

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
17. April 2003 (17.04.2003)

PCT

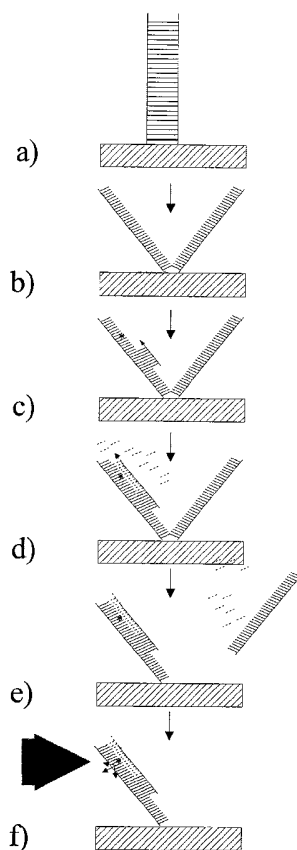
(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 03/031649 A3

- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12Q 1/68 (72) Erfinder; und
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): BERLIN, Kurt
[DE/DE]; Marienkäferweg 4, 14532 Stahnsdorf (DE).
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE02/03845 (74) Anwalt: SCHUBERT, Klemens; Neue Promenade 5,
10178 Berlin (DE).
- (22) Internationales Anmeldedatum: 4. Oktober 2002 (04.10.2002) (81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,
CU, CZ, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH,
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG,
SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,
VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (25) Einreichungssprache: Deutsch (84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität: 101 51 055.1 5. Oktober 2001 (05.10.2001) DE
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
US): EPIGENOMICS AG [DE/DE]; Kastanienallee 24,
10435 Berlin (DE).

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: METHOD FOR THE DETERMINATION OF CYTOSINE METHYLATION IN CPG ISLANDS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUM NACHWEIS VON CYTOSIN-METHYLIERUNG IN CPG-INSELN



(57) Abstract: A method for the determination of cytosine methylation in DNA samples is disclosed. The DNA is firstly extracted from the sample and bonded to a surface. In the second method step a genomic DNA sample is preferably treated with a bisulphite (= disulphite, hydrogen sulphite) in such a way that all non-methylated cytosine bases are converted to uracil, whilst the 5-methylcytosine bases remain unchanged. In the third method step one or several oligonucleotides are hybridised onto the treated DNA as primer. In the fourth method step the hybridised primer(s) are lengthened in a polymerase reaction. Marked guanine nucleotides are preferably used which are then essentially only incorporated when cytosine bases are still present in the treated DNA. Thereafter the measure of inclusion of guanine bases and thus the number of incorporated markings is proportional to the methylation in the sample under investigation. In the fifth method step the marked nucleotides not incorporated in the polymerase reaction are removed. In the sixth method step the number of markings in the fragment generated by the primary extension is approximately determined, whereby the signal intensity emitted by said markings is directly or indirectly measured.

(57) Zusammenfassung: Beschrieben wird ein Verfahren zum Nachweis von Cytosin-Methylierung in DNA-Proben. Zuerst wird aus einer Probe die DNA extrahiert und an eine Oberfläche gebunden. Im zweiten Schritt wird eine genomische DNA-Probe bevorzugt mit einem Bisulfit (=Disulfit, Hydrogensulfit) derart behandelt, dass alle nicht methylierten Cytosinbasen in Uracil umgewandelt werden, während die 5-Methylcytosin-basen unverändert bleiben. Im dritten Verfahrensschritt hybridisiert man an die behandelte DNA ein oder mehrere Oligonukleotide als Primer. Im vierten Verfahrensschritt wird der oder werden die hybridisierten Primer in einer Polymeraseraktion verlängert. Dabei werden bevorzugt markierte Guaninnukleotide eingesetzt, die im wesentlichen nur dann eingebaut werden, wenn in der behandelten DNA noch Cytosinbasen vorliegen. Demnach ist das Ausmass des Einbaus der Guaninbasen und damit auch die Anzahl der eingebauten Markierungen proportional zu der Methylierung in der zu untersuchenden DNA-Probe. Im fünften Verfahrensschritt werden die in der Polymeraseraktion nicht eingebauten markierten Nukleotide entfernt. Im sechsten Schritt des Verfahrens wird die Anzahl der Markierungen in dem durch die Primerverlängerung erzeugten Fragment näherungsweise bestimmt, indem von diesen Markierungen ausgehende Signalintensitäten direkt oder indirekt gemessen werden.



WO 03/031649 A3



eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen**Recherchenberichts:**

2. Oktober 2003

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 02/03845

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 01 62064 A (BERLIN KURT ;EPIGENOMICS AG (DE); OLEK ALEXANDER (DE)) 30 August 2001 (2001-08-30) abstract page 8, line 30 -page 10, line 12 page 15, line 23 -page 16, line 28	25
Y	page 18, line 6 - line 9; claims 1-3,6-9,12-20,26,28,29 --- -/--	1-24

 Further documents are listed in the continuation of box C. Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- * & * document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

18 July 2003

Date of mailing of the international search report

25/07/2003

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Knehr, M

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 02/03845

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>GONZALGO M L AND JONES P A: "Rapid quantification of methylation differences at specific sites using methylation-sensitive single nucleotide primer extension (Ms-SNuPE)" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, vol. 25, no. 12, 1997, pages 2529-2531, XP002106409 ISSN: 0305-1048 cited in the application * siehe speziell Seite 2526, rechte Spalte, Absatz 1 und 2, sowie Abb.1 * the whole document</p>	<p>1,7,8, 10-12, 14,15, 17-20, 23,24</p>
X	<p>DE 199 51 189 A (EPIGENOMICS AG) 3 May 2001 (2001-05-03) abstract</p>	<p>25</p>
Y	<p>column 4, line 45 - line 62 column 5, line 22 - line 30 column 7, line 1 - line 14 column 7, line 51 - line 58; claims 1,3-10,13-18,21,25</p>	<p>1,4-12, 14-22</p>
X	<p>WO 97 46705 A (UNIV JOHNS HOPKINS MED) 11 December 1997 (1997-12-11) cited in the application</p>	<p>25</p>
Y	<p>abstract; claims 1-4,9-11,13,16-19,22-24,29-36</p>	<p>1-4,9, 13,17, 19,20,23</p>
X	<p>WO 99 28498 A (OLEK ALEXANDER ;WALTER JOERN (DE); EPIGENOMICS GMBH (DE); OLEK SVE) 10 June 1999 (1999-06-10) cited in the application</p>	<p>25</p>
Y	<p>abstract; claim 1</p>	<p>1,24</p>
Y	<p>OLEK A ET AL: "A modified an improved method for bisulphite based cytosine methylation analysis" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, vol. 24, no. 24, 1996, pages 5064-5066, XP002106408 ISSN: 0305-1048 cited in the application abstract page 5064, column 1, last paragraph -column 2, paragraph 1</p>	<p>1,5</p>
A	<p>WO 01 42493 A (PIEPENBROCK CHRISTIAN ;EPIGENOMICS AG (DE); OLEK ALEXANDER (DE)) 14 June 2001 (2001-06-14) the whole document</p>	
	<p>---</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 02/03845

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	XIONG Z AND LAIRD P W: "COBRA: a sensitive and quantitative DNA methylation assay" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, vol. 25, no. 12, 1997, pages 2532-2534, XP002106407 ISSN: 0305-1048 cited in the application the whole document -----	
P,X	DE 100 50 942 A (EPIGENOMICS AG) 18 April 2002 (2002-04-18) the whole document -----	1-25

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE 02/03845

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0162064	A	30-08-2001	DE 10010280 A1	06-09-2001
			AU 4228001 A	03-09-2001
			CA 2399281 A1	30-08-2001
			WO 0162064 A2	30-08-2001
			EP 1261741 A2	04-12-2002
			US 2003129620 A1	10-07-2003
DE 19951189	A	03-05-2001	DE 19951189 A1	03-05-2001
			AU 2345101 A	23-04-2001
			CA 2387148 A1	19-04-2001
			WO 0127317 A2	19-04-2001
			EP 1228246 A2	07-08-2002
			JP 2003511056 T	25-03-2003
WO 9746705	A	11-12-1997	US 5786146 A	28-07-1998
			US 6017704 A	25-01-2000
			EP 0954608 A1	10-11-1999
			JP 2000511776 T	12-09-2000
			WO 9746705 A1	11-12-1997
			US 6200756 B1	13-03-2001
			US 6265171 B1	24-07-2001
WO 9928498	A	10-06-1999	DE 19754482 A1	01-07-1999
			AT 217348 T	15-05-2002
			AU 753368 B2	17-10-2002
			AU 2408599 A	16-06-1999
			CA 2310384 A1	10-06-1999
			CN 1283235 T	07-02-2001
			WO 9928498 A2	10-06-1999
			DE 59804090 D1	13-06-2002
			DK 1034309 T3	26-08-2002
			EP 1034309 A2	13-09-2000
			ES 2173669 T3	16-10-2002
			HU 0100424 A2	28-06-2001
			JP 2001525181 T	11-12-2001
			NZ 504586 A	25-10-2002
			PL 341681 A1	23-04-2001
			PT 1034309 T	31-10-2002
			SI 1034309 T1	31-08-2002
US 6214556 B1	10-04-2001			
WO 0142493	A	14-06-2001	DE 19959691 A1	16-08-2001
			AU 2663201 A	18-06-2001
			CA 2395047 A1	14-06-2001
			WO 0142493 A2	14-06-2001
			DE 10083729 D2	15-05-2003
			EP 1238112 A2	11-09-2002
DE 10050942	A	18-04-2002	DE 10050942 A1	18-04-2002
			AU 1812902 A	22-04-2002
			CA 2425366 A1	18-04-2002
			WO 0231186 A2	18-04-2002
			EP 1325154 A2	09-07-2003

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12Q1/68

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, CHEM ABS Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 01 62064 A (BERLIN KURT ;EPIGENOMICS AG (DE); OLEK ALEXANDER (DE)) 30. August 2001 (2001-08-30) Zusammenfassung Seite 8, Zeile 30 -Seite 10, Zeile 12	25
Y	Seite 15, Zeile 23 -Seite 16, Zeile 28 Seite 18, Zeile 6 - Zeile 9; Ansprüche 1-3,6-9,12-20,26,28,29 --- -/--	1-24

 Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

& Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

18. Juli 2003

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

25/07/2003

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Knehr, M

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	GONZALGO M L AND JONES P A: "Rapid quantification of methylation differences at specific sites using methylation-sensitive single nucleotide primer extension (Ms-SNuPE)" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, Bd. 25, Nr. 12, 1997, Seiten 2529-2531, XP002106409 ISSN: 0305-1048 in der Anmeldung erwähnt * siehe speziell Seite 2526, rechte Spalte, Absatz 1 und 2, sowie Abb.1 * das ganze Dokument ---	1,7,8, 10-12, 14,15, 17-20, 23,24
X	DE 199 51 189 A (EPIGENOMICS AG) 3. Mai 2001 (2001-05-03) Zusammenfassung Spalte 4, Zeile 45 - Zeile 62 Spalte 5, Zeile 22 - Zeile 30 Spalte 7, Zeile 1 - Zeile 14 ---	25
Y	Spalte 7, Zeile 51 - Zeile 58; Ansprüche 1,3-10,13-18,21,25 ---	1,4-12, 14-22
X	WO 97 46705 A (UNIV JOHNS HOPKINS MED) 11. Dezember 1997 (1997-12-11) in der Anmeldung erwähnt ---	25
Y	Zusammenfassung; Ansprüche 1-4,9-11,13,16-19,22-24,29-36 ---	1-4,9, 13,17, 19,20,23
X	WO 99 28498 A (OLEK ALEXANDER ;WALTER JOERN (DE); EPIGENOMICS GMBH (DE); OLEK SVE) 10. Juni 1999 (1999-06-10) in der Anmeldung erwähnt ---	25
Y	Zusammenfassung; Anspruch 1 ---	1,24
Y	OLEK A ET AL: "A modified an improved method for bisulphite based cytosine methylation analysis" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, Bd. 24, Nr. 24, 1996, Seiten 5064-5066, XP002106408 ISSN: 0305-1048 in der Anmeldung erwähnt Zusammenfassung Seite 5064, Spalte 1, letzter Absatz -Spalte 2, Absatz 1 ---	1,5
A	WO 01 42493 A (PIEPENBROCK CHRISTIAN ;EPIGENOMICS AG (DE); OLEK ALEXANDER (DE)) 14. Juni 2001 (2001-06-14) das ganze Dokument ---	
	-/--	

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>XIONG Z AND LAIRD P W: "COBRA: a sensitive and quantitative DNA methylation assay" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, Bd. 25, Nr. 12, 1997, Seiten 2532-2534, XP002106407 ISSN: 0305-1048 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument</p> <p style="text-align: center;">---</p>	
P,X	<p>DE 100 50 942 A (EPIGENOMICS AG) 18. April 2002 (2002-04-18) das ganze Dokument</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-25

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichung, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 02/03845

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO 0162064	A	30-08-2001	DE	10010280 A1	06-09-2001
			AU	4228001 A	03-09-2001
			CA	2399281 A1	30-08-2001
			WO	0162064 A2	30-08-2001
			EP	1261741 A2	04-12-2002
			US	2003129620 A1	10-07-2003

DE 19951189	A	03-05-2001	DE	19951189 A1	03-05-2001
			AU	2345101 A	23-04-2001
			CA	2387148 A1	19-04-2001
			WO	0127317 A2	19-04-2001
			EP	1228246 A2	07-08-2002
			JP	2003511056 T	25-03-2003

WO 9746705	A	11-12-1997	US	5786146 A	28-07-1998
			US	6017704 A	25-01-2000
			EP	0954608 A1	10-11-1999
			JP	2000511776 T	12-09-2000
			WO	9746705 A1	11-12-1997
			US	6200756 B1	13-03-2001
			US	6265171 B1	24-07-2001

WO 9928498	A	10-06-1999	DE	19754482 A1	01-07-1999
			AT	217348 T	15-05-2002
			AU	753368 B2	17-10-2002
			AU	2408599 A	16-06-1999
			CA	2310384 A1	10-06-1999
			CN	1283235 T	07-02-2001
			WO	9928498 A2	10-06-1999
			DE	59804090 D1	13-06-2002
			DK	1034309 T3	26-08-2002
			EP	1034309 A2	13-09-2000
			ES	2173669 T3	16-10-2002
			HU	0100424 A2	28-06-2001
			JP	2001525181 T	11-12-2001
			NZ	504586 A	25-10-2002
			PL	341681 A1	23-04-2001
			PT	1034309 T	31-10-2002
			SI	1034309 T1	31-08-2002
US	6214556 B1	10-04-2001			

WO 0142493	A	14-06-2001	DE	19959691 A1	16-08-2001
			AU	2663201 A	18-06-2001
			CA	2395047 A1	14-06-2001
			WO	0142493 A2	14-06-2001
			DE	10083729 D2	15-05-2003
			EP	1238112 A2	11-09-2002

DE 10050942	A	18-04-2002	DE	10050942 A1	18-04-2002
			AU	1812902 A	22-04-2002
			CA	2425366 A1	18-04-2002
			WO	0231186 A2	18-04-2002
			EP	1325154 A2	09-07-2003
