

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-512499

(P2005-512499A)

(43) 公表日 平成17年5月12日(2005.5.12)

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	Z N A A 2 G O 4 5
C O 8 H 1/00	C O 8 H 1/00	4 B O 2 4
C 1 2 M 1/00	C 1 2 M 1/00	A 4 B O 2 9
C 1 2 Q 1/68	C 1 2 Q 1/68	A 4 B O 6 3
G O 1 N 33/53	G O 1 N 33/53	M
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 25 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2002-522536 (P2002-522536)	(71) 出願人	500247105
(86) (22) 出願日	平成13年9月1日 (2001.9.1)		エビゲノミクス アーゲー
(85) 翻訳文提出日	平成15年2月7日 (2003.2.7)		ドイツ国、1 0 1 7 8 ベルリン、クライ
(86) 国際出願番号	PCT/EP2001/010073		ネ プレジデンテンシュトラッセ 1
(87) 国際公開番号	W02002/018631	(74) 代理人	100093735
(87) 国際公開日	平成14年3月7日 (2002.3.7)		弁理士 荒井 鐘司
(31) 優先権主張番号	100 43 826.1	(74) 代理人	100105429
(32) 優先日	平成12年9月1日 (2000.9.1)		弁理士 河野 尚孝
(33) 優先権主張国	ドイツ (DE)	(74) 代理人	100108143
			弁理士 嶋崎 英一郎
		(72) 発明者	オレク、アレクサンダ
			ドイツ国、1 0 1 1 5 ベルリン、シュロ
			ーデルシュトラッセ 1 3
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 進行中の疾病または特定の疾病の発病素質の診断

(57) 【要約】

本発明はシトシンメチル化の検出のためのオリゴヌクレオチッド及び／または P N A -オリゴマー及び方法を提供するもので、これは特定の疾病について、遺伝的及び／または後天的パラメーターの組の解析による、疾病または疾病の発病素質の診断のために特に好適である。

【解決手段】

下記の段階からなることを特徴とする、シトシンのメチル化の解析により、進行状態の疾病または特定の疾病の発病素質の診断のために、遺伝的及び／または後天的パラメーターを調べる方法。

a) 一つのゲノム D N A -試料について、5 -部位の非メチル化シトシン塩基を化学処理によって、ウラシルまたは他の、塩基対挙動がシトシンに類似していない塩基に変換する、b) 化学的に前処理したゲノム D N A を、プライマーオリゴヌクレオチッド及びポリメラーゼの組合わせ物によって増幅する、c) 増幅産物をオリゴヌクレオチッド及び／または P N A -ゾンデまたは一つのアレーの使用によってハイブリッド化する、d) ハイブリッド化された増幅産物の存在を証明する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列 I D 1 ～ 配列 I D 4 0 7 1 2 の一つに相当する、化学的に前処理された D N A の、少なくとも 1 8 塩基長の配列断片を含む核酸。

【請求項 2】

化学的に前処理された D N A （配列 I D 1 ～ 配列 I D 4 0 7 1 2 の）をハイブリッド化する、少なくとも 9 ヌクレオチッド長の塩基配列をその都度、少なくとも含む、化学的に前処理された D N A 中のシトシンのメチル化状態の検査用のオリゴマー [オリゴヌクレオチッドまたはペプチッド核酸（P N A）－オリゴマー]。

【請求項 3】

塩基配列が、少なくとも一つの C p G ジヌクレオチッドを含む請求項 2 に記載のオリゴマー。

【請求項 4】

C p G ジヌクレオチッドのシトシンがオリゴマーの約 3 分の一であることを特徴とする請求項 3 に記載のオリゴマー。

【請求項 5】

配列 I D 1 ～ 配列 I D 4 0 7 1 2 の一つの、少なくとも一つの C p G ジヌクレオチッドあたり、少なくとも一つのオリゴマーを含む請求項 3 に記載のオリゴマーの組。

【請求項 6】

配列 I D 1 ～ 配列 I D 4 0 7 1 2 の一つの配列の、C p G ジヌクレオチッド毎に少なくとも一つのオリゴマーを含む請求項 5 に記載のオリゴマーの組。

【請求項 7】

配列 I D 1 ～ 配列 I D 4 0 7 1 2 の少なくとも一つに相当する D N A －配列または断片の増幅用にプライマーオリゴヌクレオチッドとして使用される、請求項 2 に記載の、少なくとも二つの核酸の組。

【請求項 8】

少なくとも一つのオリゴヌクレオチッドが一つの固相に結合していることを特徴とする請求項 7 に記載のオリゴヌクレオチッドの組。

【請求項 9】

請求項 2 ～ 4 の何れか 1 項に記載のオリゴマーの少なくとも 1 0 個を含む、配列 I D 1 ～ 配列 I D 4 0 7 1 2 に相当する、化学的に前処理されたゲノム D N A 中のシトシン－メチル化状態及び／または多形性、単一ヌクレオチッド（S N P s）の検出用のオリゴマーゾンドの組。

【請求項 1 0】

配列 I D 1 ～ 配列 I D 4 0 7 1 2 の C p G ジヌクレオチッドのメチル化状態と相関関係にある疾病解析用の異なるオリゴマー（アレー）の、担体上に固定される配置方法であって、請求項 2 ～ 4 の何れか 1 項に記載の少なくとも一つのオリゴマーが固相に結合されている方法。

【請求項 1 1】

請求項 2 ～ 4 の何れか 1 項に記載の異なるオリゴマー（アレー）の固相上に結合した配置。

【請求項 1 2】

固相の平坦な平面上に四角形または六角形状格子形で、配置されていることを特徴とする請求項 1 1 に記載の異なるオリゴヌクレオチッド－及び／または P N A －オリゴマー配列のアレー。

【請求項 1 3】

固相表面がシリカ、ガラス、ポリスチロール、アルミニウム、鋼、鉄、銅、ニッケル、銀または金からなることを特徴とする請求項 1 1 または 1 2 に記載のアレー。

【請求項 1 4】

請求項 1 ～ 1 3 の何れか 1 項に記載の少なくとも一つの核酸を含む、遺伝子のメチル化状

10

20

30

40

50

態と相関関係を有する疾病の解析用 DNA-アレー及び／または PNA-アレー。

【請求項 15】

下記の段階からなることを特徴とする、シトシンのメチル化の解析により、進行状態の疾病または特定の疾病の発病素質の診断のために、遺伝的及び／または後天的パラメーターを調査する方法。

a) 一つのゲノム DNA-試料について、5-部位の非メチル化シトシン塩基を化学処理によって、ウラシルまたは他の、塩基対挙動がシトシンに類似していない塩基に変換する；

b) この化学的に前処理されたゲノム DNA から、断片が、請求項 7 または 8 に記載のプライマーオリゴヌクレオチッド及びポリメラーゼの組合わせの使用によって増幅され、その際、増幅産物が証明可能な標識を帯びている； 10

c) 増幅産物は請求項 2～4 の何れか 1 項に記載のオリゴヌクレオチッド及び／または PNA-ゾンデまたは請求項 11～13 の何れか 1 項に記載の一つのアレーの使用によってハイブリッド化される；

d) 次に、ハイブリッド化された増幅産物が証明される。

【請求項 16】

化学処理が重亜硫酸塩、酸性亜硫酸塩または亜硫酸水素塩の溶液によって行なわれることを特徴とする請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

10 を超える異なる、100～2,000 の塩基対長の断片が増幅されることを特徴とする、請求項 15 または 16 に記載の方法。 20

【請求項 18】

増幅が多く DNA-断片によって、反応器中で行なわれることを特徴とする請求項 15～17 の何れか 1 項に記載の方法。

【請求項 19】

ポリメラーゼが耐熱性 DNA-ポリメラーゼであることを特徴とする請求項 15～18 の何れか 1 項に記載の方法。

【請求項 20】

増幅がポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) により行なわれることを特徴とする請求項 19 に記載の方法。 30

【請求項 21】

増幅産物の標識が蛍光標識であることを特徴とする請求項 15～20 の何れか 1 項に記載の方法。

【請求項 22】

増幅産物の標識が放射性核種であることを特徴とする請求項 15～20 の何れか 1 項に記載の方法。

【請求項 23】

増幅産物の標識が、質量分析計で証明可能であって、分離可能な、通常分子量の分子断片であることを特徴とする請求項 15～20 の何れか 1 項に記載の方法。

【請求項 24】 40

増幅産物または増幅産物の断片が質量分析計で証明されることを特徴とする請求項 15～20 の何れか 1 項に記載の方法。

【請求項 25】

質量分析計の検出能力を改善するために、検出対象の断片が各々陽荷電または陰荷電を帯びることを特徴とする請求項 23 及び／または請求項 24 に記載の方法。

【請求項 26】

検出がマトリックス補助レーザー脱離／イオン化質量分析法 (MALDI) または電子噴射質量分析法 (ESI) によって行なわれ、映像化されることを特徴とする請求項 23～25 の何れか 1 項に記載の方法。

【請求項 27】

ゲノムDNAがDNAを含む細胞または細胞構成物から得られ、その際、DNAの供給源が例えば、細胞列、生検、血液、喀痰、便、尿、脳脊髄液、パラフィン埋め込み組織、例えば、眼、腸、腎臓、脳、心臓、前立腺、肺、乳房または肝臓の組織、組織の顕微鏡スライドガラス標本及びこれらから得られる全ての可能な組み合わせを含むことを特徴とする請求項15～26の何れか1項に記載の方法。

【請求項28】

請求項2～4の何れか1項に記載の重亜硫酸塩（＝酸性亜硫酸塩、亜硫酸水素塩）及びオリゴヌクレオチッド及び／またはPNA-オリゴマーを含むキット。

【請求項29】

請求項1に記載の核酸、請求項2～4の何れか1項に記載のオリゴヌクレオチッドまたはPNAオリゴマー、請求項28に記載のキットまたは請求項10～13の何れか1項に記載の、以下に列挙する各種疾病、障害等についてメチル化サンプルの解析による診断及び治療。薬剤の副作用；各種癌；CNS機能欠損；攻撃的徴候または挙動；脳傷害の結果、惹起される臨床的、心理的及び社会的マイナスの効果；精神錯乱及び人格錯乱；老人性痴呆及び／またはそれに附随する徴候；心筋症；胃腸系統の機能欠損、傷害または疾病；呼吸器系統の機能欠損、傷害または疾病；傷害、炎症、感染、免疫、及び／または、回復期、発育期の身体異常としての機能欠損、傷害または疾病；皮膚、筋肉、結合組織または骨の機能欠損、傷害または疾病；内分泌及び代謝系の機能欠損；頭痛、性機能障害。

【発明の詳細な説明】

【0001】

（発明の分野）

近年、分子生物学において、方法的展開の後に、成功している研究分野は、遺伝子自体、RNAにおけるこの遺伝子の翻訳及びそれから生成する蛋白質である。個々の開発経過における何時、どの遺伝子が評価されたか、如何にして特定の細胞及び組織の、特定の遺伝子の活性化及び障害が制御されるかは、遺伝子またはゲノムのメチル化の程度及び特性に相関する。その限りでは、個々の遺伝子またはゲノムの変化したメチル化サンプルにおける疾病状態が表現される。

【0002】

本発明は核酸、オリゴヌクレオチッド、PNA-オリゴマー及び進行中の疾病または特定の疾病の発病素質についての診断方法に関する。

【0003】

（従来の技術）

CpG島のメチル化は、しばしば、転写不活性性と同一視される。CpG島遺伝子のプロモーター中に見られる一義的な証明はされていないが、全てのCpG島と既知のプロモーターが局在するメチル化位置とは同じではない。異なる、組織特異性の、刻印の遺伝子において、CpG島は転写出発部位から、見かけ上、下流方向に離れた部位に局在し、多くの遺伝子が複数のプロモーターを有している。疾病の多くがCpGジヌクレオチッドのメチル化と因果関係にあると実証されている。古典的突然変異に対して、DNA-メチル化では、コード化された遺伝子の機能を変えることなく、塩基置換を行なうメカニズムが重要である。後天的変換と古典的突然変異との間の相互作用は腫瘍遺伝子では重要な役割を演じる。例えば、病巣についての過度のメチル化及び一般的なゲノムメチル化は多くの異なる腫瘍タイプの指標となる。腫瘍の発生及び腫瘍の進行は過度のメチル化によって、誘発された突然変異及び他の、遺伝子遮断、これは細胞増殖及び／または遺伝子の、脱メチルを経て、誘導された、発生学的展開にのみ必要な、再活性化を制御するが、が原因となる。

【0004】

遺伝性、非ポリープ性結腸直腸癌では、例えば、突然変異マイナスの大腸ガンの主要部は、以前は、hMLH1プロモーターの過度メチル化及びそれに続くhMLH1の非発現、欠損対の修復に原因がある[Bevilacqua RA, Simpson AJ. ハイレベルミクロサテライト不安定性を有する散発性胃癌におけるhMLH1突然変異ではない、hMLH1プロモーターのメチル化。Int

10

20

30

40

50

J Cancer. 2000 Jul 15;87(2):200~3]。肺癌の原因では、発現の減少がRAS効果－相
 同体のプロモーター配列におけるCpG島のメチル化と関連する[Dammann R, Li C, Yoon
 JH, Chin PL, Bates S, Pfeifer GP, 肺腫瘍抑制遺伝子坐3p21.3.からのRAS結合域同族蛋
 白質の後天的不活性化。Nat Genet 2000 Jul; 25(3):315~9]。プロモーターの過度のメ
 チル化を含む、腫瘍抑制遺伝子LKB1の後天的不活性化はPeutz-Jeghers症候と関連す
 る[Esteller M, Avizienyte E, Conn PG, Lothe RA, Baylin SB, Aaltonen LA, Herman J
 G, 一次腫瘍のLKB1の後天的不活性化はPeutz-Jeghers症候と関連する。Oncogene. 2
 000 Jan 6;19(1):164~8]。

【0005】

メチル化と関連する疾病の多くが、その病因において、腫瘍抑制遺伝子p16またはp15 10
 遺伝子の間に、真菌症とp16(INK4a)遺伝子の間に認められるような密接な関係を示して
 いる[Navas IC, Ortiz-Romero PL, Villuendas R, Martinez P, Garcia C, Gomez E, Rod
 ríguez JL, Garcia D, Vanaclocha F, Iglesias L, Piris MA, Algara P, p16(INK4a)遺
 伝子の変性はしばしば真菌症の原因になる。Am J Pathol. 2000 May;156(5):1565~72]。
 また、胃癌の転写遺伝子p16の切断と若干の、特殊なCpG部位の新たなメチル化の間に
 は、ある強力な関係がある[Song SH, Jong HS, Choi HH, Kang SH, Ryu MH, Kim NK, Kim
 WH, Bang YJ, プロモーター領域の特殊なCpG部位のメチル化は胃癌の、p16(INK4a)発
 現を強力に制御できる。Int J Cancer. 2000 Jul 15;87(2):236~40]。初期の胆管硬化症
 と関連する胆管癌の病因は、p16プロモーターのメチル化に依存する、腫瘍抑制遺伝子p
 16の不活性化、と相関関係にある[Ahrendt SA, Eisenberger CF, Yip L, Rashid A, Ch 20
 ow JT, Pitt HA, Sidransky D, 染色体9p21損失及び初期胆管硬化症に関連する胆管癌
 のp16不活性化。J Surg Res. 1999 Jun 1;84(1):88~93]。白血病素因及び急性リンパ
 性白血病の進行において、p16遺伝子の過度のメチル化による不活性化が、一つの役割
 を演じる [Nakamura M, Sugita K, Inukai T, Goi K, Iijima K, Tezuka T, Kojika S, S
 hiraishi K, Miyamoto N, Karakida N, Kagami K, O-Koyama T, Mori T, Nakazawa S, p
 16/MTS1/INK4A遺伝子は11q23転移の幼児性、急性リンパ性白血病におけ
 る過度のメチル化によってしばしば不活性化される。Leukemia. 1999 Jun;13(6):884~90
]。更に、p16遺伝子及びp15遺伝子の過度メチル化が多くの骨髄癌の原因に決定的役割
 を演じていることが前提になる[Ng NH, Wong IH, Lo KW, DNAメチル化の変化及び多数
 の骨髄炎。リンパ性白血病。1999 Aug;34(5~6):463~72]。腎臓癌の発病素質にはメチル 30
 化によって不活性化されたVHL遺伝子が関与しているとみなされる[Glavac D, Ravni
 k-Glavac M, Ovcak Z, Masera A, 腎細胞癌の源発と進行における遺伝子的変化。Pfluge
 rs Arch. 1996; 431 (6 Suppl 2) :R193~4]。5' CpG島の異常メチル化は鼻咽癌
 におけるp16遺伝子の転写不活性化に関与している可能性がある[Lo KW, Cheung ST, Le
 ung SF, van Hasselt A, Tsang YS, Mak KF, Chung YF, Woo JK, Lee JC, Huang DP, 鼻
 咽喉癌におけるp16遺伝子の過度メチル化。Cancer Res. 1996 Jun 15;56(12):2721~
 5]。肝細胞癌ではp16蛋白の不活性化が証明されている。プロモーターの過度メチル化
 及び遺伝子の同型接合体の消去はここでは頻繁なメカニズムに属する[Jin M, Piao Z, Ki
 m NG, Park C, Shin EC, Park JH, Jung HJ, Kim CG, Kim H, p16は肝細胞癌における
 一つの大きな不活性化標的である。2000 Jul 1;89(1):60~8]。DNAメチル化は乳癌 40
 のBRCA-1遺伝子の遺伝子発現を制御することが証明された。[Magdinier F, Billa
 rd LM, Wittmann G, Frappart L, Benchaib M, Lenoir GM, Guerin JF, Dante R, BR
 CA-1のCpG島5'末端の部分的メチル化はヒトの体細胞FASBの遺伝子発現を
 抑制することに関与する。]。メチル化と非ホジキンリンパ腫の間の関係も同様に認めら
 れている[Martinez-Delgado B, Richart A, Garcia MJ, Robledo M, Osorio A, Cebrian
 A, Rivas C, Benitez J, 非ホジキンリンパ腫の追跡における病気の標識としてのP16in
 k4a及びP15ink4b遺伝子。Br J Haematol. 2000 Apr;109(1):97~103]。

【0006】

CpGメチル化はT細胞白血病を進行させ、これはCDKN2A遺伝子の発現低下と 50
 相関する[Nosaka K, Maeda M, Tamiya S, Sakai T, Mitsuya H, Matsuoka M, CDKN2

A 遺伝子のメチル化の増加は成人 T-細胞白血病の進行と相関する。Cancer Res. 2000 Feb 15;60(4):1043~8]。膀胱癌では、CpG-島のメチル化度を上げることと関連する[Salem C、Liang G、Tsai YC、Coulter J、Knowles MA、Feng AC、Groshen S、Nichols PW、Jones PA、膀胱癌の CpG 島のメチル化度と進行速度の増加。Cancer Res. 2000 May 1;60(9):2473~6]。食道の扁平上皮細胞癌の転写非活性化は、病気の進行に關与する F H I T 遺伝子のメチル化と関連する[Shimada Y、Sato F、Watanabe G、Yamasaki S、Kato M、Mameda M、Imamura M、脆弱なヒスチジン三つ組み遺伝子発現の低下は食道の扁平上皮細胞癌の進行に關係があるが、患者の予兆及び喫煙歴には無關係である。Cancer. 2000 Jul 1;89(1):5~11]。中性エンドペプチダーゼ 24.11 (NEP) は、男性ホルモン非依存性前立腺癌の生長に關与する、神経ペプチッドの成長を非活性化する。NEP-プロモーターの過度のメチル化による NEP 発現の減少は、神経ペプチッド刺激性男性ホルモン非依存型前立腺癌の成長を助長する[Usmani BA、Shen R、Janeczko M、Papandreou CN、Lee WH、Nelson WG、Nelson JB、Nanus DM、ヒト前立腺癌の中性エンドペプチダーゼ遺伝子プロモーターのメチル化。Clin Cancer Res. 2000 May;6(5):1664~70]。成人の副腎皮質腫瘍は腫瘍-DNA の構造的異常を示す。この異常は他の IGF2 遺伝子の過発現下に、この遺伝子座の DNA の脱メチルと関連がある[Wilkin F、Gagne N、Paquette J、Oligny L、Deal C、小児性副腎皮質腫瘍：分子内変異がインシュリン様成長因子 II 遺伝子の過発現へと導く。J Clin Endocrinol Metab. 2000 May;85(5):2048~56. Review]。網膜芽腫遺伝子で、多くのポリヌクレオチッドにおける DNA-メチル化がこの疾病に關与していることが認められている[Mancini D、Singh S、Ainsworth P、Rodenhiser D、網膜芽腫遺伝子 (RB1) における、構成的に突然変異を起こし易いホットスポットとしてのメチル化 CpG ジヌクレオチッド。Am J Hum Genet. 1997 Jul;61(1):80~7]。慢性骨髓白血球の進行に關して、p53 遺伝子の規制解除とメチル化対象の変更との間には、関連があると推測される[Guinn BA、Mills KI、慢性骨髓白血球の進行における、p53 突然変異、メチル化及びゲノムの不安定度。Leuk Lymphoma. 1997 Jul;26(3~4):211~26]。また、急性骨髓白血球のメチル化との関連も証明されている[Melki JR、Vincent PC、Clark SJ。急性骨髓白血球の多数遺伝子の同時過度メチル化。Cancer Res. 1999 Aug 1;59(15):3730~40]。ウイルス腫瘍の抑制遺伝子における腫瘍特異性メチル化部位が同定された[Kleymenova EV、Yuan X、LaBate ME、Walker CL、ウイルス腫瘍の抑制遺伝子における腫瘍特異性メチル化部位の同定。Oncogene. 1998 Feb 12;16(6):713~20]。バーキットリンパ腫では、いくつかのプロモーターが完全な CpG-メチル化を示している[Tao Q、Roberts on KD、Manns A、Hildesheim A、Ambinder RF、特定バーキットリンパ腫における Epstein-Barr ウイルス (EBV)：初期腫瘍組織の分子的解析。Blood. 1998 Feb 15;91(4):1373~81]。甲状腺腫瘍において、DNA-メチル化が一つの役割を演じていることが認められている[Venkataraman GM、Yatin M、Marcinek R、Ain KB、脱分化甲状腺腫瘍における沃化物摂取の制限： Na^+ / I^- シンポーター遺伝子のメチル化状態への關係。J Clin Endocrinol Metab. 1999 Jul;84(7):2449~57]。

【0007】

多くの癌性疾病がメチル化と関連するだけでなく、多くの非癌性疾病もメチル化と関連している。関節炎の研究が、この病気がゲノム DNA のメチル化と関連することを示している[Kim YI、Logan JW、Mason JB、Roubenoff R、関節炎における DNA の低メチル化：抗悪性腫瘍薬による逆療法。Lab Clin Med. 1996 Aug;128(2):165~72]。ICF-症候ではメチル化で規制された発現が実証された[Kond T、Bobek MP、Kuick R、Lamb B、Zhu X、Narayan A、Bourc'his D、Viegas-Pequignot E、Ehrlich M、Hanash SM、ICF-症候における全ゲノムのメチル化：非サテライト DNA の低メチル化は D4Z4 NBL2 を反復する。]。システムループス紅斑症へのメチル化の關与が推定される[Vallin H、Perers A、Alm GV、Ronnblom L、システムループス紅斑症における内因性 IFN- α 誘導物質のミミック組み合わせの、抗体の抗二重鎖 DNA 及び免疫刺激性プラスミド DNA。J Immunol. 1999 Dec;163(11):6306~13]；同様に、デュシェンヌ型進行性筋ジストロフィー及び CpG 島の間の関連[Banerjee S、Singh PB、Rasberry C、Cattanach BM、マウス精

10

20

30

40

50

子の書込みH19領域のクロマチン体の初期遺伝継承。Mech Dev. 2000 Feb;90(2):217~26;Burmeister M、Lehrach H、デュシェンヌ型進行性筋ジストロフィー遺伝子の周辺図。Nature. 1986 Dec11~17;324(6097):582~5]。アミロイド前駆蛋白の低メチル化に關与する後天的効果は、アルツハイマー病の發生に關与すると推定される[West RL、Lee JM、Maroun LE、アルツハイマー病患者の腦中のアミロイド前駆蛋白遺伝子の低メチル化。J Mol Neurosci. 1995;6(2):141~6]。染色体面でもメチル化状態は重要な役割を演じる。例えば、X-染色体の脆弱性と關係する精神的發育不全症候において、染色体の脆弱性の程度はメチル化によって決定される[de Muniain AL、Cobo AM、Poza JJ、Saenz A、(DNAの不安定性による病氣)。Neurologia. 1995 Dec;10 Suppl 1:12~9]。

【0008】

10

5-メチルシトシンは最も頻繁に現われる、真核細胞のDNAの共有結合反応した塩基である。これは例えば、遺伝子書込み及び腫瘍發生の際、転写規制で或役割を演じる。遺伝情報の構成部分としての5-メチルシトシンの同定はそれ故非常に興味がある。5-メチルシトシンはシトシンと同じ塩基対挙動を示すので、5-メチルシトシンの部位は配列によっては同定できない。更に、PCR-増幅では5-メチルシトシンが有する後天的情報は完全に失われる。

【0009】

DNAの5-メチルシトシンについての研究で、比較的新しく、頻繁に使用される方法は、重亜硫酸塩とシトシンとの特殊な反応である。これはその後続くアルカリ加水分解で、その塩基対挙動がチミンに相当するところのウラシルに変化する。5-メチルシトシンはそれに対して、この条件下で変化しない。このようにして、元のDNAは変換されて、もともと、その増幅挙動からではシトシンと区別され得なかったメチルシトシンは、今や、通常の分子生物学的技法で、僅かに残存するシトシンとして、例えば、増幅及びハイブリッド化または配列化によって証明される。感度に関する現技術水準は、調べるDNAをアガロースマトリックスに封じこめることによって、DNAの拡散と変性(重亜硫酸塩は単鎖DNAにのみ反応する)が防止され、全ての沈殿-及び精製過程が迅速な透析操作で置き換えられる[Olek、A. et al.、Nucl. Acids. Res. 1996、24、5064~5066]。ポテンシャルが具体的に説明できる方法によって、個々の細胞が研究される。ただし、今日まで、僅か3000塩基対長までの個別領域が調べられたにすぎず、数千のメチル化解析を要する細胞研究は不可能である。また、この方法では、僅少量の試料からの非常に小さい断片から信頼性のある解析結果を得ることはできない。これら試料はマトリックスによる拡散の保護によってもロスされる。

20

30

【0010】

5-メチルシトシンを証明する広範な公知の方法についての概観は、次ぎの概観-刊行物から読み取れる。: Rein、T.、DePamphilis、M. L.、Zorbas、H.、Nucleic Acids Res. 1998、26、2255.

【0011】

重亜硫酸塩-技法は今日まで、ほんの僅かの例外[Z. B. Zechnick、M. et al.、Eur. J. Hum. Gen. 1997、5、94~98]として研究で使用されていた。常に既知の遺伝子の短い、特殊な断片が重亜硫酸塩-処理後増幅されるか、完全に配列されているか[Olek、A. und Walter、J.、Nat. Genet. 1997、17、275~276]または個々のシトシン-位置が“プライマー-延長-反応”[Gonzalzo、M. L. und Jones、P. A.、Nucl. Acids Res. 1997、25、2529~2531、WO-Patent 9500669]または酵素断片[Xiong、Z. und Laird、P. W.、Nucl. Acids. Res. 1997、25、2532~2534]が証明された。これにはハイブリッド化による証明も記載されている[Olek et al.、W099 28498]。

40

【0012】

個々の遺伝子のメチル化の証明に重亜硫酸塩-技法を使用することを記載している他の刊行物は以下の通りである。Xiong、Z und Laird、P. W. (17)、Nucl. Acids Res. 25、2532;Gonzalzo、M. L. und Jones、P. A. (1997)、Nucl. Acids Res. 25、2529;Grigg、S. und Clark、S. (1994)、Bioassays 16、431;Zeschnick、M. et al. (1997)、Human Molecu

50

lar Genetics 6、387;Teil、R. et al. (1994)、Nucl. Acids. Res. 22、695;Martin、V. et al. (1995)、Gene 157、261;WO 9746705、WO 9515373 und WO 45560.

【0013】

マトリックス補助レーザー脱離／イオン化質量分析(MALDI-TOF)は非常に優れた分子生物学における解析手段である[Karas、M. und Hillenkamp、F. (1988)、分子量10000ダルトンを超える蛋白質分子のレーザー脱離イオン化。Anal. Chem. 60:2299~2301]。或分析では光吸収性マトリックスが使用されている。短いレーザー照射でマトリックスが蒸発し、被分析分子は分解することなくガス化する、マトリックス分子の衝撃により、被分析分子のイオン化が達成される。一定の電圧により、イオンは飛行管へと加速される。イオンの質量に比例して、異なる強さで加速される。小さいイオンは大きいイオンより早く検出器に到達する。

10

【0014】

MALDI-TOF質量分析はペプチッド及び蛋白質の分析に優れており、且つ好適である。核酸の分析にはやや難点がある[Gut、I. G. und Beck、S. (1995)DNA及びマトリックス補助レーザー脱離／イオン化質量分析。分子生物学：技術革新の現状と将来の傾向1:147~157。]。核酸の分析時の感度は、ペプチッドの場合の感度に比較して約100倍も悪く、断片の大きさが増加するに従って、それに不釣合な程度に感度が低下する。核酸については、多量の負電荷を帯びた骨格を有するので、マトリックスによるイオン化過程が本質的に非効率的である。MALDI-TOF質量分析では、マトリックスの選択が非常に重要である。ペプチッドの脱離用に、非常に細かい結晶になる、非常に有効な、いくつかのマトリックスが発見された。DNAへの用途としては、感度にそれほど差のない、いくつかのマトリックスがある。DNAを化学処理してペプチッドに類似するものにすることによって、感度を低下させることができる。普通のホスフェート骨格がチオホスフェートで置換されるホスホロチオエイト核酸は簡単なアルキル化剤によって、中性電荷のDNAに変換される[Gut、I. G. und Beck、S. (1995)、DNAの選択的アルキル化法と質量分析法による検出。Nucleic Acids Res. 23:1367~1373]。“charge tags”をこの化学変化されたDNAに結合させると、ペプチッドにみられる感度と同程度に感度が上昇する。“charge tags”の、もう一つの利点は、変化しない物質の検出を困難にする不純物の分析安定性を高めることである。

20

【0015】

ゲノムDNAは細胞一試料、組織一試料または他の試験試料から、標準的方法により得られる。この標準的方法はFritsch und Maniatis eds.、分子クローン：実験マニュアルなどの参考文献に記載されている。

30

【0016】

(課題の設定)

本発明はシトシンメチル化の検出のためのオリゴヌクレオチッド及び／またはPNA-オリゴマー及び方法を提供することにある。これは特定の疾病について、遺伝的及び／または後天的パラメーターの組の解析による、疾病または疾病の発病素質の診断のために、特に好適である。

【0017】

(発明の詳細な説明)

本発明は少なくとも、化学的に前処理されたゲノムDNA(配列ID1~配列ID40712)におけるシトシンメチル化状態の検出のために使用される、10個のオリゴマーゾンデ(オリゴヌクレオチッド及びまたはPNA-オリゴマー)の組である。このゾンデによって、現在進行中の疾病または特定の疾病の発病素質の診断のための遺伝的及び／または後天的パラメーターの組の解析が可能になる。

40

【0018】

本発明における遺伝的パラメーターは、請求項記載の核酸(配列ID1~配列ID40712)の突然変異及び多形性及びその規制外の必要とする配列である。特に、突然変異としては、組込み、一部染色体の欠失、一部突然変異、遺伝子配列順の逆位及び多形性及び

50

、中でも特に、S N P s (単一ヌクレオチッド多形性) を挙げることができる。多形性は上記の組込み、一部染色体の欠失または遺伝子配列順の逆位でもあり得る。

【0019】

本発明における後天的パラメーターは、特に、請求項記載の核酸(配列 I D 1 ~ 配列 I D 4 0 7 1 2) の D N A - 塩基のシトシン-メチル化及び更なる化学変化及びその規制外の必要とする配列である。その他の後天的パラメーターは、例えば、ヒストンのアセチル化があるが、これは本発明の方法では直接解析できず、再度の D N A - メチル化を要する。前記化学的に前処理された D N A では、少なくとも、18塩基対長の、配列 I D 1 ~ 配列 I D 4 0 7 1 2 の断片が診断用として使用される。この断片の検出には、少なくとも、9ヌクレオチッド長のオリゴマーが使用される。

10

【0020】

上記オリゴマーは少なくとも一つの C p G ジヌクレオチッドを含む。C p G ジヌクレオチッドのシトシンはオリゴマーの約3分の1存在する。オリゴマーの組においては、その都度、少なくとも各 C p G ジヌクレオチッド毎に、配列 I D 1 ~ 配列 I D 4 0 7 1 2 の、少なくとも一つのオリゴヌクレオチッドが存在する。オリゴマーは担体物質上に一定の配置で形成される。

【0021】

この関係においては、更に、請求項記載の、配列 I D 1 ~ 配列 I D 4 0 7 1 2 の核酸の遺伝的及び／または後天的パラメーターの診断のためには、個々の C p G ジヌクレオチッドではなくて、配列中に存在する多数の C p G ジヌクレオチッドが解析されねばならない。本発明の方法の特に好ましい変形においては、配列中に存在する全ての C p G ジヌクレオチッドが研究されねばならない。

20

【0022】

本発明の方法の好ましい変形においては、少なくとも一つのオリゴマーが、一つの固相に結合される。

【0023】

本発明の方法の更に好ましい変形の一つにおいては、化学的に前処理されたゲノム D N A における、シトシン-メチル化状態及び／または S N P s 単一ヌクレオチッド多形性 (S N P s) が使用される。

【0024】

本発明におけるオリゴマーは、メチル化試料の解析によって、以下に列挙する各種疾病、障害等についての診断に使用される。薬剤の副作用；各種癌；C N S - 機能欠損、障害または疾病；攻撃的徴候または挙動；脳傷害の結果、惹起される臨床的、心理的及び社会的マイナスの効果；精神錯乱及び人格錯乱；老人性痴呆及び／またはそれに附随する徴候；心筋症；胃腸系統の機能欠損、傷害または疾病；呼吸器系統の機能欠損、傷害または疾病；傷害、炎症、感染、免疫、及び／または回復期、発育期の身体異常としての機能欠損、傷害または疾病；皮膚、筋肉、結合組織または骨の機能欠損、傷害または疾病；内分泌及び代謝系の機能欠損；頭痛、性機能障害。

30

【0025】

配列 I D 1 ~ 配列 I D 4 0 7 1 2 の、補遺中にリストアップされている核酸の、少なくとも一つが、現在進行中の疾病または特定の疾病の発病素質の診断のための、遺伝的及び／または後天的パラメーターの組の解析用として使用される。

40

【0026】

更に、本発明はゲノム D N A - 試料におけるシトシン-メチル化及び多形性、単一ヌクレオチッドの検出用のオリゴマーゾンドの解析によって、現在進行中の疾病または特定の疾病の発病素質の診断のための、重要な遺伝的及び／または後天的パラメーターの調査方法であり、その方法は次の段階よりなる。

【0027】

本発明の方法の最初の段階では、一つのゲノム D N A - 試料について、5 - 位置の非メチル化シトシン塩基を化学処理によって、ウラシル、チミンまたは他の、塩基対挙動がシト

50

シンに類似していない塩基に変換する。これは次ぎに、化学的前処理を施される。

【0028】

通常の特許家にとっては、使用される配列中の、オリゴマーにおいて、チミンがウラシルと交換される際、同じ目的が達成されることが理解できるだろう。

【0029】

解析されるゲノムDNAが、好ましくは、DNAを含む通常のDNAの供給源から得られ、それらは、例えば、細胞列、生検、血液、喀痰、便、尿、脳脊髄液、パラフィン埋め込み組織、例えば、眼、腸、腎臓、脳、心臓、前立腺、肺、乳房または肝臓の組織、組織の顕微鏡スライドガラス標本及びこれらから得られる全ての可能な組み合わせである。

【0030】

好ましくは、上記ゲノムDNAの処理は重亜硫酸塩（酸性亜硫酸塩または亜硫酸水素塩）によって行なわれ、次いで、アルカリ加水分解されて、非メチル化シトシンー核塩基がウラシルへ変化される。

【0031】

本発明の方法の第二段階において、化学的に前処理されたゲノムDNA断片がプライマーオリゴヌクレオチッドによって増幅される。

【0032】

好ましくは、異なる、10を超える数の、100～2,000の塩基対長の断片が増幅される。

【0033】

本発明の、変形された、好ましい方法では増幅がポリメラーゼ連鎖反応（PCR）により行われ、その際、耐熱性DNAポリメラーゼが使用されることが好ましい。

【0034】

本発明においては、増幅が多くDNA断片によって、反応器中に行なわれることが好ましい。

【0035】

本発明の方法の好ましい変形においては、その配列がその都度、補遺（配列ID1～配列ID40712）にリストアップされている塩基配列の少なくとも18塩基対長の断片に、対相補的であるか、同一であり、少なくとも二つのオリゴヌクレオチッドであるプライマーオリゴヌクレオチッドの組を含む。このプライマーオリゴヌクレオチッドは、好ましくは、CpGジヌクレオチッドを含まないことが特徴である。

【0036】

本発明の好ましい形態は、更に、異なるオリゴマーが固相の平坦な平面上に四角形または六角形状格子形で、配置されていることである。

【0037】

本発明の、変形された、好ましい方法は、増幅が、固相に結合する、プライマーオリゴヌクレオチッドの鎖延長によって行なわれる方法である。

【0038】

固相表面がシリカ、ガラス、ポリスチロール、アルミニウム、鋼、鉄、銅、ニッケル、銀または金からなることが好ましい。

【0039】

第二段階で得られた、増幅産物は、次いで、オリゴヌクレオチッド及び／またはPNAゾンデまたは一つのアレーの使用によってハイブリッド化される。ハイブリッド化の際、使用される組は好ましくは、少なくとも、10オリゴマーゾンデからなるものである。増幅産物は固相に結合するオリゴヌクレオチッドをハイブリッド化するゾンデとして働く。次いでハイブリッド化されなかった断片は除去される。

【0040】

前記オリゴマーは、少なくとも一つのCpGジヌクレオチッドを含む、少なくとも9ヌクレオチッド長の塩基配列を含むものである。そして、CpGジヌクレオチッドのシトシンはオリゴマーの約3分の一である。CpGジヌクレオチッド毎に一つのオリゴヌクレオチ

10

20

30

40

50

ッドが存在する。

【0041】

本発明の方法の第四段階ではハイブリッド化されなかった増幅産物が除去される。

【0042】

本発明の方法の最終段階では、ハイブリッド化された増幅産物が検出される。

【0043】

本発明においては、オリゴヌクレオチッド配列が存在する、固相の部位毎に、増幅産物に付加された標識が同定可能であることが好ましい。

【0044】

本発明においては、増幅産物に付加された標識が蛍光物質標識であることが好ましい。

10

【0045】

本発明においては、増幅産物に付加された標識が放射性核種であることが好ましい。

【0046】

本発明においては、増幅産物に付加された標識が、分離可能な、質量分析計で証明可能であって、通常分子量の分子断片であることが好ましい。

【0047】

本発明においては、増幅産物、増幅産物の断片または増幅産物に相補的なゾンデが、質量分析計で証明可能であることが好ましい。

【0048】

本発明においては、質量分析計の検出能力を改善するために、検出対象の断片が各々陽荷電または陰荷電を帯びることが好ましい。

20

【0049】

本発明においては、検出がマトリックス補助レーザー脱離／イオン化質量分析法（MALDI）または電子噴射質量分析法（ESI）によって行なわれ、映像化されることが好ましい。

【0050】

更に、本発明においては、患者または健常者個人の好ましくない徴候の診断及び／または予備診断において、この好ましくない徴候が重要な遺伝的及び／または後天的パラメータと関係があることが好ましい。

【0051】

30

本発明においては、進行中の病気または、ある特定の疾病の発病素質の診断に、遺伝的及びまたは／後天的パラメータの組の解析による方法が使用されることが好ましい。

【0052】

本発明の対象は、重亜硫酸塩含有反応剤；配列がその都度、少なくとも、18塩基対長の、補遺としてリストアップされている塩基配列（配列ID1～配列ID40712）の断片に対応するか、または、それに相補的であり、増幅産物製造用であって、少なくとも、二つのオリゴヌクレオチッドを含む、プライマーオリゴヌクレオチッド；オリゴヌクレオチッド；及び／または、PNA-オリゴマーの組；及び、本発明の方法の実施及び評価用手引き；からなるキットである。

【0053】

40

次ぎの実施例は、特定のCG-部位のメチル化が調べられているところの、遺伝的非ポリープ性結腸直腸癌に關与するhHML1遺伝子断片についてのものである。

【0054】

第1段階では、ゲノム配列が、塩基の5-部位がメチル化されない、全ての、シトシンが変化して、塩基対挙動が異なる塩基を生成し、それに対して、塩基の5-部位がメチル化されたシトシンが変化しないように、重亜硫酸塩（亜硫酸水素塩、酸性亜硫酸塩）により処理される。反応が重亜硫酸塩の濃度が0.1～6モルで行なわれると、非メチル化シトシン塩基に付加が起こる。これには、変性剤または溶剤及びラジカル捕捉剤の使用が必要である。次いで、アルカリ加水分解により、非メチル化シトシン-核塩基がウラシルに変換される。この変換されたDNAはメチル化シトシンの証明に使用される。反応の第二段

50

階で、DNA－試料が水または水性溶剤で希釈される。続いてDNAの脱スルフォン（10～30分、90～100℃）がアルカリpH域の値で行なわれる。本発明の方法の第三段階でDNA－試料が好ましくは、耐熱性DNA－ポリメラーゼの使用下、ポリメラーゼ連鎖反応により増幅される。本実施例では、1551bp5'側鎖領域のhHML1遺伝子のシトシンが調べられる。ここでは、特殊なプライマーオリゴヌクレオチッドであるAGC A A C A C C T C C A T G C A C T G及びT T G A T T G G A C A G C T T G A A T G Cによって、719bp長の断片が増幅される。この増幅産物は固相に結合するオリゴヌクレオチッドを増幅する試料として使用され、二重鎖構造、例えば、G A A G A G C G G A C A Gが形成される。このとき、証明されるシトシンは増幅産物の588部位に存在する。ハイブリッド化産物の証明はCy3及びCy5の部位が蛍光標識され、増幅に使用された、プライマーオリゴヌクレオチッドにより証明される。亜硫酸塩で処理されたDNAのこの位置に、メチル化シトシンが存在するならば、増幅されたDNAのハイブリッド化反応はオリゴヌクレオチッドによって起こる。このようにして、その都度、調べられるシトシンのメチル化状態はハイブリッド化産物を経て決定される。

10

【配列表】[2005512499000001.app](#)[2005512499000002.app](#)[2005512499000003.app](#)[2005512499000004.app](#)[2005512499000005.app](#)

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 01/10073

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC 7 C12Q1/68 G01N33/50 B01J19/00 C12N15/11 A61K31/70		
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 practicable, search terms used)		
EPO-Internal, EMBL, WPI Data, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, PAJ		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE EMBL 'Online! Human flotillin cDNA, 23 September 1998 (1998-09-23) retrieved from EMBL Database accession no. AF089750 XP002230584	1-3
Y	abstract	4-29
Y	WO 99 28498 A (OLEK ALEXANDER ;WALTER JOERN (DE); EPIGENOMICS GMBH (DE); OLEK SVE) 10 June 1999 (1999-06-10) cited in the application the whole document	1-29
Y	WO 95 11995 A (AFFYMAX TECH NV ;FODOR STEPHEN P A (US); GINGERAS THOMAS R (US); L) 4 May 1995 (1995-05-04) page 21, line 23 - page 61, line 2 -/-	10-27, 29
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family 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
21 February 2003 (21.02.03)		09 July 2003 (09.07.03)
Name and mailing address of the ISA/		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 01/10073

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
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	10-27, 29
Y	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 page 2258, column 2, paragraph 2 - page 2261, column 2, paragraph 1; figure 2	15-29
Y	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 page 9822, column 1, paragraph 2 - column 2, paragraph 1 pages 9823, column 1, paragraph 2 - page 9824, column 1, paragraph 2; table 1	1-29
A	VOLONTE D ET AL: "Flotillins/cavatellins are differentially expressed in cells and tissues and form hetero-oligomeric complex with caveolins in vivo" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL CHEMISTS, BALTIMORE, MD, US, vol. 274, No. 18, 30 April 1999 (1999-04-30), pages 12702-12709, XP002171909 ISSN: 0021-9258 the whole document	1-29

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 01/10073

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 29 (partly)
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
**see supplementary sheet (FURTHER INFORMATION
CONTINUED FROM PCT/ISA/210)**
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-29 (partly)

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

EP01/10073

2. Claims 1-29 (in part)

Invention 2

nucleic acid comprising an at least 18 base long sequence segment of DNA according to SEQ ID NO: 3 or 4; oligomer comprising at least one base sequence with a length of at least 9 nucleotides and which hybridizes to SEQ ID NO. 1 or 2; set comprising the nucleic acid or the oligomer; array comprising the oligomer and method of producing it; use of the oligomer or oligomer set for analysis of cytosine methylations; kit comprising the nucleic acid or the oligomer; use of the nucleic acid, the oligomer, the kit or the array for diagnosis or therapy.

Inventions 2-20355

...idem for SEQ ID NO: 5 & 6, 7 & 8,..., 40709 & 40710.

Invention 20356

nucleic acid comprising an at least 18 base long sequence segment of DNA according to SEQ ID NO: 40711 or 40712; oligomer comprising at least one base sequence with a length of at least 9 nucleotides and which hybridizes to SEQ ID NO. 40711 or 40712; set comprising the nucleic acid or the oligomer; array comprising the oligomer and method of producing it; use of the oligomer or oligomer set for analysis of cytosine methylations; kit comprising the nucleic acid or the oligomer; use of the nucleic acid, the oligomer, the kit or the array for diagnosis or therapy.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

EP01/10073

Continuation of I.1

Although Claim 29 relates to a method for treatment of the human or animal body, the search was carried out on the basis of the alleged effects of the compound or composition.

Continuation of I.1

Claim: 29 (in part)

PCT Rule 39.1(iv) – method for treatment of the human or animal body by therapy (Claim 29).

The International Searching Authority has determined that this international application contains multiple (groups of) inventions, namely

1. Claims 1-29 (in part)

Invention 1

nucleic acid comprising an at least 18 base long sequence segment of DNA according to SEQ ID NO: 1 or 2; oligomer comprising at least one base sequence with a length of at least 9 nucleotides and which hybridizes to SEQ ID NO. 1 or 2; set comprising the nucleic acid or the oligomer; array comprising the oligomer and method of producing it; use of the oligomer or oligomer set for analysis of cytosine methylations; kit comprising the nucleic acid or the oligomer; use of the nucleic acid, the oligomer, the kit or the array for diagnosis or therapy.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 01/10073

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
WO 9511995	A	04-05-1995	AU 8126694 A 22-05-1995
			EP 0730663 A1 11-09-1996
			JP 9507121 T 22-07-1997
			WO 9511995 A1 04-05-1995
			US 2003054393 A1 20-03-2003
			US 6156501 A 05-12-2000
			US 6045996 A 04-04-2000
			US 6309823 B1 30-10-2001
			US 5861242 A 19-01-1999
			US 5837832 A 17-11-1998

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internes Aktenzeichen

PCT/EP 01/10073

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12Q1/68 G01N33/50 B01J19/00 C12N15/11 A61K31/70

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

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbol)

IPK 7 C12Q

Recherche 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)

EPQ-Internal, EMBL, WPI Data, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, PAJ

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	DATABASE EMBL 'Online! Human flotillin cDNA, 23. September 1998 (1998-09-23) retrieved from EMBL Database accession no. AF089750 XP002230584	1-3
Y	Zusammenfassung	4-29
Y	WO 99 28498 A (OLEK ALEXANDER ;WALTER JOERN (DE); EPIGENOMICS GMBH (DE); OLEK SVE) 10. Juni 1999 (1999-06-10) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument	1-29
Y	WO 95 11995 A (AFFYMAX TECH NV ;FODOR STEPHEN P A (US); GINGERAS THOMAS R (US); L) 4. Mai 1995 (1995-05-04) Seite 21, Zeile 23 -Seite 61, Zeile 2	10-27,29
	-/-	

☒ 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

21. Februar 2003

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

09.07.03

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 Beauftragter

Bradbrook, D

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

des Aktenzeichens

PCT/EP 01/10073

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
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	10-27,29
Y	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 Seite 2258, Spalte 2, Absatz 2 -Seite 2261, Spalte 2, Absatz 1; Abbildung 2	15-29
Y	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 Seite 9822, Spalte 1, Absatz 2 -Spalte 2, Absatz 1 Seite 9823, Spalte 1, Absatz 2 -Seite 9824, Spalte 1, Absatz 2; Tabelle 1	1-29
A	VOLONTE D ET AL: "Flotillins/cavatellins are differentially expressed in cells and tissues and form hetero-oligomeric complex with caveolins in vivo" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL CHEMISTS, BALTIMORE, MD, US, Bd. 274, Nr. 18, 30. April 1999 (1999-04-30), Seiten 12702-12709, XP002171909 ISSN: 0021-9258 das ganze Dokument	1-29

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

ationales Aktenzeichen
PCT/EP 01/10073

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☒ Ansprüche Nr. 29 (teilweise)
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
siehe Zusatzblatt WEITERE ANGABEN PCT/ISA/210
2. ☐ Ansprüche Nr. _____
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen,
daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. ☐ Ansprüche Nr. _____
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

siehe Zusatzblatt

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr. _____
4. ☒ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgender Ansprüchen erfaßt:
1-29 (teilweise)

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

Internationales Aktenzeichen PCT/EP 01 A0073

WEITERE ANGABEN	PCT/ISA/ 210
Fortsetzung von Feld I.1 Obwohl der Anspruch 29 ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers umfasst, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung. -----	
Fortsetzung von Feld I.1 Ansprüche Nr.: 29 (teilweise)	
Regel 39.1(iv) PCT – Verfahren zur therapeutischen Behandlung des menschlichen oder tierischen Körpers (Anspruch 29)	

Internationales Aktenzeichen PCT/EP 01 40073

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere (Gruppen von) Erfindungen enthält, nämlich:

1. Ansprüche: 1-29 (teilweise)

Erfindung 1

Nukleinsäure umfassend einen mindestens 18 Basen langen Sequenzabschnitt einer DNA gemäß SEQ ID NO:1 oder 2; Oligomer umfassend mindestens eine Basensequenz mit einer Länge von mindestens 9 Nukleotiden, die an SEQ ID NO.1 oder 2 hybridisiert; Satz umfassend die Nukleinsäure oder das Oligomer; Array umfassend das Oligomer und Herstellungsverfahren dafür; Verwendung des Oligomers oder Oligomersatzes zur Analyse von Cytosin-Methylierungen; Kit umfassend die Nukleinsäure oder das Oligomer; Verwendung der Nukleinsäure, des Oligomers, des Kits oder des Arrays zur Diagnose oder Therapie.

2. Ansprüche: 1-29 (teilweise)

Erfindung 2

Nukleinsäure umfassend einen mindestens 18 Basen langen Sequenzabschnitt einer DNA gemäß SEQ ID NO:3 oder 4; Oligomer umfassend mindestens eine Basensequenz mit einer Länge von mindestens 9 Nukleotiden, die an SEQ ID NO.1 oder 2 hybridisiert; Satz umfassend die Nukleinsäure oder das Oligomer; Array umfassend das Oligomer und Herstellungsverfahren dafür; Verwendung des Oligomers oder Oligomersatzes zur Analyse von Cytosin-Methylierungen; Kit umfassend die Nukleinsäure oder das Oligomer; Verwendung der Nukleinsäure, des Oligomers, des Kits oder des Arrays zur Diagnose oder Therapie.

Erfindungen 3-20355

...idem für SEQ ID NOS 5&6, 7&8, ..., 40709&40710.

Erfindung 20356

Nukleinsäure umfassend einen mindestens 18 Basen langen Sequenzabschnitt einer DNA gemäß SEQ ID NO:40711 oder 40712; Oligomer umfassend mindestens eine Basensequenz mit einer Länge von mindestens 9 Nukleotiden, die an SEQ ID NO.40711 oder 40712 hybridisiert; Satz umfassend die Nukleinsäure oder das Oligomer; Array umfassend das Oligomer und Herstellungsverfahren dafür; Verwendung des Oligomers oder Oligomersatzes zur Analyse von Cytosin-Methylierungen; Kit umfassend die Nukleinsäure oder das Oligomer; Verwendung der Nukleinsäure, des Oligomers, des Kits oder des Arrays zur Diagnose oder Therapie.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichung

die zur selben Patentfamilie gehören

les Aktenzeichen

PCT/EP 01/10073

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 9511995 A	04-05-1995	AU 8126694 A	22-05-1995
		EP 0730663 A1	11-09-1996
		JP 9507121 T	22-07-1997
		WO 9511995 A1	04-05-1995
		US 2003054393 A1	20-03-2003
		US 6156501 A	05-12-2000
		US 6045996 A	04-04-2000
		US 6309823 B1	30-10-2001
		US 5861242 A	19-01-1999
		US 5837832 A	17-11-1998

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
G O 1 N 33/58	G O 1 N 33/58	A
G O 1 N 37/00	G O 1 N 37/00	1 O 2
	C 1 2 N 15/00	F

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,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,PH,PL,PT,R O,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZW

(72)発明者 ピーペンブロック, クリスチン
ドイツ国、1 0 1 1 5 ベルリン、シュワルツコップフシュトラッセ 7 ベー

(72)発明者 ベルリン, クルト
ドイツ国、1 4 5 3 2 スターンスドルフ、マリーンケーフェルヴェーク 4

Fターム(参考) 2G045 AA35 DA13 FB02 FB08 FB12 FB15 GB10 GC15
4B024 AA11 AA20 CA01 CA09 HA14 HA19
4B029 AA07 FA12
4B063 QA13 QA19 QQ42 QR32 QR55 QR82 QS34 QX02 QX04 QX07

专利名称(译)	正在进行的疾病或特定疾病的主要疾病的诊断		
公开(公告)号	JP2005512499A	公开(公告)日	2005-05-12
申请号	JP2002522536	申请日	2001-09-01
[标]申请(专利权)人(译)	埃皮吉諾米克斯股份公司		
申请(专利权)人(译)	外延基因组学公司		
[标]发明人	オレクアレクサンダ ピーペンブロッククリスチン ベルリンクルト		
发明人	オレク,アレクサンダ ピーペンブロック,クリスチン ベルリン,クルト		
IPC分类号	G01N33/53 C07K14/47 C07K14/82 C08H1/00 C12M1/00 C12N15/09 C12Q1/68 C12Q1/6883 G01N33/58 G01N37/00		
CPC分类号	C12Q1/6883 C07K14/4703 C07K14/82 C12Q2600/154		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C08H1/00 C12M1/00.A C12Q1/68.A G01N33/53.M G01N33/58.A G01N37/00.102 C12N15/00.F		
F-TERM分类号	2G045/AA35 2G045/DA13 2G045/FB02 2G045/FB08 2G045/FB12 2G045/FB15 2G045/GB10 2G045/GC15 4B024/AA11 4B024/AA20 4B024/CA01 4B024/CA09 4B024/HA14 4B024/HA19 4B029/AA07 4B029/FA12 4B063/QA13 4B063/QA19 4B063/QQ42 4B063/QR32 4B063/QR55 4B063/QR82 4B063/QS34 4B063/QX02 4B063/QX04 4B063/QX07		
优先权	10043826 2000-09-01 DE		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供寡核苷酸和/或PNA-寡聚体和通过分析特定疾病的一组遗传和/或获得参数来检测胞嘧啶甲基化的方法。 , 特别适用于疾病的诊断或疾病的易感性。 [解决方案] 一种通过分析胞嘧啶的甲基化来检查用于诊断进展状态或特定疾病的疾病发作的遗传和/或获得参数的方法, 其包括以下步骤: a) 对于一个基因组DNA样品, 5-甲基化未甲基化的胞嘧啶碱基通过化学处理转化为尿嘧啶或其碱基对行为与胞嘧啶不相似的其他碱基, b) 化学前通过引物寡核苷酸和聚合酶的组合扩增经处理的基因组DNA, c) 通过使用寡核苷酸和/或PNA探测器或阵列杂交扩增产物, d) 杂交体证明扩增产物的存在。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/EP 01/10073
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12Q1/68 G01N33/50 B01J19/00 C12N15/11 A61K31/70 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 prior documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EP0-Internal, EMBL, WPI Data, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, PAJ		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claims No.
X	DATABASE, EMBL, "On-line" Human Fc gamma 1 CD86 23 September 1998 (1998-09-23) Retrieved from EMBL Database accession no. AF089750 AF089750-84 abstract	1-3
Y		4-29
Y	NO 99 28498 A (OLEK ALEXANDER, WALTER JOERN (DE); EPIGENOMICS GMBH (DE); OLEK SVI) 10 June 1999 (1999-06-10) cited in the application the whole document	1-29
Y	NO 95 11995 A (AFFYMAX TECH. NV; FODOR STEPHEN P. A. (US); LINGERAS THOMAS R. (US); E.) 4 May 1995 (1995-05-04) page 21, line 23 - page 61, line 2 - f -	10-27, 29
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family names.		
* Special categories of cited documents: "A" documents defining the general state of the art which is not considered to be prior art "C" earlier documents not published on or after the international filing date or priority date which are known to the applicant, designated or which are cited to establish the prior art of a particular claim or other special reason (as specified) other than of similar nature or other reason "D" document referred to in oral disclosure, use, exhibition or other manner "E" document published prior to the international filing date but later than the priority date "F" prior documents published after the international filing date or priority date which are known to the applicant, designated or which are cited to establish the prior art of a particular claim or other special reason (as specified) other than of similar nature or other reason "G" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is considered in relation to the prior art "H" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is considered in relation to the prior art "I" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is considered in relation to the prior art "J" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is considered in relation to the prior art "K" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is considered in relation to the prior art "L" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is considered in relation to the prior art "M" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is considered in relation to the prior art "N" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is considered in relation to the prior art "O" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is considered in relation to the prior art "P" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is considered in relation to the prior art "Q" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is considered in relation to the prior art "R" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is considered in relation to the prior art "S" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is considered in relation to the prior art "T" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is considered in relation to the prior art "U" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is considered in relation to the prior art "V" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is considered in relation to the prior art "W" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is considered in relation to the prior art "X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is considered in relation to the prior art "Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is considered in relation to the prior art "Z" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is considered in relation to the prior art		
Date of the actual completion of the international search 21 February 2003 (21.02.03)		Date of mailing of the international search report 09 July 2003 (09.07.03)
Name and mailing address of the ISA/ Postmile No.		Authorized officer Telephone No.