

(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
9. Januar 2003 (09.01.2003)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 03/002760 A3

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12Q 1/68

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE02/02433

(22) Internationales Anmeldedatum:
27. Juni 2002 (27.06.2002)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
101 32 212.7 27. Juni 2001 (27.06.2001) 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): **DISTLER, Jürgen**
[DE/DE]; Hewaldstrasse 2, 10825 Berlin (DE). **LEU, Erik**
[DE/DE]; Mühsamstrasse 24, 10249 Berlin (DE).

(74) Anwalt: **SCHUBERT, Klemens**; Neue Promenade 5,
10178 Berlin (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, 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, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen
Recherchenberichts: 9. 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.

(54) Title: METHOD FOR DETECTING CYTOSINE METHYLATION BY COMPARATIVELY ANALYSING SINGLE STRANDS OF AMPLIFICATES

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUM NACHWEIS VON CYTOSIN-METHYLIERUNG DURCH VERGLEICHENDE ANALYSE DER EINZELSTRÄNGE VON AMPLIFIKATEN

(57) Abstract: The invention relates to a method for detecting cytosine methylation in DNA samples. A genomic DNA sample is chemically treated, preferably with a bisulfite (= disulfite, hydrogen sulfite), enabling the cytosine to be converted into uracil, while the 5-methylcytosine remains unchanged. Sections of the DNA samples are amplified with at least 2 primers in a polymerase reaction, preferably a polymerase chain reaction. Finally, the fragments are studied with respect to the base composition of both complementary strands of the amplicates, whereby the methylation status in the amplified section of the genomic DNA sample is deduced from the difference in the molecular weight of both strands.

(57) Zusammenfassung: Beschrieben wird ein Verfahren zum Nachweis von Cytosin-Methylierung in DNA-Proben. Eine genomische DNA Probe wird chemisch, bevorzugt mit einem Bisulfit (=Disulfit, Hydrogensulfit), derart behandelt, dass Cytosin in Uracil umgewandelt wird, während 5-Methylcytosin unverändert bleibt. Abschnitte der Proben-DNA werden mit mindestens 2 Primern in einer Polymerasereaktion, bevorzugt einer Polymerasekettenreaktion, amplifiziert. Zuletzt werden die Fragmente hinsichtlich der Basenzusammensetzung jeweils der beiden komplementären Stränge des Amplifikates untersucht, wobei aus dem Unterschied im Molekulargewicht der beiden Stränge auf den Methylierungsstatus in dem amplifizierten Abschnitt der genomischen DNA-Probe geschlossen wird.



WO 03/002760 A3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 02/02433

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 99 28498 A (OLEK ALEXANDER ;WALTER JOERN (DE); EPIGENOMICS GMBH (DE); OLEK SVE) 10 June 1999 (1999-06-10) cited in the application	25
A	the whole document ---	1-24
P,X	WO 02 04686 A (WODTKE ALEC M ;REICH NORBERT O (US); EPIGENX PHARMACEUTICAL INC (U) 17 January 2002 (2002-01-17) the whole document ---	1,7-11, 13-18, 20-25
	-/--	

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

28 May 2003

Date of mailing of the international search report

04/06/2003

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

Schwachtgen, J-L

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

.....ional Application No
PCT/DE 02/02433

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>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, XP002143106 ISSN: 0305-1048 cited in the application the whole document ---</p>	
A	<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 the whole document ---</p>	
A	<p>FROMMER M ET AL: "A GENOMIC SEQUENCING PROTOCOL THAT YIELDS A POSITIVE DISPLAY OF 5-METHYLCYTOSINE RESIDUES IN INDIVIDUAL DNA STRANDS" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE. WASHINGTON, US, vol. 89, March 1992 (1992-03), pages 1827-1831, XP002941272 ISSN: 0027-8424 the whole document -----</p>	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 02/02433

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
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
<hr/>				
WO 0204686	A	17-01-2002	AU 8131101 A	21-01-2002
			WO 0204686 A2	17-01-2002
<hr/>				

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 02/02433

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

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie ^o	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
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
A	das ganze Dokument	1-24
P, X	WO 02 04686 A (WODTKE ALEC M ;REICH NORBERT O (US); EPIGENX PHARMACEUTICAL INC (U) 17. Januar 2002 (2002-01-17) das ganze Dokument	1,7-11, 13-18, 20-25
	-/--	



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 naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

28. Mai 2003

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

04/06/2003

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

Schwachtgen, J-L

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
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 das ganze Dokument</p> <p style="text-align: center;">---</p>	
A	<p>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 das ganze Dokument</p> <p style="text-align: center;">---</p>	
A	<p>FROMMER M ET AL: "A GENOMIC SEQUENCING PROTOCOL THAT YIELDS A POSITIVE DISPLAY OF 5-METHYLCYTOSINE RESIDUES IN INDIVIDUAL DNA STRANDS" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE. WASHINGTON, US, Bd. 89, März 1992 (1992-03), Seiten 1827-1831, XP002941272 ISSN: 0027-8424 das ganze Dokument</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

les Aktenzeichen

PCT/DE 02/02433

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
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 0204686	A	17-01-2002	AU 8131101 A 21-01-2002
			WO 0204686 A2 17-01-2002