoding in Tissue", BIORXIV, 1 October 2019 (2019-10-01), XP055774345, Retrieved from the Internet <URL:https://www.biorxiv.org/content/10.1101/788992v1.full.pdf> [retrieved on 20210210], DOI: 10.1101/788992

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 identifisere lokasjon og/eller forekomst av en analytt i en biologisk prøve, fremgangsmåten omfattende:
- 5 (a) å registrere en cellulær aktivitet og/eller en intracellulær genuttrykking av en nukleinsyre i den biologiske prøven, hvori den biologiske prøven lokaliseres i et perfusjonskammer av et mangfold av perfusjonskamre, hvori perfusjonskammeret omfatter et substrat og en pakning;
- (b) å bringe den biologiske prøven i kontakt med substratet omfattende et mangfold av
- 10 fangstprober, hvori en fangstprobe av mangfoldet av fangstprobene omfatter (i) en romlig strekkode og (ii) et fangstdomenet som binder spesifikt til en sekvens til stede i analytten;
- (c) å forlenge fangstproben ved å anvende analytten som er spesifikt bundet til fangstdomenet som en mal, for derved å generere en forlenget fangstprobe;
- (d) å amplifisere den forlengede fangstproben for å fremstille et mangfold av forlengede
- 15 fangstprober; og
- (e) å bestemme (i) hele sekvensen til den romlige strekkoden, eller et komplement derav, og (ii) hele eller en del av sekvensen til analytten, eller et komplement derav, og å anvende de bestemte sekvensene til (i) og (ii) til å identifisere lokasjonen og/eller forekomsten av analytten i den biologiske prøven;
- 20 hvori fremgangsmåten videre omfatter:
- å montere pakningen på substratet,
- hvori substratet omfatter et mangfold av substratregioner, hvori en substratregion av mangfoldet av substratregioner omfatter fangstproben omfattende (i) den romlige strekkoden og (ii) fangstdomenet som binder spesifikt til sekvensen til stede i analytten,
- 25 hvori pakningen omfatter henholdsvis (i) et mangfold av åpninger som tilsvarer mangfoldet av substratregioner, henholdsvis (ii) et mangfold av inngangskanaler som er lett koblet til mangfoldet av åpninger og henholdsvis (iii) et mangfold av utgangskanaler som er lett koblet til mangfoldet av åpninger, og
- hvori mangfoldet av åpninger i pakningen innrettes med mangfoldet av substratregioner
- 30 av substratet når pakningen er montert på substratet; og å montere et deksel på pakningen for å definere et mangfold av perfusjonskamre,
- hvori dekselet inkluderer et innløp og et utløp, innløpet er lett koblet til mangfoldet av inngangskanaler når dekselet er montert på pakningen, utløpet er lett koblet til mangfoldet av utgangskanaler når dekselet er montert på pakningen, og
- 35 hvori mangfoldet av perfusjonskamre er definert av (i) mangfoldet av substratregioner av substratet, (ii) mangfoldet av åpninger i pakningen som er montert på substratet, og (iii) dekselet som er montert på pakningen.

2. Fremgangsmåten ifølge krav 1, hvori monteringen av pakningen på substratet og monteringen av dekselet på pakningen for å definere mangfoldet av perfusjonskamre forekommer før registreringen av den cellulære aktiviteten eller registreringen av det intracellulære genuttrykket, og/eller
- 5 hvori fremgangsmåten videre omfatter å perfusere en testforbindelse gjennom perfusjonskammeret før registreringstrinnet eller i det vesentlige samtidig som omkodingstrinnet, fortrinnsvis hvori testforbindelsen er et legemiddel.
3. Fremgangsmåten ifølge krav 1 eller 2, hvori substratet er et dekkglass omfattende
- 10 plast, metall eller glass; og/eller
hvori fangstproben festes til substratet via en koblingsgruppe, eventuelt hvori koblingsgruppen er en amidgruppe; og/eller
hvori substratet omfatter en referansemærke.
- 15 4. Fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av kravene 1–3, videre omfattende å dyrke den biologiske prøven i perfusjonskammeret før registreringstrinnet.
5. Fremgangsmåten ifølge krav 4, hvori den biologiske prøven dyrkes i et kulturmedium for å opprettholde dens levedyktighet, hvori kulturmediet erstattes ved et
- 20 passende intervall manuelt eller automatisk, og/eller hvori den biologiske prøven dyrkes statisk;
eventuelt hvori kulturmediet suppleres med oksygen og/eller hvori kulturmediet omfatter en blokkerende reagens eller hvori den biologiske prøven behandles med blokkeringsreagensen.
- 25 6. Fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av kravene 1–5, hvori den cellulære aktiviteten omfatter proteinaktivitet, fosforyleringsaktivitet, G-proteinkoplet reseptorrelatert aktivitet, ionekanalaktivitet, ligandreseptorbindingsaktivitet, nevralt aktivitet, proteinsyntese, proteinuttrykking og lokalisering, forbigående optisk aktivitet,
- 30 celle-til-celle interaksjoner, cellulær morfologi eller kombinasjoner derav; og/eller
hvori registreringen omfatter optisk registrering, eventuelt hvori den optiske registreringen omfatter å bringe den biologiske prøven i kontakt med et kjemisk fargestoff, hvori det kjemiske fargestoffet er et spenningsfølsomt fargestoff, et pH-følsomt fargestoff, et temperaturfølsomt fargestoff, et lysfølsomt fargestoff, et oksygenfølsomt fargestoff,
- 35 eller et metallfølsomt fargestoff, fortrinnsvis hvori det metallfølsomme fargestoffet er et kalsiumfølsomt fargestoff, eller
hvori den optiske registreringen omfatter merking av den biologiske prøven med en indikator, hvori indikatoren er en genetisk kodet indikator, hvori den genetisk kodede

indikatoren er en genetisk kodet nevralt aktivitetsindikator, en genetisk kodet spenningsindikator (GEVI) eller en genetisk kodet kalsiumindikator (GECI eller GCaMP), og eventuelt

hvor det kjemiske fargestoffet eller indikatoren videre omfatter en fluorofor; og/eller

5 hvor den optiske registreringen oppnås ved in situ-hybridisering eller fluorescensresonansenergioverføring (FRET); og/eller

hvor den optiske registreringen omfatter hybridisering av et mangfold av optisk merkede prober til (a) et protein, et lipid, en nukleinsyre eller en kombinasjon derav assosiert med den cellulære aktiviteten; eller (b) nukleinsyren assosiert med den intracellulære

10 genuttrykkningen, eventuelt hvor en optisk merket probe av mangfoldet er en peptidnukleinsyre (PNA)-probe merket med en fluorofor, fortrinnsvis hvor PNA-proben er minst 10 nukleinsyrer, minst 15 nukleinsyrer, minst 20 nukleinsyrer, minst 25 nukleinsyrer, minst 30 nukleinsyrer eller lenger; og/eller

15 hvor den optiske registreringen utføres ved anvendelse av fluorescerende tidsforløpsmikroskopi.

7. Fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av kravene 1–6, hvor den biologiske prøven er en vevsprøve, hvor vevsprøven er en levende vevsdel, en organoid prøve eller en sfæroid kulturprøve; eventuelt

20 hvor organoidprøven omfatter normale organoider og/eller kreftorganoider, og/eller hvor organoidprøven omfatter intestinale organoider, leverorganoider, pulmonale organoider og/eller nevrale organoider; og/eller

hvor den organoide prøven stammer fra et sykdomspåvirket vev, et normalt vev, en sykdomspåvirket celle, en normal celle, en differensiert celle og/eller stamceller,

25 eventuelt hvor det sykdomspåvirkede vevet er et kreftvev,

eventuelt hvor den sykdomspåvirkede cellen er en kreftcelle,

eventuelt hvor den differensierte cellen er en somatisk celle,

eventuelt hvor stamcellen velges fra en embryonal stamcelle, en induert pluripotent stamcelle eller en somatisk stamcelle.

30

8. Fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av kravene 1–6, hvor den biologiske prøven er en cellekulturprøve, eventuelt hvor cellekulturprøven er en primær cellekulturprøve omfattende individuelle celler som isoleres fra et friskt vev.

35 9. Fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av kravene 1–8, hvor fangstdomenet til fangstproben blokkeres av en blokkerende probe, fortrinnsvis før kontakttrinnet.

10. Fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av kravene 1–9, hvori den biologiske prøven omfatter et mangfold av levende celler, og de levende cellene farges med immunfluorescens før registreringstrinnet; og/eller
hvori den biologiske prøven farges ved anvendelse av et detekterbart merke, hvori det
5 detekterbare merket er Can-Grunwald, Giemsa, hematoksylin og eosin (H&E), Jenner's, Leishman, Massons trikrom, Papanicolaou, Romanowsky, sølv, Sudan, Wright's og/eller Periodic Acid Schiff (PAS); og/eller
hvori den biologiske prøven avbildes, eventuelt hvori den biologiske prøven avbildes ved anvendelse av lysfeltavbildning; og/eller
- 10 hvori den biologiske prøven permeabiliseres med et permeabiliseringsmiddel valgt fra et organisk løsningsmiddel, et tverrbindingsmiddel, en detergent og et enzym, eller en kombinasjon derav, fortrinnsvis etter registreringstrinnet; og/eller
hvori den biologiske prøven fikseres med etanol, metanol, aceton, formaldehyd, paraformaldehyd-Triton, glutaraldehyd, eller kombinasjoner derav, eventuelt hvori
15 formaldehydet er 2 % formaldehyd; fortrinnsvis etter å ha vært brakt i kontakt med den biologiske prøven med substratet, eller etter dyrking av den biologiske prøven på substratet.
11. Fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av kravene 1–10, hvori
20 forlengelsestrinnet omfatter å forlenge fangstproben ved 3'-enden; og/eller
hvori forlengelsestrinnet benytter en revers transkriptase; og/eller hvori forlengelsestrinnet benytter fluorescensmerkede nukleotider.
12. Fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av kravene 1–11, hvori den biologiske
25 prøven fjernes etter amplifiseringstrinnet; eventuelt hvori den biologiske prøven fjernes enzymatisk etter amplifiseringstrinnet.
13. Fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av kravene 1–12, hvori
amplifiseringstrinnet omfatter amplifisering av (i) hele eller en del av sekvensen til
30 analytten bundet til fangstdomenet, eller et komplement derav, og (ii) hele sekvensen til den romlige strekkoden, eller et komplement derav; eventuelt
hvori amplifiseringstrinnet omfatter rullende sirkelamplifisering og/eller
hvori amplifiseringstrinnet benytter en DNA-polymerase, et mangfold av primere og et mangfold av nukleotider.
- 35
14. Fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av kravene 1–13, hvori
bestemmelsestrinnet omfatter sekvensering; eventuelt

hvori bestemmelsestrinnet omfatter sekvensering av (i) hele sekvensen til den romlige strekkoden eller komplementet derav, og (ii) hele eller en del av sekvensen til analytten, og/eller

5 hvori sekvenseringstrinnet omfatter in situ-sekvensering, Sanger-sekvenseringsfremgangsmåter, neste generasjons-sekvenseringsfremgangsmåter og nanoporesekvensering.

15. Fremgangsmåte for å bestemme lokasjon og/eller forekomst av en analytt i et levende vev eller celleprøve, fremgangsmåten omfattende:

10 (a) å tilveiebringe et mangfold av perfusjonskamre, hvori et perfusjonskammer av mangfoldet av perfusjonskamre omfatter et substrat, en pakning montert på substratet, og et deksel montert på pakningen, hvori det levende vevet eller celleprøven er lokalisert i perfusjonskammeret av mangfoldet av perfusjonskamre, hvori

15 (1) substratet omfatter et mangfold av substratregioner, hvori en substratregion av mangfoldet av substratregioner omfatter et mangfold av fangstprober, hvori en fangstprobe av mangfoldet av fangstprober omfatter (i) en romlig strekkode og (ii) et fangstdomene som binder spesifikt til en sekvens til stede i analytten;

(2) pakningen omfatter henholdsvis (i) et mangfold av åpninger som tilsvare mangfoldet av substratregioner, henholdsvis (ii) et mangfold av inngangskanaler som er lett koblet til 20 mangfoldet av åpninger, og henholdsvis (iii) et mangfold av utgangskanaler som er lett koblet til mangfoldet av åpninger, og hvori mangfoldet av åpninger i pakningen innrettes med mangfoldet av substratregioner av substratet når pakningen er montert på substratet;

(3) dekselet omfatter et innløp og et utløp, innløpet er lett koblet til mangfoldet av 25 inngangskanaler når dekselet er montert på pakningen, utløpet er lett koblet til mangfoldet av utgangskanaler når dekselet er montert på pakningen; og

(4) mangfoldet av perfusjonskamre er definert av (i) mangfoldet av substratregioner av substratet, (ii) mangfoldet av åpninger i pakningen som er montert på substratet, og (iii) dekselet som er montert på pakningen;

30 (b) å perfusere én eller flere testforbindelser gjennom perfusjonskammeret;

(c) å registrere en cellulær aktivitet og/eller et intracellulært genuttrykk av en nukleinsyre av det levende vevet eller celleprøven,

(d) å permeabilisere det levende vevet eller celleprøven slik at analytten er spesifikt bundet til fangstdomenet til fangstproben til mangfoldet av fangstprober;

35 (e) å forlenge fangstproben ved 3'-enden ved å anvende analytten som er spesifikt bundet til fangstdomenet som en mal, og derved generere en forlenget fangstprobe;

(f) å amplifisere den forlengede fangstproben for å fremstille et mangfold av forlengede fangstprober; og

(g) å sekvensere (i) hele sekvensen til den romlige strekkoden, eller et komplement derav, og (ii) hele eller en del av sekvensen til analytten, eller et komplement derav, og å anvende de bestemte sekvensene til (i) og (ii) til å bestemme lokasjonen og lokasjonen og/eller forekomsten av analytten i det levende vevet eller celleprøven.