



(12) Translation of
European patent specification

(11) NO/EP 2893040 B1

NORWAY

(19) NO
(51) Int Cl.
C12Q 1/68 (2018.01)

Norwegian Industrial Property Office

(21) Translation Published 2019.05.06

(80) Date of The European Patent Office Publication of the Granted Patent 2019.01.02

(86) European Application Nr. 13834427.0

(86) European Filing Date 2013.09.04

(87) The European Application's Publication Date 2015.07.15

(30) Priority 2012.09.04, US, 201261696734 P
2012.09.21, US, 201261704400 P
2013.03.15, US, 201361793997 P
2013.07.13, US, 201361845987 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 Guardant Health, Inc., 505 Penobscot Drive, Redwood City, CA 94063, USA

(72) Inventor TALASAZ, AmirAli, 2181 Camino A Los Cerros, Menlo Park, CA 94025, USA
ELTOUKHY, Helmy, 2 Barry Lane, Atherton, CA 94027, USA

(74) Agent or Attorney OSLO PATENTKONTOR AS, Postboks 7007 M, 0306 OSLO, Norge

(54) Title **METHODS TO DETECT RARE MUTATIONS AND COPY NUMBER VARIATION**

(56) References Cited: WO-A1-2012/106559, US-B1- 8 209 130, WO-A1-2008/154317, US-A1- 2012 214 678, TSAI ET AL.: 'Discovery of rare mutations in populations: TILLING by sequencing' PLANT PHYSIOLOGY vol. 156, no. 3, 29 April 2011, pages 1257 - 1268, XP055051938, US-A1- 2012 046 877, M. W. SCHMITT ET AL: "Detection of ultra-rare mutations by next-generation sequencing", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, vol. 109, no. 36, 1 August 2012 (2012-08-01), pages 14508-14513, XP055161683, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/pnas.1208715109, US-A1- 2012 100 548, SCHMITT ET AL.: 'Detection of ultra-rare mutations by next- generation sequencing' PNAS vol. 109, no. 36, 01 August 2012, pages 14508 - 14513, XP055161683

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/>

Krav

1. Fremgangsmåte omfattende:
 - a. å tilveiebringe minst ett sett av merkede opphavspolynukleotider ved å konvertere innledende startegenetisk materiale til de merkede opphavspolynukleotidene, hvor det initiale startegenetiske materialet omfatter mellom 100 og 100000 haploide humane genomekvivalenter av cellefrie DNA-polynukleotider, og merkingen er med mellom 2 og 1000000 unike identifikatorer;
- 10 og for hvert sett av merkede opphavspolynukleotider;
 - b. amplifisering av de merkede opphavspolynukleotidene i settet for å fremstille et tilsvarende sett av amplifiserte avkom-polynukleotider;
 - c. sekvensering av et subsett av settet av amplifiserte avkom-polynukleotider, for å produsere et sett av sekvenseringsavlesninger; og
 - d. å kollapse settet av sekvenseringsavlesninger for å generere et sett av konsensussekvenser, idet hver konsensussekvens tilsvarer et unikt polynukleotid blant settet av merkede opphavspolynukleotider, hvor fremstillingen av konsensussekvenser er basert på informasjon fra markøren og minst en av (i) sekvensinformasjon i begynnelsesområdet av sekvenseringsavlesningen (ii) sekvensinformasjon ved endeområdet av sekvenseringsavlesningen, og (iii) lengden av sekvenseringsavlesningen.
- 25 2. Fremgangsmåte ifølge krav 1, hvor hvert polynukleotid i et sett kan kartlegges i en referansesekvens.
- 30 3. Fremgangsmåte ifølge krav 1 omfattende å tilveiebringe et antall av sett av merkede opphavspolynukleotider, hvor hvert sett kan kartlegges til en annen kartleggbare posisjon i referansesekvensen.
- 35 4. Fremgangsmåte ifølge krav 1, som videre omfatter: (e) analyse av settet av konsensussekvenser for hvert sett av merkede opphavspolynukleotider separat eller i kombinasjon.

5. Fremgangsmåte ifølge et av de foregående krav, hvor det initiale startegenetiske materialet ikke inneholder mer enn 100 ng polynukleotider.
6. Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av de foregående krav
5 omfattende omdannelse av det initiale startegenetiske materialet til merkede opphavspolynukleotider med en konverteringseffektivitet på minst 10 %, minst 20 %, minst 30 %, minst 40 %, minst 50 %, minst 60 %, minst 80 % eller minst 90 %.
- 10 7. Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av de foregående krav, hvor omdannelsen omfatter en hvilken som helst av butt-ende-ligering, klebrig-ende-ligering, molekylære inversjonsprober, PCR, ligeringsbasert PCR, enkelstrengsligering og enkeltstreng-sirkularisering.
- 15 8. Fremgangsmåte ifølge krav 2, hvor et antall av sett kartlegger til forskjellige kartleggbare posisjoner i en referansesekvens fra det samme genom.
9. Fremgangsmåte ifølge krav 4 omfattende å tilveiebringe et antall av sett av merkede opphavspolynukleotider, hvor hvert sett er kartleggbart til en annen
20 kartleggbare posisjon i en referansesekvens, og hvor den kartleggbare posisjon i referansesekvensen er lokus av en tumormarkør og analyse omfatter å detektere svulstmarkøren i settet av konsensussekvenser.
10. Fremgangsmåte ifølge krav 4 omfattende å tilveiebringe et antall av sett av
25 merkede opphavspolynukleotider, hvor hvert sett er kartleggbart til en annen kartleggbare posisjon i en referansesekvens, og hvor den kartleggbare posisjonen i referansesekvensen omfatter et antall av kartleggbare posisjoner i referansesekvensen, idet hver kartleggbare posisjon er lokus av en tumormarkør.
- 30 11. Fremgangsmåte ifølge krav 4 omfattende å tilveiebringe et antall av sett av merkede opphavspolynukleotider, hvor hvert sett er kartleggbart til en annen kartleggbare posisjon i en referansesekvens, og hvor analysen omfatter (i) å
35 detektere kopi-antall-variasjon av konsensussekvensene mellom i det minste to sett av opphavspolynukleotider; (ii) å detektere tilstedeværelsen av sekvensvariasjoner sammenlignet med referansesekvensene; eller (iii) å detektere tilstedeværelsen av sekvensvarianter sammenlignet med referansesekvensene og detektere kopi-antall-variasjon av konsensussekvenser mellom minst to sett av opphavspolynukleotider.

12. Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av de foregående krav, hvor subsettet av settet av amplifiserte avkom-polynukleotider som er sekvensert, har en tilstrekkelig størrelse slik at hvilken som helst nukleotidsekvens representert i settet av merkede opphavspolynukleotider med en prosentandel som er den samme som prosentandelen av per-base-sekvenseringsfeil-frekvens av den anvendte sekvenseringsplattformen har minst 50 %, minst 60 %, minst 70 %, minst 80 %, minst 90 %, minst 95 %, minst 98 %, minst en 99 %, minst en 99,9 % eller minst en 99,99 % sjanse for å bli representert blant settet av konsensus-sekvenser.
13. Fremgangsmåte ifølge et av de foregående krav omfattende å anrike settet av amplifiserte avkom-polynukleotider med polynukleotider som kartlegger til en eller flere utvalgte kartleggbare posisjoner i en referansesekvens ved: (i) selektiv amplifikasjon av sekvenser fra innledende startegenetisk materiale omdannet til merkede opphavspolynukleotider; (ii) selektiv amplifisering av merkede opphavspolynukleotider; (iii) selektiv sekvensfangst av amplifiserte avkom-polynukleotider; eller (iv) selektiv sekvensfangst av innledende startegenetisk materiale.
14. Fremgangsmåte ifølge krav 4, hvor analysen omfatter å detektere mutasjoner, sjeldne mutasjoner, indeler, kopi-antall-variasjoner, transversjoner, translokasjoner, inversjon, deletjoner, aneuploidi, partiell aneuploidi, polyploidi, kromosomal ustabilitet, kromosomal-struktur forandringer, genfusjoner, kromosomal fusjoner, gen-trunkeringer, genforsterkning, genduplikasjoner, kromosomallesjoner, DNA-lesjoner, unormale endringer i nukleinsyre-kjemiske modifikasjoner, unormale endringer i epigenetiske mønstre, unormale endringer i nukleinsyremetyleringsmønstre eller kreft.
15. Fremgangsmåte ifølge krav 4, hvor analysen videre omfatter deteksjon og overvåkning av en abnormitet eller sykdom i et individ, slik som infeksjon og/eller kreft; eventuelt hvor fremgangsmåten utføres i kombinasjon med immunrepertoarprofilering.
16. Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av de foregående krav, hvor polynukleotidene ekstraheres fra en prøve valgt fra gruppen bestående av blod, plasma, serum, urin, spytt, slimhinneutskillelser, sputum, avføring og tårer.

17. Fremgangsmåte ifølge et av de foregående krav, omfattende å filtrere ut avlesninger, med en nøyaktighet eller kvalitetsgrad på mindre enn en terskelverdi.

18. Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av de foregående krav, hvor
5 antallet unike identifikatorer er:

- i. minst 3 og maksimalt 1 000 000;
- ii. minst 5 og maksimalt 1 000 000;
- 10 iii. minst 10 og maksimalt 1 000 000;
- iv. minst 15 og maksimalt 1 000 000;
- v. minst 25 og maksimalt 1 000 000;
- vi. minst 2 og maksimalt 100;
- vii. minst 2 og maksimalt 1 000;
- viii. minst 2 og maksimalt 10 000; eller
- 15 ix. minst 2 og maksimalt 100 000.