

(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
18. Mai 2006 (18.05.2006)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2006/050864 A1

(51) Internationale Patentklassifikation:
C12Q 1/68 (2006.01)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2005/011831

(22) Internationales Anmeldedatum:
4. November 2005 (04.11.2005)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
10 2004 054 729.7
12. November 2004 (12.11.2004) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): **BAYER TECHNOLOGY SERVICES GMBH** [DE/DE]; 51368 Leverkusen (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **BURMEISTER, Jens** [DE/DE]; An der Ruthen 5, 51061 Köln (DE). **WEICHEL, Walter** [DE/DE]; Dhünner Aue 15, 51519 Odenthal (DE). **KOCH, Reinhard** [DE/DE]; Weidenbusch 18, 14532 Kleinmachnow (DE).

(74) Gemeinsamer Vertreter: **BAYER TECHNOLOGY SERVICES GMBH**; Law and Patents, Patents and Licensing, 51368 Leverkusen (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht

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.

(54) Title: METHOD FOR IDENTIFYING METHYLATED CYTOSINE

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUM NACHWEIS METHYLIERTER CYTOSINE

(57) Abstract: The invention relates to a method for identifying 5-methyl-cytosine in DNA sequences, in addition to test kits containing the reagents that are required to carry out the described assays.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft eine Methode zum Nachweis von 5-Methyl-Cytosin in DNA-Sequenzen sowie Testkits, die diejenigen Reagenzien enthalten, die zur Durchführung der beschriebenen Assays benötigt werden.



WO 2006/050864 A1

Verfahren zum Nachweis methylierter Cytosine

Die Erfindung betrifft eine Methode zum Nachweis von 5-Methyl-Cytosin in DNA-Sequenzen sowie Testkits, die diejenigen Reagenzien enthalten, die zur Durchführung der beschriebenen Assays benötigt werden.

- 5 Der Nachweis von 5-Methyl-Cytosin hat ein großes Anwendungsgebiet z.B. in der Human- oder Veterinärmedizin, im Nahrungsmittelbereich, in der Umweltanalytik, im Pflanzenschutz, in der biochemischen bzw. pharmakologischen Forschung sowie in der forensischen Medizin.

- Nach dem Stand der Technik erfolgt der Nachweis von 5-Methyl-Cytosin z.B. durch Bestimmung der Länge spezifischer Restriktionsfragmente in einem Fragmentgemisch (E.M. Southern, J. Mol. Biol. 1975, 98, 503-517). Die dabei genutzten Restriktionsendonukleasen können die Basen Cytosin und 5-Methyl-Cytosin innerhalb ihrer Erkennungssequenz unterscheiden. Diese Methode ist aufwendig (Analyse durch Elektrophorese o.ä.) und nicht geeignet, lange Sequenzabschnitte mit häufigen Methylierungen zu analysieren. Zudem können mit Hilfe dieses Verfahrens nur solche methylierten Cytosine analysiert werden, die sich innerhalb der Erkennungsregion einer Restriktionsendonuklease befinden. Die selektive Basenkonversion durch Behandlung mit Natriumbisulfit (R. Shapiro et al., J. Am. Chem. Soc. 1970, 92:2, 422-424) ist heute die gängigste Methode zur Analyse methylierter DNA. Grundlage dieses Verfahrens ist die effiziente und spezifische Umwandlung von Cytosin in Uracil, die durch Natriumbisulfit katalysiert wird. Da unter den gewählten Reaktionsbedingungen 5-Methyl-Cytosin nicht deaminiert wird, kann im Falle bekannter Ausgangssequenzen durch nachfolgende Analyseverfahren zwischen methylierten und nicht methylierten Cytosinen unterschieden werden. Als Analyseverfahren werden dem Fachmann bekannte Verfahren wie die Sequenzierung, Hybridisierung immobilisierter oder in Lösung befindlicher Sonden, oder die Methylierungs-spezifische PCR (M. Frommer et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 1992, 89, 1827-1831) verwendet. Generelles Problem aller auf der Behandlung mit Natriumbisulfit beruhender Verfahren ist die signifikante Degradation der DNA (C. Grunau et al., Nucl. Acids Res., 2001, 29:13, e65). Diese Degradation des Analyten senkt die Nachweisempfindlichkeit bei der Detektion von Methylierungsmustern und kann die Resultate erheblich verfälschen. Durch das kommerziell erhältliche „EZ DNA Methylation Kit™“ der Firma Zymogen, Orange, USA wird die Degradation der DNA vermindert, beträgt aber immer noch >50%. Weitere Nachteile dieser Methode sind häufige Strangbrüche in der zu analysierenden DNA sowie die Schwierigkeit, ein auf Chromatographieschritten basierendes Verfahren zu automatisieren.

Die Enzymfamilie der Cytidin-Deaminasen ist seit langem bekannt. Erst in 2002/2003 wurden jedoch Cytidin-Deaminasen beschrieben, die nicht nur die Deaminierung der Nucleobase, des Nucleosids

oder des Nucleotids katalysieren, sondern auch die Deaminierung sequenzinterner Cytosine in DNA-Einzelsträngen katalysieren (R. Bransteitter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2003, 100:7, 4102-4107; P. Pham et al., Nature, 2003, 424, 103-107). Für z.B. Aktivierungs-induzierte Cytidin Deaminase (AID) wurde auch die Unterscheidung zwischen Cytosin und 5-Methyl-Cytosin beschrieben (R. Bransteitter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2003, 100:7, 4102-4107). In WO 98/45472 wird eine Methode zum Screening von Inhibitoren der Cytidin-Deaminase beschrieben. Die Anmeldung beschreibt die Verwendung kurzer, synthetischer RNA-Sequenzen, die mit Cytidin-Deaminase in Gegenwart der potenziellen Inhibitoren inkubiert werden. Durch Primer-vermittelte Single Base Extension wurde geprüft, ob eine Konversion C->U erfolgt war, oder ob die Deaminase-Aktivität inhibiert wurde.

Alle diese Verfahren zum Nachweis methylierter Cytosine gemäß Stand der Technik haben den Nachteil, dass die Target-DNA zumindest teilweise der Degradation unterliegt. Zudem sind die zur Deaminierung eingesetzten Chemikalien häufig kanzerogen.

Der vorliegenden Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zur schonenden, spezifischen Konversion nichtmethylierter Cytosine in Uracil bereitzustellen. Idealerweise kann es in Kombination mit dem Fachmann bekannten Nachweisverfahren wie z.B. PCR, Sequenzierung, Hybridisierung in Lösung oder auf Arrays zur Analyse von Methylierungsmustern verwendet werden.

Die erfindungsgemäße Lösung der beschriebenen Aufgabe besteht in der Substitution der Bisulfit-Behandlung durch eine spezifische, enzymatisch katalysierte Deaminierung der nicht methylierten Cytosine. Für die enzymatische Behandlung wird erfindungsgemäß eine Deaminase, bevorzugt eine Cytidin-Deaminase, besonders bevorzugt eine Cytidin-Deaminase ausgewählt aus der Gruppe der APOBEC-Enzyme, ganz besonders bevorzugt AID oder APOBEC1, verwendet. Erfindungsgemäß kann zur Katalyse der Deaminierung auch eine Deaminase verwendet werden, die durch biotechnologische Verfahren, wie sie dem Fachmann bekannt sind, durch Veränderung einer natürlich vorkommenden Deaminase, hergestellt wurde. Die Isolierung der natürlich vorkommenden Deaminase erfolgt durch dem Fachmann bekannte Verfahren und ist zum Beispiel beschrieben in R. Bransteitter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2003 100: 7, 4102-4107, in S. K. Dickerson et al., J. Exp. Med., 2003, 197, 10, 1291-1296 und in S. K. Petersen-Mahrt, M. S. Neuberger, J.Biol. Chem. 2003, 278, 22, 19583-19586.

Dementsprechend sind Verfahren zum Nachweis von methylierten Cytosinen, enthaltend die Schritte

- A) Bereitstellen eines Enzyms, das selektiv die Deaminierung nichtmethylierter Cytidine zu Uracil katalysiert.
- B) Inkubation einer Target-Nukleinsäure mit dem Enzym unter Konvertierung nichtmethylierter Cytosine in Uracil
- 5 C) Analyse der veränderten Target-Nukleinsäure

Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

Erfindungsgemäß kann auch ein Gemisch verschiedener Deaminasen für den Deaminierungsschritt A) verwendet werden. Hierdurch können Unterschiede in der Substratspezifität verschiedener Deaminasen ausgeglichen werden.

- 10 Die Target-DNA wird erfindungsgemäß mit dem Enzym / den Enzymen unter solchen Bedingungen inkubiert, unter denen die zu deaminierende DNA einzelsträngig vorliegt. Dieses kann z.B. durch thermische Denaturierung der DNA (z.B. bei 90-95°C) und anschließendes schnelles Herunterkühlen unter weitgehendem Erhalt der einzelsträngigen Form (z.B. bei 4°C) erfolgen (siehe zum Beispiel: M.L.M. Anderson, Nucleic Acid Hybridization, Springer-Verlag, New York, 1998, S. 9 ff.).
- 15 Alternativ kann die enzymatische Deaminierung auch unter Bedingungen durchgeführt werden, unter denen zwar die DNA, nicht aber das Enzym denaturiert vorliegt. Durch niedrige Ionenkonzentration, insbesondere durch niedrige Kationenkonzentration und durch Verdünnung der DNA-Target-Lösung kann ebenfalls die Reassoziaton denaturierter DNA verlangsamt werden. Wird in die DNA-Target-Lösung Formamid gegeben, so wird ebenfalls der Schmelzpunkt der DNA gesenkt und somit die
- 20 Reassoziaton verlangsamt. Auch durch Einsatz von Proteinen, die an Einzelstrang-DNA binden, kann die DNA in ihrer einzelsträngigen Form erhalten werden. Ein Beispiel für ein solches DNA-bindendes Protein ist das "single stranded DNA Binding Protein", das zum Beispiel von der Firma Promega, Madison, WI, USA, vertrieben wird. Die oben genannten Methoden können einzeln oder in geeigneten Kombinationen miteinander eingesetzt werden, um das DNA-Substrat für die Deaminase-
- 25 Reaktion zugänglich zu machen.

- Durch die Behandlung der Target-DNA mit Cytidin-Deaminase werden alle nicht methylierten Cytosine in Uracil umgewandelt. Dieser Schritt erfolgt erfindungsgemäß durch Inkubation der Deaminase oder des Gemisches der Deaminasen mit dem DNA-Target unter jeweils optimierten Temperatur- und Pufferbedingungen, die die Einzelsträngigkeit des Targets bei gleichzeitig
- 30 optimalem Umsatz des Enzyms / Enzymgemisches gewährleisten.

Anschließend wird die DNA-Sequenz analysiert, wobei die Umwandlung einer Cytosinposition in Uracil anzeigt, dass an dieser Sequenzposition keine Methylierung vorlag, während unverändert gebliebene Cytosinpositionen eine Methylierung trugen. Auf diese Weise kann das Methylierungsmuster der DNA analysiert werden.

- 5 Die Analyse der DNA-Sequenz erfolgt zum Beispiel durch dem Fachmann bekannte Hybridisierungsbasierte oder enzymatische Nachweisverfahren. Die Analyse der durch die Deaminase-Behandlung veränderten Sequenz durch enzymatische Verfahren wird bevorzugt durch eine PCR-Reaktion erfolgen, die zum Beispiel als methylierungs-spezifische PCR (für eine Übersicht siehe zum Beispiel: C. Dahl, Biogerontology 2003, 4, 4, 233-250) oder methylierungs-spezifische real-time PCR
10 (Beispiel: Y.M. Lo et al., Cancer Research 1999, 59, 3899-3903) ausgeführt wird.

Ebenfalls bevorzugt ist die Durchführung einer Primer-Verlängerung oder einer Sequenzierreaktion, besonders bevorzugt nach dem Sanger-Verfahren (für eine Übersicht siehe zum Beispiel: L.T. Franca et al., Q. Rev. Biophys. 2002, 35, 2, 169-200). Die Sequenzierung bietet insbesondere dann Vorteile, wenn das Methylierungsmuster der zu analysierenden Sequenz unbekannt ist.

- 15 Wenn die Analyse einer bekannten Sequenz mit bekanntem Methylierungsmuster nach erfolgter Deaminase-Behandlung durch methylierungs-spezifische real-time PCR erfolgt, so wird die veränderte Nukleinsäure mit zwei Sätzen von Primern und zugehörigen real-time Probes amplifiziert, wobei der eine Satz beispielsweise nur dann bindet, wenn alle Cytosine unmethyliert sind und der zweite Satz beispielsweise nur dann bindet, wenn die Sequenz an bekannten Positionen methyliert ist.
20 Die zwei verschiedenen real-time Probes können dabei durch zwei verschiedene Fluorophore (z.B. Fluorescein und Rhodamin) unterschieden werden. Während der real-time PCR wird die Zunahme der Fluoreszenz in Folge der Target-Amplifikation bestimmt. Die Anzahl der PCR-Zyklen, die zur Überschreitung eines festgelegten Schwellwertes der Fluoreszenz benötigt wird, definiert man als sogenannten Ct-Wert (Cycle threshold). Der Ct-Wert kann über eine Eichkurve in Beziehung zur
25 eingesetzten Target-Konzentration gesetzt werden und stellt somit ein Maß für die Target-Konzentration dar. Das Verhältnis der Ct-Werte der mit den beiden Sätzen an Primern und Sonden durchgeführten real-time PCR-Reaktionen zueinander ergibt nach entsprechender Normierung auf die Eichkurve den Methylierungsgrad der untersuchten Probe.

- Die Analyse von Methylierungsmustern nach der Natriumbisulfit-Methode mit Hilfe der real-time
30 PCR ist beispielsweise beschrieben in Y.M. Lo et al., Cancer Research 1999, 59, 3899-3903.

Die Analyse der durch die Deaminase-Behandlung veränderten Sequenz durch Hybridisierungsbasierte Nachweisverfahren erfolgt bevorzugt durch Hybridisierung von DNA-Sonden, PNA-Sonden,

DNA oder PNA Chips oder Sonden auf der Basis anderer DNA-Analoga (siehe zum Beispiel M.L.M. Anderson, Nucleic Acid Hybridization, Springer-Verlag, New York, 199).

Besonders bevorzugt ist die Analyse der durch die Deaminase-Behandlung veränderten Sequenz an DNA- oder PNA-Chips. Solche Verfahren sind dem Fachmann bekannt, die Analyse von
5 Methylierungsmustern auf DNA-Chips nach der Natriumbisulfit-Methode ist beispielsweise beschrieben in H. Shi et al., Journal of Cellular Biochemistry 2003, 88, 138-143.

Erfindungsgemäß können auch Testkits zur Durchführung des Nachweises methylierter Cytosine eingesetzt werden. Die Testkits enthalten dann diejenigen Reagenzien, die zur Durchführung des beschriebenen Assays benötigt werden. Ein solches Kit enthält beispielsweise eine Deaminase oder
10 ein Gemisch verschiedener Deaminasen in Form einer konzentrierten Lösung, die verdünnt in die Deaminierungsreaktion eingesetzt wird. Außerdem enthält das Kit beispielsweise eine gepufferte wässrige Lösung, ebenfalls in konzentrierter Form (z.B. 10x). Als Puffersubstanzen können z.B. Phosphatsalze, Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan, Citratsalze, 4-(2hydroxyethyl)-1-piperazinethan-sulfonsäure (HEPES) oder 2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure (MES) sowie andere dem Fachmann
15 bekannte Puffersubstanzen eingesetzt werden. Die konzentrierte Pufferlösung kann auch andere, die Deaminase-Reaktion begünstigende Stoffe wie zum Beispiel Ethylendiamintetraacetat (EDTA) oder Dithiothreitol (DTT) enthalten. Das Kit kann auch konzentrierte Lösungen von Hilfsstoffen (zum Beispiel von DNA-denaturierenden Agenzien wie Formamid oder zum Beispiel single stranded DNA Binding Protein) enthalten, die in verdünnter Form in die Deaminase-Reaktion eingesetzt werden.
20 Das Kit kann beispielsweise eingesetzt werden, indem zunächst die zu untersuchende DNA-Target Lösung 1-30 min bei 90-96°C thermisch denaturiert und anschließend möglichst schnell auf 4°C abgekühlt wird. Anschließend gibt man zum Beispiel zu der gekühlten DNA-Target-Lösung die im Kit enthaltene Puffersubstanz, ggf. die Hilfsstoffe sowie die Deaminase oder das Gemisch der Deaminasen. Anschließend erfolgt die Inkubation der Lösung bei einer Temperatur zwischen 4°C
25 und 96°C für eine Zeit von wenigen Minuten bis zu mehreren Stunden, das heißt solange, bis alle nichtmethylierten Cytosine desaminiert sind. Nach erfolgter Deaminase-Reaktion richtet sich die weitere Behandlung der DNA-Target-Lösung nach der jeweils gewählten Analysemethode. Wird nach der Deaminase-Behandlung eine PCR durchgeführt, ist die vorherige Desaktivierung der Deaminase empfehlenswert. Im Falle einer nicht thermostabilen Deaminase kann die Desaktivierung
30 z.B. durch kurzes Erhitzen der Lösung z.B. auf 90-96°C erfolgen. Andere, dem Fachmann bekannte Methoden zur Desaktivierung von Enzymen können ebenfalls eingesetzt werden, sofern sie mit der anschließenden Analysemethode kompatibel sind. Ob vor der Analyse eine Aufreinigung des nach der Deaminase-Reaktion erhaltenen Gemisches aus Salzen, Hilfsstoffen, DNA und Enzymen notwendig ist, richtet sich ebenfalls nach den Anforderungen der zur Sequenzanalyse ausgewählten
35 Methode. Zur Aufreinigung und Entsalzung des Gemisches können dem Fachmann bekannte

Methoden wie z.B. die Zentrifugation durch Microspin-Säulen (beispielsweise Microcon-Säulen der Firma Millipore, Billerica, MA, USA) oder Gelfiltrationssäulen (beispielsweise NAP-Säulen der Firma Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden) eingesetzt werden. Die Sequenzanalyse kann durch dem Fachmann bekannte Verfahren wie zum Beispiel enzymatische oder hybridisierungs-

5 basierte Verfahren, zum Beispiel PCR, methylierungs-spezifische PCR, methylierungs-spezifische real-time PCR, Hybridisierung von Sonden in Lösung oder an Oberflächen (zum Beispiel DNA-Chips, DNA-Arrays) erfolgen.

Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens gegenüber dem Stand der Technik ist die selektive, enzymatisch katalysierte Deaminierung unter milden Reaktionsbedingungen, unter denen keine

10 Degradation der Target-DNA erfolgt. Ein weiterer Vorteil des Verfahrens ist, dass keine kanzerogenen Chemikalien für die Deaminierung eingesetzt werden.

Patentansprüche

1. Verfahren zum Nachweis von methylierten Cytosinen, mit den Schritten
 - A) Bereitstellen eines Enzyms, das selektiv die Deaminierung nichtmethylierter Cytidine zu Uracil katalysiert.
 - 5 B) Inkubation einer Target-Nukleinsäure mit dem Enzym unter Konvertierung nichtmethylierter Cytosine in Uracil
 - C) Analyse der veränderten Target-Nukleinsäure
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Enzym eine Cytidin-Deaminase ist.
- 10 3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Enzym aus der Gruppe der APOBEC-Enzyme ausgewählt ist.
4. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Enzym eine Aktivierungs-induzierte Cytidin-Deaminase (AID) oder APOBEC1 ist.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass das Enzym
15 eine Deaminase ist, die durch biotechnologische Verfahren aus einer natürlich vorkommenden Deaminase erzeugt wurde.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass ein Gemisch verschiedener Enzyme für den Deaminierungsschritt Verwendung findet.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass die Target-
20 Nukleinsäure während der Inkubation mit dem Enzym einzelsträngig vorliegt.
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass die Analyse der veränderten Target-Nukleinsäure durch enzymatische oder durch Hybridisierungs-basierte Verfahren erfolgt.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass die Analyse
25 der veränderten Target-Nukleinsäure durch PCR, methylierungs-spezifische PCR, methylierungs-spezifische real-time PCR, Primer-Verlängerung oder eine Sequenzierreaktion erfolgt.

10. Testkit, das diejenigen Reagenzien enthält, die zur Durchführung der Assays nach einem der Ansprüche 1-10 benötigt werden.

Der Anspruch auf Hybridisierungsbasierte Systeme fehlt jetzt aus Kostengründen, kann aber im Prüfungsverfahren nachgeschoben werden, da im Text offenbart.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP2005/011831

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
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)
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, BIOSIS, PAJ, MEDLINE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LARIJANI MANI ET AL: "Methylation protects cytidines from AID-mediated deamination" MOLECULAR IMMUNOLOGY, vol. 42, no. 5, March 2005 (2005-03), pages 599-604, XP002361963 ISSN: 0161-5890 the whole document ----- -/--	1-10



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

10 January 2006

Date of mailing of the international search report

20/01/2006

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

Betz, J

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP2005/011831

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MORGAN HUGH D ET AL: "Activation-induced cytidine deaminase deaminates 5-methylcytosine in DNA and is expressed in pluripotent tissues - Implications for epigenetic reprogramming" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 279, no. 50, 24 September 2004 (2004-09-24), pages 52353-52360, XP002361964 ISSN: 0021-9258 the whole document	1-10
X	US 6 210 888 B1 (HAROSH ITZIK) 3 April 2001 (2001-04-03) the whole document	1-10
Y	BRANSTEITTER R ET AL: "Activation-induced cytidine deaminase deaminates deoxycytidine on single-stranded DNA but requires the action of RNase" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE, WASHINGTON, DC, US, vol. 100, no. 7, 1 April 2003 (2003-04-01), pages 4102-4107, XP002302399 ISSN: 0027-8424 the whole document	1-10
Y	PHAM P ET AL: "Processive AID-catalysed cytosine deamination on single-stranded DNA simulates somatic hypermutation" NATURE, NATURE PUBLISHING GROUP, LONDON, GB, vol. 424, no. 6944, 3 July 2003 (2003-07-03), pages 103-107, XP002302398 ISSN: 0028-0836 the whole document	1-10
P,X	DE 103 31 107 B3 (EPIGENOMICS AG) 2 December 2004 (2004-12-02) Care for claims 1 - 30; paragraph '0005! - paragraph '0021!	1-10
P,X	WO 2005/005660 A (EPIGENOMICS AG; GUETIG, DAVID) 20 January 2005 (2005-01-20) the whole document	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP2005/011831

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 6210888	B1	03-04-2001	AU 7055098 A FR 2762014 A1 WO 9845472 A1	30-10-1998 16-10-1998 15-10-1998
DE 10331107	B3	02-12-2004	WO 2005005660 A1	20-01-2005
WO 2005005660	A	20-01-2005	DE 10331107 B3	02-12-2004

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2005/011831

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

C12Q1/68

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

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

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, BIOSIS, PAJ, MEDLINE

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie ^o	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	LARIJANI MANI ET AL: "Methylation protects cytidines from AID-mediated deamination" MOLECULAR IMMUNOLOGY, Bd. 42, Nr. 5, März 2005 (2005-03), Seiten 599-604, XP002361963 ISSN: 0161-5890 das ganze Dokument ----- -/--	1-10

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

^o 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 nahelegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

10. Januar 2006

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

20/01/2006

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

Botz, J

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	MORGAN HUGH D ET AL: "Activation-induced cytidine deaminase deaminates 5-methylcytosine in DNA and is expressed in pluripotent tissues - Implications for epigenetic reprogramming" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Bd. 279, Nr. 50, 24. September 2004 (2004-09-24), Seiten 52353-52360, XP002361964 ISSN: 0021-9258 das ganze Dokument	1-10
X	US 6 210 888 B1 (HAROSH ITZIK) 3. April 2001 (2001-04-03) das ganze Dokument	1-10
Y	BRANSTEITTER R ET AL: "Activation-induced cytidine deaminase deaminates deoxycytidine on single-stranded DNA but requires the action of RNase" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE, WASHINGTON, DC, US, Bd. 100, Nr. 7, 1. April 2003 (2003-04-01), Seiten 4102-4107, XP002302399 ISSN: 0027-8424 das ganze Dokument	1-10
Y	PHAM P ET AL: "Processive AID-catalysed cytosine deamination on single-stranded DNA simulates somatic hypermutation" NATURE, NATURE PUBLISHING GROUP, LONDON, GB, Bd. 424, Nr. 6944, 3. Juli 2003 (2003-07-03), Seiten 103-107, XP002302398 ISSN: 0028-0836 das ganze Dokument	1-10
P,X	DE 103 31 107 B3 (EPIGENOMICS AG) 2. Dezember 2004 (2004-12-02) Care for claims 1 - 30; Absatz '0005! - Absatz '0021!	1-10
P,X	WO 2005/005660 A (EPIGENOMICS AG; GUETIG, DAVID) 20. Januar 2005 (2005-01-20) das ganze Dokument	1-10

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2005/011831

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
US 6210888	B1	03-04-2001	AU	7055098 A	30-10-1998
			FR	2762014 A1	16-10-1998
			WO	9845472 A1	15-10-1998
DE 10331107	B3	02-12-2004	WO	2005005660 A1	20-01-2005
WO 2005005660	A	20-01-2005	DE	10331107 B3	02-12-2004