(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
30. August 2001 (30.08.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/062064 A3

(51) Internationale Patentklassifikation[7]: C12Q 1/68

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE01/00750

(22) Internationales Anmeldedatum:
23. Februar 2001 (23.02.2001)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
100 10 280.8 25. Februar 2000 (25.02.2000) 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)*: **OLEK, Alexander** [DE/DE]; Schröderstrasse 13, 10115 Berlin (DE). **BERLIN, Kurt** [DE/DE]; Marienkäferweg 4, 14532 Stahnsdorf (DE).

(74) Anwalt: **SCHUBERT, Klemens**; Joachimstrasse 9, 10119 Berlin (DE).

(81) Bestimmungsstaaten *(national)*: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DK, DM, DZ, 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, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten *(regional)*: ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, 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, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:
— *mit internationalem Recherchenbericht*

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts: 3. Oktober 2002

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 IN DNA SAMPLES

(54) **Bezeichnung:** VERFAHREN ZUR DETEKTION VON CYTOSIN-METHYLIERUNG IN DNA PROBEN

(57) **Abstract:** The invention relates to a method for detecting 5-methylcytosine in genomic DNA samples. Firstly, a genomic DNA from a DNA sample is chemically reacted with a reagent, whereby 5-methylcytosine and cytosine react differently. Afterwards, the pretreated DNA is amplified while using a polymerase and at least one primer. In the next step, the amplified genomic DNA is hybridized to at least one oligonucleotide while forming a duplex, and the same is lengthened by at least one nucleotide, whereby the nucleotide carries a detectable tagging, and the lengthening is subject to the methylation status of the respective cytosine in the genomic DNA sample. In the following step, the lengthened oligonucleotides are examined for the presence of the tagging.

(57) **Zusammenfassung:** Beschrieben wird ein Verfahren zum Nachweis von 5-Methylcytosin in genomischen DNA-Proben. Zuerst wird eine genomische DNA aus einer DNA-Probe mit einem Reagenz chemisch umgesetzt, wobei 5-Methylcytosin und Cytosin unterschiedlich reagieren, und anschliessend wird die vorbehandelte DNA unter Verwendung einer Polymerase und mindestens einem Primer amplifiziert. Im nächsten Schritt wird die amplifizierte genomische DNA an mindestens ein Oligonukleotid unter Ausbildung einer Duplex hybridisiert und selbiges um mindestens ein Nukleotid verlängert, wobei das Nukleotid eine nachweisbare Markierung trägt und die Verlängerung vom Methylierungsstatus des jeweiligen Cytosins in der genomischen DNA-Probe abhängt. Im nächsten Schritt werden die verlängerten Oligonukleotide auf das Vorhandensein der Markierung untersucht.

WO 01/062064 A3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

national Application No
PCT/DE 01/00750

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, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	GRIGG G AND CLARK S: "Sequencing 5-methylcytosine residues in genomic DNA" BIOESSAYS, CAMBRIDGE, GB, vol. 16, no. 6, June 1994 (1994-06), pages 431-436, XP002106411 ISSN: 0265-9247	1
Y	page 432, left-hand column; figure 2	2-29
X	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	1
Y	figures 2,3	2-29

-/--

[X] Further documents are listed in the continuation of box C.

[X] 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	Date of mailing of the international search report
13 June 2002	08/07/2002

Name and mailing address of the ISA	Authorized officer
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	Osborne, H

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

national Application No
PCT/DE 01/00750

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication,where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 98 56952 A (UNIV SOUTHERN CALIFORNIA) 17 December 1998 (1998-12-17)	1
Y	the whole document	2-29
Y	PAUL C L ET AL: "Cytosine methylation: quantitation by automated genomic sequencing and GENESCAN analysis" BIOTECHNIQUES, EATON PUBLISHING, NATICK, US, vol. 21, no. 1, July 1996 (1996-07), pages 126-133, XP002143107 ISSN: 0736-6205 the whole document	1-26
Y	WO 95 00669 A (PHARMACIA BIOTECH AB ;BAYLOR COLLEGE MEDICINE (US); CASKEY C THOMA) 5 January 1995 (1995-01-05) the whole document	1-29
Y	NIEMEYER C M ET AL: "DNA MICROARRAYS" ANGEWANDTE CHEMIE, VCH VERLAGSGESELLSCHAFT, WEINHEIM, DE, vol. 38, no. 19, 1999, pages 3039-3043, XP000961724 ISSN: 0044-8249 the whole document	1-29
Y	WO 99 28498 A (OLEK ALEXANDER ;WALTER JOERN (DE); EPIGENOMICS GMBH (DE); OLEK SVE) 10 June 1999 (1999-06-10) page 15, line 20 -page 22; claims 1-22	1-29
Y	WO 99 55905 A (MOLLOY PETER LAURENCE ;CLARK SUSAN JOY (AU); COMMW SCIENT IND RES) 4 November 1999 (1999-11-04) page 2, line 5 -page 3, line 18 page 4, line 18 -page 10, line 14	1-29
Y	US 5 605 798 A (KOESTER HUBERT) 25 February 1997 (1997-02-25) the whole document	14-19
A	WO 98 44151 A (FARINELLI LAURENT ;KAWASHIMA ERIC (CH); MAYER PASCAL (CH); GLAXO G) 8 October 1998 (1998-10-08) the whole document	1-29
A	WO 99 58721 A (WHITEHEAD BIOMEDICAL INST ;LANDER ERIC S (US); WANG DAVID G (US)) 18 November 1999 (1999-11-18) the whole document	25

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

national Application No
PCT/DE 01/00750

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9856952 A	17-12-1998	AU 7829398 A	30-12-1998
		US 6251594 B1	26-06-2001
		WO 9856952 A1	17-12-1998
WO 9500669 A	05-01-1995	SE 501439 C2	13-02-1995
		AT 185843 T	15-11-1999
		AU 698553 B2	29-10-1998
		AU 7212194 A	17-01-1995
		DE 69421277 D1	25-11-1999
		DE 69421277 T2	31-05-2000
		EP 0705349 A1	10-04-1996
		EP 0969103 A2	05-01-2000
		ES 2141828 T3	01-04-2000
		JP 9501312 T	10-02-1997
		SE 9302152 A	23-12-1994
		WO 9500669 A1	05-01-1995
		US 6153379 A	28-11-2000
WO 9928498 A	10-06-1999	DE 19754482 A1	01-07-1999
		AT 217348 T	15-05-2002
		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
		EP 1034309 A2	13-09-2000
		HU 0100424 A2	28-06-2001
		JP 2001525181 T	11-12-2001
		PL 341681 A1	23-04-2001
		US 6214556 B1	10-04-2001
WO 9955905 A	04-11-1999	AU 3324199 A	16-11-1999
		WO 9955905 A1	04-11-1999
		CA 2326494 A1	04-11-1999
		EP 1071815 A1	31-01-2001
		JP 2002512810 T	08-05-2002
US 5605798 A	25-02-1997	US 5547835 A	20-08-1996
		AU 722218 B2	27-07-2000
		AU 5365196 A	08-10-1996
		CA 2214359 A1	26-09-1996
		CN 1202204 A	16-12-1998
		EP 0815261 A2	07-01-1998
		JP 11508122 T	21-07-1999
		WO 9629431 A2	26-09-1996
		US 6197498 B1	06-03-2001
		US 6258538 B1	10-07-2001
		US 6277573 B1	21-08-2001
		US 6235478 B1	22-05-2001
		US 6268144 B1	31-07-2001
		US 6221601 B1	24-04-2001
		US 6300076 B1	09-10-2001
		US 6221605 B1	24-04-2001
		US 6043031 A	28-03-2000
		US 5691141 A	25-11-1997
		US 6225450 B1	01-05-2001
		US 6238871 B1	29-05-2001
		US 6194144 B1	27-02-2001

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

(ıational Application No
PCT/DE 01/00750

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5605798 A		AU 694940 B2	06-08-1998
		AU 5992994 A	15-08-1994
		AU 9137998 A	14-01-1999
		CA 2153387 A1	21-07-1994
		EP 0679196 A1	02-11-1995
		JP 8509857 T	22-10-1996
		WO 9416101 A2	21-07-1994
WO 9844151 A	08-10-1998	AU 6846698 A	22-10-1998
		EP 0972081 A1	19-01-2000
		WO 9844151 A1	08-10-1998
		JP 2002503954 T	05-02-2002
		AU 6846798 A	22-10-1998
		EP 0975802 A1	02-02-2000
		WO 9844152 A1	08-10-1998
		JP 2001517948 T	09-10-2001
		US 2002055100 A1	09-05-2002
WO 9958721 A	18-11-1999	AU 3984699 A	29-11-1999
		WO 9958721 A1	18-11-1999

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/DE 01/00750

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, BIOSIS

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	GRIGG G AND CLARK S: "Sequencing 5-methylcytosine residues in genomic DNA" BIOESSAYS, CAMBRIDGE, GB, Bd. 16, Nr. 6, Juni 1994 (1994-06), Seiten 431-436, XP002106411 ISSN: 0265-9247	1
Y	Seite 432, linke Spalte; Abbildung 2 ---	2-29
X	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	1
Y	Abbildungen 2,3 ---	2-29
	-/--	

[X] Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

[X] 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	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
13. Juni 2002	08/07/2002

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde	Bevollmächtigter Bediensteter
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	Osborne, H

Formblatt PCT/ISA/210 (Blatt 2) (Juli 1992)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/DE 01/00750

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 98 56952 A (UNIV SOUTHERN CALIFORNIA) 17. Dezember 1998 (1998-12-17)	1
Y	das ganze Dokument	2-29
Y	PAUL C L ET AL: "Cytosine methylation: quantitation by automated genomic sequencing and GENESCAN analysis" BIOTECHNIQUES, EATON PUBLISHING, NATICK, US, Bd. 21, Nr. 1, Juli 1996 (1996-07), Seiten 126-133, XP002143107 ISSN: 0736-6205 das ganze Dokument	1-26
Y	WO 95 00669 A (PHARMACIA BIOTECH AB ;BAYLOR COLLEGE MEDICINE (US); CASKEY C THOMA) 5. Januar 1995 (1995-01-05) das ganze Dokument	1-29
Y	NIEMEYER C M ET AL: "DNA MICROARRAYS" ANGEWANDTE CHEMIE, VCH VERLAGSGESELLSCHAFT, WEINHEIM, DE, Bd. 38, Nr. 19, 1999, Seiten 3039-3043, XP000961724 ISSN: 0044-8249 das ganze Dokument	1-29
Y	WO 99 28498 A (OLEK ALEXANDER ;WALTER JOERN (DE); EPIGENOMICS GMBH (DE); OLEK SVE) 10. Juni 1999 (1999-06-10) Seite 15, Zeile 20 -Seite 22; Ansprüche 1-22	1-29
Y	WO 99 55905 A (MOLLOY PETER LAURENCE ;CLARK SUSAN JOY (AU); COMMW SCIENT IND RES) 4. November 1999 (1999-11-04) Seite 2, Zeile 5 -Seite 3, Zeile 18 Seite 4, Zeile 18 -Seite 10, Zeile 14	1-29
Y	US 5 605 798 A (KOESTER HUBERT) 25. Februar 1997 (1997-02-25) das ganze Dokument	14-19
A	WO 98 44151 A (FARINELLI LAURENT ;KAWASHIMA ERIC (CH); MAYER PASCAL (CH); GLAXO G) 8. Oktober 1998 (1998-10-08) das ganze Dokument	1-29
A	WO 99 58721 A (WHITEHEAD BIOMEDICAL INST ;LANDER ERIC S (US); WANG DAVID G (US)) 18. November 1999 (1999-11-18) das ganze Dokument	25

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffen...ingen, die zur selben Patentfamilie gehören

nationales Aktenzeichen
PCT/DE 01/00750

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO 9856952	A	17-12-1998	AU	7829398 A	30-12-1998
			US	6251594 B1	26-06-2001
			WO	9856952 A1	17-12-1998
WO 9500669	A	05-01-1995	SE	501439 C2	13-02-1995
			AT	185843 T	15-11-1999
			AU	698553 B2	29-10-1998
			AU	7212194 A	17-01-1995
			DE	69421277 D1	25-11-1999
			DE	69421277 T2	31-05-2000
			EP	0705349 A1	10-04-1996
			EP	0969103 A2	05-01-2000
			ES	2141828 T3	01-04-2000
			JP	9501312 T	10-02-1997
			SE	9302152 A	23-12-1994
			WO	9500669 A1	05-01-1995
			US	6153379 A	28-11-2000
WO 9928498	A	10-06-1999	DE	19754482 A1	01-07-1999
			AT	217348 T	15-05-2002
			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
			EP	1034309 A2	13-09-2000
			HU	0100424 A2	28-06-2001
			JP	2001525181 T	11-12-2001
			PL	341681 A1	23-04-2001
			US	6214556 B1	10-04-2001
WO 9955905	A	04-11-1999	AU	3324199 A	16-11-1999
			WO	9955905 A1	04-11-1999
			CA	2326494 A1	04-11-1999
			EP	1071815 A1	31-01-2001
			JP	2002512810 T	08-05-2002
US 5605798	A	25-02-1997	US	5547835 A	20-08-1996
			AU	722218 B2	27-07-2000
			AU	5365196 A	08-10-1996
			CA	2214359 A1	26-09-1996
			CN	1202204 A	16-12-1998
			EP	0815261 A2	07-01-1998
			JP	11508122 T	21-07-1999
			WO	9629431 A2	26-09-1996
			US	6197498 B1	06-03-2001
			US	6258538 B1	10-07-2001
			US	6277573 B1	21-08-2001
			US	6235478 B1	22-05-2001
			US	6268144 B1	31-07-2001
			US	6221601 B1	24-04-2001
			US	6300076 B1	09-10-2001
			US	6221605 B1	24-04-2001
			US	6043031 A	28-03-2000
			US	5691141 A	25-11-1997
			US	6225450 B1	01-05-2001
			US	6238871 B1	29-05-2001
			US	6194144 B1	27-02-2001

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffent ıgen, die zur selben Patentfamilie gehören

ıationales Aktenzeichen
PCT/DE 01/00750

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
US 5605798	A		AU	694940 B2	06-08-1998
			AU	5992994 A	15-08-1994
			AU	9137998 A	14-01-1999
			CA	2153387 A1	21-07-1994
			EP	0679196 A1	02-11-1995
			JP	8509857 T	22-10-1996
			WO	9416101 A2	21-07-1994
WO 9844151	A	08-10-1998	AU	6846698 A	22-10-1998
			EP	0972081 A1	19-01-2000
			WO	9844151 A1	08-10-1998
			JP	2002503954 T	05-02-2002
			AU	6846798 A	22-10-1998
			EP	0975802 A1	02-02-2000
			WO	9844152 A1	08-10-1998
			JP	2001517948 T	09-10-2001
			US	2002055100 A1	09-05-2002
WO 9958721	A	18-11-1999	AU	3984699 A	29-11-1999
			WO	9958721 A1	18-11-1999