



(12) Translation of
European patent specification

(11) NO/EP 2828218 B1

NORWAY

(19) NO
(51) Int Cl.
C12Q 1/6876 (2018.01)
C12Q 1/6806 (2018.01)
C12Q 1/6869 (2018.01)

Norwegian Industrial Property Office

(45)	Translation Published	2020.12.28
(80)	Date of The European Patent Office Publication of the Granted Patent	2020.08.05
(86)	European Application Nr.	13764186.6
(86)	European Filing Date	2013.03.15
(87)	The European Application's Publication Date	2015.01.28
(30)	Priority	2012.03.20, US, 201261613413 P 2012.04.17, US, 201261625319 P 2012.04.17, US, 201261625623 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	University of Washington through its Center for Commercialization, 4311 11th Avenue NE Suite 500, Seattle, WA 98105-4608, USA
(72)	Inventor	SCHMITT, Michael, c/o University of Washington through its center for commercialization 4311 11th Avenue NE, Suite 500, Seattle, WA 98105-4608, USA SALK, Jesse, c/o University of Washington through its center for commercialization 4311 11th Avenue NE, Suite 500, Seattle, WA 98105-4608, USA LOEB, Lawrence, A., c/o University of Washington through its center for commercialization 4311 11th Avenue NE, Suite 500, Seattle, Washington 98105-4608, USA
(74)	Agent or Attorney	Valet Patent Services, LLP, Siedlungsstrasse 4 A, 85253 ERDWEG, Tyskland

(54)	Title	METHODS OF LOWERING THE ERROR RATE OF MASSIVELY PARALLEL DNA SEQUENCING USING DUPLEX CONSENSUS SEQUENCING
------	-------	--

(56)	References Cited:	US-A1- 2008 167 195 US-A1- 2009 298 075 WO-A2-2006/113422 US-A1- 2011 301 042
------	-------------------	--

K. SHIROGUCHI ET AL: "Digital RNA sequencing minimizes sequence-dependent bias and amplification noise with optimized single-molecule barcodes", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, vol. 109, no. 4, 9 January 2012 (2012-01-09), pages 1347-1352, XP055037481, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/pnas.1118018109

WIEMANN S ET AL: "SIMULTANEOUS ON-LINE DNA SEQUENCING ON BOTH STRANDS WITH TWO FLUORESCENT DYES", ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 224, no. 1, 1 January 1995 (1995-01-01), pages 117-121, XP000486746, ISSN: 0003-2697, DOI: 10.1006/ABIO.1995.1015

TEEMU KIVIOJA ET AL: "Counting absolute numbers of molecules using unique molecular identifiers", NATURE METHODS, NATURE PUBLISHING GROUP, GB, vol. 9, no. 1, 1 January 2012 (2012-01-01) , pages 72-74, XP002722751, ISSN: 1548-7105, DOI: 10.1038/NMETH.1778 [retrieved on 2011-11-20]

CHRISSY H ROBERTS ET AL: "Short template amplicon and multiplex megaprimer-enabled relay (STAMMER) sequencing, a simultaneous approach to higher throughput sequence-based typing of polymorphic genes", IMMUNOGENETICS, SPRINGER, BERLIN, DE, vol. 62, no. 4, 4 March 2010 (2010-03-04), pages 253-260, XP019799828, ISSN: 1432-1211

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. Framgangsmåte for generering av en feilkorrigert sekvens av et dobbelttrådet mål-nukleinsyremolekyl som omfatter individuell merking av hver av de to trådene i det dobbelttrådede mål-nukleinsyremolekylet ved ligasjon av begge trådene i det dobbelttrådede mål-nukleinsyremolekylet til minst ett enkelt molekylidentifikator-(SMI)-adaptor-molekyl som omfatter en SMI-sekvens for å danne et SMI-mål-nukleinsyrekompleks, hvori SMI-sekvensen omfatter minst én utarmet eller halv-utarmet nukleinsyresekvens, slik at SMI-mål-nukleinsyrekomplekset omfatter en unik identifikator;
uavhengig amplifisering av hver streng i SMI-mål-nukleinsyrekomplekset, som resulterer i at hver streng danner et distinkt enda relatert sett med amplifiserte SMI-mål-nukleinsyreprodukter; sekvensering av de forsterkede SMI-mål-nukleinsyreproduktene som omfatter den unike identifikatoren;
sammenlikning av sekvensene av de amplifiserte SMI-mål-nukleinsyreproduktene framskaffet fra én streng av den dobbelttrådede mål-nukleinsyren med sekvensene av de amplifiserte SMI-mål-nukleinsyreproduktene framskaffet fra den andre strengen ved den dobbelttrådede mål-nukleinsyren, slik at en mutasjon som kun opptrer ved en spesifikk posisjon i én eller flere sekvenser fra én av trådene identifiseres som en feil som introduseres under amplifisering eller sekvensering.
2. Framgangsmåte ifølge krav 1, hvori det dobbelttrådede mål-nukleinsyremolekylet er et dobbelttrådet DNA-molekyl eller RNA-molekyl.
3. Framgangsmåte ifølge ett av kravene 1 til 2, omfatter videre generering av en feilkorrigert dobbelttrådet konsensus-sekvens ved (i) gruppering av de sekvensierte SMI-mål-nukleinsyreproduktene inn i familier med parede mål-nukleinsyretråder basert på et felles sett med SMI-sekvenser; og (ii) fjerne parede mål-nukleinsyrestrengsekvenser som oppviser én eller flere nukleotidposisjoner hvor de parede mål-nukleinsyretrådene er i uoverenstemmelse, eller alternativt fjerne nukleotidposisjoner fra nukleinsyrestrengsekvenser hvor de parede trådene er i uoverenstemmelse ved den spesifikke posisjonen.
4. Framgangsmåte ifølge ett av kravene 1 til 3, hvori det dobbelttrådede mål-nukleinsyremolekylet er et klippet dobbelttrådet DNA eller RNA fragment.
5. Framgangsmåte ifølge ett av kravene 1 til 4, hvori det dobbelttrådede SMI-mål-nukleinsyrekomplekset i tillegg omfatter minst to PCR-primer-bindings seter, minst to sekvenserings-primer-bindings seter, en dobbelttrådet fiksert referansesekvens eller en kombinasjon av samme.

6. Framgangsmåte ifølge ett av kravene 1 til 5, hvori det dobbelttrådede SMI-målnukleinsyre-komplekset omfatter en enkelttrådet SMI-sekvens, og fortrinnsvis hvori den utarmede eller halv-utarmede nukleinsyresekvensen omfatter en første nukleotid-n-mer-sekvens.
7. Framgangsmåte ifølge ett av kravene 1 til 6, hvori det dobbelttrådede SMI-mål-
5 nukleinsyrekomplekset omfatter en SMI-sekvens i hver av dets tråder, og fortrinnsvis hvori SMI-sekvensen omfatter (i) en første utarmet eller halv-utarmet sekvens og (ii) en andre utarmet eller halv-utarmet sekvens som er komplementær med den første slike sekvensen.
8. Framgangsmåte ifølge ett av kravene 1 til 7, hvori SMI-sekvensen er generert fra et bibliotek med individuelle oligonukleotider med kjent sekvens.
- 10 9. Framgangsmåte ifølge ett av kravene 1 til 8, hvori den utarmede eller halv-utarmede nukleinsyresekvensen omfatter en første nukleotid-n-mer-sekvens med nukleotidlengde mellom omtrent 3 og 20.
10. Framgangsmåte ifølge ett av kravene 1 til 9, hvori SMI-adaptor-molekylet omfatter en Y-form, en U-form eller en kombinasjon av samme.
- 15 11. Framgangsmåte ifølge ett av kravene 1-10, hvori det dobbelttrådede SMI-målnukleinsyre-komplekset omfatter et SMI-adaptor-molekyl ved hver ende.
12. Framgangsmåte ifølge ett av kravene 1 til 11, hvori hver streng i SMI-målnukleinsyre-komplekset er forsterket ved PCR.
13. Framgangsmåte ifølge ett av kravene 1 til 12, hvori SMI-målnukleinsyre-komplekset inkluderer
20 minst to forskjellige PCR-primer- eller strømcellebindings seter; og hvori valgfritt SMI-målnukleinsyrekomplekset i tillegg inkluderer minst to forskjellige sekvenserings-primerbindings seter.
14. Framgangsmåte ifølge krav 13, hvori det dobbelttrådede SMI-mål-nukleinsyre-komplekset omfatter et SMI-adaptor-molekyl ved hver ende, og hvori minst ett av SMI-adaptor-molekylene omfatter en Y-form.