

(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
8. Mai 2003 (08.05.2003)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 03/038121 A3

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12Q 1/68

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE02/04054

(22) Internationales Anmeldedatum:
25. Oktober 2002 (25.10.2002)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
101 54 317.4 26. Oktober 2001 (26.10.2001) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
US): EPIGENOMICS AG [DE/DE]; Kastanienallee 24,
10435 Berlin (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): BERLIN, Kurt
[DE/DE]; Marienkäferweg 4, 14532 Stahnsdorf (DE).
BALLHAUSE, Matthias [DE/DE]; Toblacher Strasse 42,
13187 Berlin (DE). GÜTIG, David [DE/DE]; Kastanien-
allee 74, 10435 Berlin (DE).

(74) Anwalt: SCHUBERT, Klemens; Neue Promenade 5,
10178 Berlin-Mitte (DE).

(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.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
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: 11. Dezember 2003

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

(54) Title: METHOD FOR THE DETECTION OF CYTOSINE METHYLATION IN IMMOBILISED DNA SAMPLES

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUM NACHWEIS VON CYTOSIN-METHYLIERUNGEN IN IMMOBILISIERTEN DNA
PROBEN

(57) Abstract: A method for the detection of cytosine methylation in immobilised DNA samples is disclosed. In the first method step the genomic DNA is isolated from cells or other associated material and bonded essentially irreversibly to a surface. The DNA bonded to the surface is then preferably treated with a bisulphite such that cytosine is converted into a base different from the base pairing relationship in the DNA duplex, whilst 5-methylcytosine remains unaltered. The used reagents are then removed in a washing step. Finally, selected sections of the immobilised DNA are amplified in a polymerase reaction and the amplificate examined with regard to the sequence thereof.

(57) Zusammenfassung: Beschrieben wird ein Verfahren zur Analyse von Cytosin-Methylierungsmustern in genomischen DNA-Proben. Im ersten Verfahrensschritt wird die genomische DNA aus Zellen oder anderen begleitenden Materialien isoliert und im wesentlichen irreversibel an eine Oberfläche gebunden. Danach wird die an die Oberfläche gebundene DNA bevorzugt mit einem Bisulfit derart behandelt, dass Cytosin in eine vom Basenpaarungsverhalten in der DNA-Duplex her unterschiedliche Base umgewandelt wird, während 5-Methylcytosin unverändert bleibt. Anschließend werden die verwendeten Reagenzien in einem Waschschritt entfernt. Zuletzt werden ausgewählte Abschnitte der immobilisierten DNA in einer Polymerasereaktion amplifiziert und die Amplifikate werden hinsichtlich ihrer Sequenz untersucht.



WO 03/038121 A3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/DE 02/04054

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, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	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, paragraph 3 -column 2, paragraph 1 page 5064, column 2, paragraph 4 -page 5065, column 1, paragraph 5; figures 1,2 page 5066, column 2, paragraph 2 --- -/--	1-22
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		
<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
° Special categories of cited documents :		
<ul style="list-style-type: none"> *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. *Z* document member of the same patent family 		
Date of the actual completion of the international search 14 October 2003		Date of mailing of the international search report 21/10/2003
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 Tilkorn, A-C

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 02/04054

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 6 291 166 B1 (MARMARO JEFFREY M ET AL) 18 September 2001 (2001-09-18) abstract column 3, line 52 -column 4, line 56 column 5, line 62 -column 6, line 22; examples 4,5,11 ---	1-22
A	MYOHANEN S ET AL: "AUTOMATED FLUORESCENT GENOMIC SEQUENCING AS APPLIED TO THE METHYLATION ANALYSIS OF THE HUMAN ORNITHINE DECARBOXYLASE GENE" DNA SEQUENCE, NEW YORK, NY, US, vol. 5, no. 1, 1994, pages 1-8, XPO01097559 ISSN: 1042-5179 abstract page 2, column 1, paragraph 3 -column 2, paragraph 3; figure 1 page 5, column 1, paragraph 1 -column 2, paragraph 1 page 6, column 2, paragraph 3 -page 7, column 1, paragraph 5 ---	1-22
A	REIN ET AL: "Identifying 5-methylcytosine and related modifications in DNA genomes" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, vol. 26, no. 10, 1998, pages 2255-2264, XPO02143106 ISSN: 0305-1048 cited in the application page 2258, column 2, paragraph 2 -page 2261, column 2, paragraph 1; figures 1,2; table 1 ---	1-22
A	WO 00 44934 A (OLEK ALEXANDER ;EPIGENOMICS GMBH (DE)) 3 August 2000 (2000-08-03) the whole document ---	1-22
A	SHEPHERD M ET AL: "MONITORING OF FLUORESCENCE DURING DNA MELTING AS A METHOD FOR DISCRIMINATION AND DETECTION OF PCR PRODUCTS IN VARIETY IDENTIFICATION" MOLECULAR BREEDING: NEW STRATEGIES IN PLANT IMPROVEMENT, KLUWER ACADEMIC PUBLISHERS, NL, vol. 4, no. 6, 1998, pages 509-517, XPO01016033 ISSN: 1380-3743 the whole document -----	16,17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/DE 02/04054

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 6291166	B1	18-09-2001	US 2002132242 A1	19-09-2002
			AU 745126 B2	14-03-2002
			AU 7127198 A	11-11-1998
			EP 1003908 A1	31-05-2000
			JP 2002512688 T	23-04-2002
			WO 9846797 A1	22-10-1998

WO 0044934	A	03-08-2000	DE 19905082 C1	18-05-2000
			AU 764683 B2	28-08-2003
			AU 3144700 A	18-08-2000
			CA 2359182 A1	03-08-2000
			WO 0044934 A2	03-08-2000
			DE 10080169 D2	24-01-2002
			EP 1147228 A2	24-10-2001
			JP 2002535011 T	22-10-2002

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, BIOSIS

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
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, Absatz 3 -Spalte 2, Absatz 1 Seite 5064, Spalte 2, Absatz 4 -Seite 5065, Spalte 1, Absatz 5; Abbildungen 1,2 Seite 5066, Spalte 2, Absatz 2 --- -/--	1-22



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

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

14. Oktober 2003

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

21/10/2003

 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

Tilkorn, A-C

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	<p>US 6 291 166 B1 (MARMARO JEFFREY M ET AL) 18. September 2001 (2001-09-18) Zusammenfassung Spalte 3, Zeile 52 -Spalte 4, Zeile 56 Spalte 5, Zeile 62 -Spalte 6, Zeile 22; Beispiele 4,5,11</p>	1-22
A	<p>MYOHANEN S ET AL: "AUTOMATED FLUORESCENT GENOMIC SEQUENCING AS APPLIED TO THE METHYLATION ANALYSIS OF THE HUMAN ORNITHINE DECARBOXYLASE GENE" DNA SEQUENCE, NEW YORK, NY, US, Bd. 5, Nr. 1, 1994, Seiten 1-8, XP001097559 ISSN: 1042-5179 Zusammenfassung Seite 2, Spalte 1, Absatz 3 -Spalte 2, Absatz 3; Abbildung 1 Seite 5, Spalte 1, Absatz 1 -Spalte 2, Absatz 1 Seite 6, Spalte 2, Absatz 3 -Seite 7, Spalte 1, Absatz 5</p>	1-22
A	<p>REIN ET AL: "Identifying 5-methylcytosine and related modifications in DNA genomes" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, Bd. 26, Nr. 10, 1998, Seiten 2255-2264, XP002143106 ISSN: 0305-1048 in der Anmeldung erwähnt Seite 2258, Spalte 2, Absatz 2 -Seite 2261, Spalte 2, Absatz 1; Abbildungen 1,2; Tabelle 1</p>	1-22
A	<p>WO 00 44934 A (OLEK ALEXANDER ;EPIGENOMICS GMBH (DE)) 3. August 2000 (2000-08-03) das ganze Dokument</p>	1-22
A	<p>SHEPHERD M ET AL: "MONITORING OF FLUORESCENCE DURING DNA MELTING AS A METHOD FOR DISCRIMINATION AND DETECTION OF PCR PRODUCTS IN VARIETY IDENTIFICATION" MOLECULAR BREEDING: NEW STRATEGIES IN PLANT IMPROVEMENT, KLUWER ACADEMIC PUBLISHERS, NL, Bd. 4, Nr. 6, 1998, Seiten 509-517, XP001016033 ISSN: 1380-3743 das ganze Dokument</p>	16,17

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die derselben Patentfamilie gehören

Internationaler Aktenzeichen

PCT/DE 02/04054

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 6291166	B1	18-09-2001	US 2002132242 A1	19-09-2002
			AU 745126 B2	14-03-2002
			AU 7127198 A	11-11-1998
			EP 1003908 A1	31-05-2000
			JP 2002512688 T	23-04-2002
			WO 9846797 A1	22-10-1998
			WO 0044934	A
			AU 764683 B2	28-08-2003
			AU 3144700 A	18-08-2000
			CA 2359182 A1	03-08-2000
			WO 0044934 A2	03-08-2000
			DE 10080169 D2	24-01-2002
			EP 1147228 A2	24-10-2001
			JP 2002535011 T	22-10-2002