

(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  
27. Dezember 2001 (27.12.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
WO 01/098528 A3

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: C12Q 1/68,  
G01N 33/50

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE01/02274

(22) Internationales Anmeldedatum:  
19. Juni 2001 (19.06.2001)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
100 29 915.6 19. Juni 2000 (19.06.2000) 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): BERLIN, Kurt  
[DE/DE]; Marienkäferweg 4, 14532 Stahnsdorf (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, CR, CU,

CZ, DE, 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
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden  
Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen  
eintreffen

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen

Recherchenberichts: 28. November 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 METHYLATIONS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUM NACHWEIS VON CYTOSIN-METHYLIERUNGEN

(57) Abstract: Disclosed is a method for detecting 5-methylcytosine in genomic DNA samples. First, genomic DNA from a DNA sample is chemically reacted with a reagent, 5-methylcytosine and cytosine reacting differently. The pre-treated DNA is then amplified with primers from a different sequence using a polymerase. In the following step, the amplified genomic DNA is hybridised to an oligonucleotide array and PCR products are obtained which must be provided with an identifying mark. Alternatively, the PCR products can be extended in a Primer Extension Reaction, the extension products also being provided with an identifying mark. The last step involves examining the extended oligonucleotides for the presence of the identifying mark.

(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. Anschließend wird die vorbehandelte DNA unter Verwendung einer Polymerase mit Primern unterschiedlicher Sequenz amplifiziert. Im nächsten Schritt wird die amplifizierte genomische DNA auf einen Oligonukleotid Array hybridisiert und PCR-Produkte erhalten, die mit einer Markierung versehen sein müssen. Alternativ können die PCR-Produkte in einer Primer Extension Reaktion verlängert werden, wobei auch die Verlängerungsprodukte mit einer Markierung versehen sind. Im letzten Schritt werden die verlängerten Oligonukleotide auf das Vorhandensein der Markierung untersucht.



WO 01/098528 A3

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int      nal Application No  
PCT/DE 01/02274

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC 7    C12Q1/68            G01N33/50				
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC				
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>				
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, PAJ, WPI Data				
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>				
Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.		
X	PAULIN RICHARD ET AL: "Urea improves efficiency of bisulphite-mediated sequencing of 5'-methylcytosine in genomic DNA." NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 26, no. 21, 1 November 1998 (1998-11-01), pages 5009-5010, XP002210104 ISSN: 0305-1048	1-3,7,8, 22-25		
Y	page 5009, column 2, paragraph 2 --- -/--	4-6,9-21		
<table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 50%; border: none;"> <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.                 </td> <td style="width: 50%; border: none;"> <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.                 </td> </tr> </table>			<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.
<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 :				
<table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 50%; border: 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                 </td> <td style="width: 50%; border: none;">                     *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.                      *&amp;* document member of the same patent family                 </td> </tr> </table>			*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
*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  <p style="text-align: center; font-size: 1.2em;">16 September 2002</p>		Date of mailing of the international search report  <p style="text-align: center; font-size: 1.2em;">07/10/2002</p>		
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  <p style="text-align: center; font-size: 1.2em;">Bradbrook, D</p>		

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Application No

PCT/DE 01/02274

## 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>WONG DAVID J ET AL: "P16-INK4a promoter is hypermethylated at a high frequency in esophageal adenocarcinomas."            CANCER RESEARCH,            vol. 57, no. 13, 1997, pages 2619-2622,            XP002210105            ISSN: 0008-5472            abstract            Materials and Methods</p>	5,6
Y	<p>WO 99 28498 A (OLEK ALEXANDER ;WALTER JOERN (DE); EPIGENOMICS GMBH (DE); OLEK SVE) 10 June 1999 (1999-06-10)            the whole document</p>	4,9-21
Y	<p>US 4 851 331 A (VARY CALVIN P H ET AL) 25 July 1989 (1989-07-25)            column 3, line 31 - line 53</p>	12-15
Y	<p>LANDEGREN U ET AL: "A LIGASE-MEDIATED GENE DETECTION TECHNIQUE"            SCIENCE, AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE, US,            vol. 241, no. 4869,            26 August 1988 (1988-08-26), pages 1077-1080, XP000676556            ISSN: 0036-8075            abstract</p>	10,11, 13-15
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            abstract; figure 1</p>	9-11, 13-15
Y	<p>HERMAN J G ET AL: "METHYLATION-SPECIFIC PCR: A NOVEL PCR ASSAY FOR METHYLATION STATUS OF CPG ISLANDS"            PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE. WASHINGTON, US,            vol. 93, 1 September 1996 (1996-09-01), pages 9821-9826, XP002910406            ISSN: 0027-8424            abstract; table 1</p>	12-15
	-/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/DE 01/02274

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>ABRAVAYA KLARA ET AL: "Detection of point mutations with a modified ligase chain reaction (Gap-LCR)."                      NUCLEIC ACIDS RESEARCH,                      vol. 23, no. 4, 1995, pages 675-682,                      XP002210106                      ISSN: 0305-1048                      abstract</p>	9-15
A	<p>CLARK SUSAN J ET AL: "High sensitivity mapping of methylated cytosines."                      NUCLEIC ACIDS RESEARCH,                      vol. 22, no. 15, 1994, pages 2990-2997,                      XP002210107                      ISSN: 0305-1048                      Materials and Methods</p>	1-25

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/DE 01/02274

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 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
			HU 0100424 A2	28-06-2001
			JP 2001525181 T	11-12-2001
			PL 341681 A1	23-04-2001
			US 6214556 B1	10-04-2001
-----				
US 4851331	A	25-07-1989	NONE	
-----				

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 01/02274

**A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES**  
 IPK 7 C12Q1/68 G01N33/50

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

**B. RECHERCHIERTE GEBIETE**

Recherchiertes 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, PAJ, WPI Data

**C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN**

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	PAULIN RICHARD ET AL: "Urea improves efficiency of bisulphite-mediated sequencing of 5'-methylcytosine in genomic DNA." NUCLEIC ACIDS RESEARCH, Bd. 26, Nr. 21, 1. November 1998 (1998-11-01), Seiten 5009-5010, XP002210104 ISSN: 0305-1048	1-3,7,8, 22-25
Y	Seite 5009, Spalte 2, Absatz 2 --- -/--	4-6,9-21

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

16. September 2002

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

07/10/2002

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

Bradbrook, D

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationale Aktenzeichen  
PCT/DE 01/02274

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	<p>WONG DAVID J ET AL: "P16-INK4a promoter is hypermethylated at a high frequency in esophageal adenocarcinomas."                      CANCER RESEARCH,                      Bd. 57, Nr. 13, 1997, Seiten 2619-2622,                      XP002210105                      ISSN: 0008-5472                      Zusammenfassung                      Materials and Methods</p> <p style="text-align: center;">---</p>	5,6
Y	<p>WO 99 28498 A (OLEK ALEXANDER ;WALTER JOERN (DE); EPIGENOMICS GMBH (DE); OLEK SVE) 10. Juni 1999 (1999-06-10)                      das ganze Dokument</p> <p style="text-align: center;">---</p>	4,9-21
Y	<p>US 4 851 331 A (VARY CALVIN P H ET AL) 25. Juli 1989 (1989-07-25)                      Spalte 3, Zeile 31 - Zeile 53</p> <p style="text-align: center;">---</p>	12-15
Y	<p>LANDEGREN U ET AL: "A LIGASE-MEDIATED GENE DETECTION TECHNIQUE"                      SCIENCE, AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE, US,                      Bd. 241, Nr. 4869,                      26. August 1988 (1988-08-26), Seiten 1077-1080, XP000676556                      ISSN: 0036-8075                      Zusammenfassung</p> <p style="text-align: center;">---</p>	10,11, 13-15
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,                      Bd. 25, Nr. 12, 1997, Seiten 2529-2531,                      XP002106409                      ISSN: 0305-1048                      Zusammenfassung; Abbildung 1</p> <p style="text-align: center;">---</p>	9-11, 13-15
Y	<p>HERMAN J G ET AL: "METHYLATION-SPECIFIC PCR: A NOVEL PCR ASSAY FOR METHYLATION STATUS OF CPG ISLANDS"                      PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE. WASHINGTON, US,                      Bd. 93, 1. September 1996 (1996-09-01),                      Seiten 9821-9826, XP002910406                      ISSN: 0027-8424                      Zusammenfassung; Tabelle 1</p> <p style="text-align: center;">---</p>	12-15

-/--

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen  
PCT/DE 01/02274

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	<p>ABRAVAYA KLARA ET AL: "Detection of point mutations with a modified ligase chain reaction (Gap-LCR)." NUCLEIC ACIDS RESEARCH, Bd. 23, Nr. 4, 1995, Seiten 675-682, XP002210106 ISSN: 0305-1048 Zusammenfassung</p> <p style="text-align: center;">----</p>	9-15
A	<p>CLARK SUSAN J ET AL: "High sensitivity mapping of methylated cytosines." NUCLEIC ACIDS RESEARCH, Bd. 22, Nr. 15, 1994, Seiten 2990-2997, XP002210107 ISSN: 0305-1048 Materials and Methods</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-25

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

 Int. Aktenzeichen  
 PCT/DE 01/02274

Im Recherchenbericht angeführtes Patendokument	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 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
			HU 0100424 A2 28-06-2001
			JP 2001525181 T 11-12-2001
			PL 341681 A1 23-04-2001
			US 6214556 B1 10-04-2001
			-----
US 4851331	A	25-07-1989	KEINE
-----			